

Aus dem
Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Westdeutsche Kieferklinik
Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Becker

**Autogene Knochenspantransplantate:
Einfluss einer neuartigen, piezoelektrischen
Entnahmemethode (Piezosurgery®) auf Spanmorphologie,
Zellvitalität und -differenzierung**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Gabriela Stanca Doina CHIRIAC

2009

**Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität
Düsseldorf**

gez.:

Dekan : Univ. – Prof. Dr. Med. Joachim Windolf

Referent : Univ. – Prof. Dr. J. Becker

Korreferent : Univ. – Prof. Dr. D. Drescher

Inhaltverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	I-II
1 EINLEITUNG	2
1.1 Allgemeiner Hintergrund	2
1.2 Aktuelle Augmentationsverfahren in der zahnärztlichen Chirurgie	3
1.2.1 Typen autologer Knochentransplantate	7
1.3 Biologie des Knochenstoffwechsels: Charakterisierung der Osteoblasten durch spezifische osteoblastäre Marker	8
1.4 Mögliche Nachteile der konventionellen Knochenspanentnahmemethoden	11
1.4.1 Übererwärmung des Knochens	11
1.4.2 Metallische Kontamination	12
1.4.3 Mögliche Verletzungen der benachbarten Weichgewebsstrukturen	13
1.5 Aufbau und Funktionsprinzip der chirurgischen Ultraschallinstrumente	14
1.6 Einsatz des Ultraschalls in der allgemeinen Chirurgie	16
1.7 Einsatz des Ultraschalls in der Zahnheilkunde/zahnärztlichen Chirurgie	18
1.8 Prinzip der Piezochirurgie; der Piezoeffekt	20
1.9 Anwendungsbereiche und Einstellungsparameter des piezoelektrischen Gerätes	21
1.10 Arbeitshypothesen	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Probenentnahme	25
2.2 Zellkulturablauf	30
2.2.1 Zellkulturreagenzien/Nachweismaterialien	30
2.2.2 Kulturverfahren für humane Knochenzellen	32
2.3 Morphologische Untersuchungen	34
2.4 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase	34
2.5 Immunhistochemische Färbung für Osteocalcin	36

2.6	Analyse der Expression osteoblastärer Marker auf RNA Ebene	37
2.6.1	RNA-Isolierung	37
2.6.2	Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription)	39
2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.6.4	Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel	40
2.7	Statistische Datenanalyse	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Verweildauer im Knochenfilter	43
3.2	Zellproliferation	43
3.3	Morphometrische Analyse	47
3.3.1	Partikelgrösse	47
3.3.2	Partikelform	50
3.4	Zellcharakterisierung	51
3.4.1	Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase	51
3.4.2	Analyse der Expression osteoblastärer Marker auf RNA Ebene	52
3.4.3	Immunhistochemische Färbung für Osteocalcin	53
4	DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	61
7	DANKSAGUNG	65
8	LEBENS LAUF	66

Abkürzungen

AEC,	Aminoethylcarbazol
Aqua dest,	destilliertes Wasser
AP,	alkalische Phosphatase
bp,	Basenpaare
DMEM,	Dulbecco`s modified Eagle medium
DNA/DNS,	Desoxyribonukleinsäure
DNase,	Desoxyribonuklease
EDTA,	Ethylenediaminetetraacetic acid
GTC,	Guanidiniumthiocyanat
HPRT,	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Hz,	Hertz
Ig,	Immunoglobulin
MK,	metallische Kugelfräse
mm,	Millimeter
μ,	micro
OC,	Osteocalcin
Ok,	Oberkiefer
PBS,	Phosphate Buffered Saline
PCR,	Polymerase chain reaction/Polymerase-Kettenreaktion
PS,	Piezosurgery [®]

RNA/RNS, Ribonukleinsäure

RNase, Ribonuklease

RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Uk, Unterkiefer

W, Watt

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, Mihaela und Ion Anghel, für ihre grenzenlose Liebe, stetige Unterstützung und Rückhalt während meines Studiums, lange Zeit davor und immer noch...

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeiner Hintergrund

Die Weiterentwicklung chirurgisch-augmentativer Verfahren, der Fortschritt im Bereich der Technik und die Einführung neuer Materialien ermöglichen heutzutage eine implantat-prothetische Rehabilitation auch in Grenzsituationen bei nicht ausreichendem Knochenangebot. Somit ist die moderne Zahnheilkunde dem Prinzip der *restitutio ad integrum* durch implantatgetragene und implantatgestützte Rekonstruktionsmöglichkeiten recht nahe gekommen. Darüber hinaus wurde das Augenmerk auf eine „Biologisierung“ der chirurgischen Verfahren verlagert. Die Zielsetzung der Verwendung schonender Operationstechniken und Augmentationsmaterialien mit hoher Biokompatibilität können zu einem harmonischen und verkürzten Operations- und Heilungsverlauf und einer Risikominimierung für den Patienten führen. Aktuelle klinische Untersuchungen konnten zeigen, dass mit der Aufwändigkeit und somit Invasivität der oralchirurgischen Eingriffe auch die Gefahr der postoperativen Morbidität wächst (Nkenke *et al.*, 2001; Capelli, 2003). Dies wird durch viele Operationsparameter beeinflusst, wobei dem gewählten Zugang zum Hartgewebe große Bedeutung zukommt. Zu berücksichtigen sind hierbei Komplikationen wie intraoperative Nervverletzungen mit Auftreten von Par- und Anästhesien, Perforationen der Schneiderschen Membran während der Sinusbodenaugmentation oder Verletzungen der Blutgefäße mit dem Entstehen profuser Blutungen.

Die Ultraschallchirurgie bietet sich als eine schonende Alternative der Hartgewebschirurgie an (Vercellotti *et al.*, 2001; Lambrecht, 2004; Siervo *et al.*, 2004). Frühe tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass der Heilungsprozess im Knochen bei Präparation mit einem chirurgischen Ultraschallgerät nicht nur komplikationslos verläuft, sondern den für andere Präparationsinstrumente (Metallfräse, Meißel) beschriebenen Heilungsabläufen überlegen ist (McFall *et al.*, 1961; Horton *et al.*, 1975; Horton *et al.*, 1981). Wenngleich der Reaktion des Knochenlagers auf die Ultraschallchirurgie zahlreiche *in vitro* und tierexperimentelle Untersuchungen gewidmet wurden, liegen bis zu diesem Zeitpunkt keine Studien über die Qualität des mit Hilfe eines Ultraschallgerätes gewonnenen autologen Augmentationsmaterials vor.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, das ultraschallbasierte Verfahren zur Gewinnung autologer Knochenspäne mittels Anwendung eines neuartigen Ultraschallgerätes (Piezosurgery[®], Mectron Medical Technology, Carasco, Italy) zur Knochenspangewinnung demjenigen durch rotierende metallische Kugelfräsen (**MK**) bezüglich Spanmorphologie und Zellvitalität gegenüberzustellen.

1.2 Aktuelle Augmentationsverfahren in der zahnärztlichen Chirurgie

Die erfolgreiche Insertion enossaler Implantate und die damit verbundene Gewährleistung einer implantat-prothetischen Rehabilitation setzt primär ein ausreichendes Knochenangebot voraus. Wenn diese Bedingung nicht erfüllt ist, muss auf augmentative Verfahren zurückgegriffen werden. Zu den häufigsten

Ursachen für das Entstehen eines primär nicht implantationsfähigen Knochenlagers zählen neben physiologisch ablaufenden Resorptionsvorgängen der Kiefer nach Zahnverlust insbesondere genetische oder entwicklungsbedingte Defekte, sowie der Zustand nach Trauma, Infektionen oder Tumorresektion. Zur Rehabilitation stehen verschiedene Therapieansätze zum Hartgewebsersatz in Kombination mit Implantaten zur Verfügung. Hierbei sind vor allem augmentative Verfahren unter Verwendung von Knochentransplantaten und Knochenersatzmaterialien zu erwähnen (Donos *et al.*, 2002; Hallman *et al.*, 2002; Turunen *et al.*, 2004). Weitere neuere Alternativen stellen die Distraktionsosteogenese, die Verwendung plättchenreichen Plasmas und das *tissue engineering* dar. Unabhängig von der verwendeten Technik muss das Augmentat reizlos in den Organismus integriert werden, damit eine erfolgreiche knöcherne Regeneration erfolgen kann.

Die **Charakteristika** eines Augmentationsmaterials können wie folgt definiert werden (**Abb. 1**):

- 1. Osteokonduktion:** das Augmentat sollte eine Leitstruktur für das zu regenerierende Gewebe darstellen und somit eine Auffüllung des Defektes ermöglichen.
- 2. Osteoinduktion:** bezieht sich auf die Fähigkeit eines Biomaterials, die Knochenneubildung zu fördern; diese Eigenschaft wird von den wachstumsinduzierenden Proteinen (Bone morphogenetic proteins) getragen, unter deren Einwirkung sich die pluripotenten Mesenchymzellen in knorpel- und knochenbildende Zellen differenzieren.

3. Osteopromotion: Erleichtern bzw. Fördern des Knochenwachstums.

4. Osteogenese: Fähigkeit der im Transplantat überlebenden Osteoblasten, neuen Knochen zu bilden (gültig nur bei autogenen Knochentransplantaten).

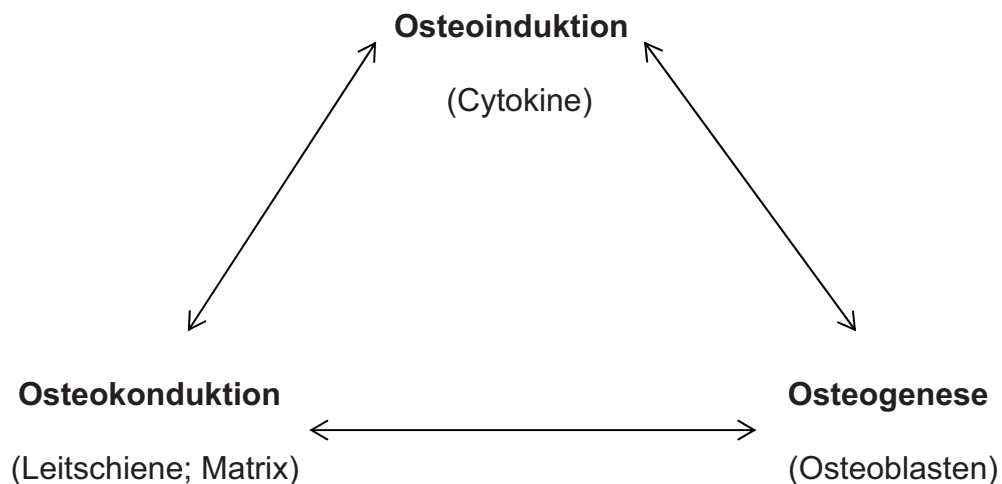


Abbildung 1 Die Wirkungsweise autogener Knochentransplantate beruht auf drei Mechanismen: Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenese.

Aufgrund seiner osteogenetischen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften stellt das autogene Knochentransplantat bislang den Goldstandard unter den Augmentationsmaterialien dar (Nkenke *et al.*, 2001; Springer *et al.*, 2004). Die autogene Herkunft verhindert außerdem Übertragungen von Infektionskrankheiten sowie immunologische Reaktionen. Mögliche intraorale Spenderregionen sind die Kinnsymphyse, der Kieferwinkel, der Unterkieferrand, die Retromolarregion sowie die *tori mandibulae*. Wenn größere Mengen an autologem Knochenaugmentat benötigt werden, stehen extraorale Entnahmestellen wie Schädelkalotte, Beckenkamm oder Rippe als Spenderregionen zur Verfügung. Bei

der Wahl einer intra- oder extraoralen Entnahmestelle für das Knochenaugmentat sollten folgende **Kriterien** beachtet werden:

- a) die Ausdehnung des Defektes;
- b) die Menge an vorhandenem Knochen in der Spenderegion und
- c) die *Compliance* des Patienten (Chiapasco *et al.*, 1999).

Somit kann die Kinnsymphyse als Spenderegion gewählt werden, wenn der zu versorgende Defekt den Abstand von 3 Zähnen nicht überschreitet, wenn keine Implantate in der Interforaminalregion gesetzt werden müssen, sowie wenn ein ausreichender Abstand zwischen den Wurzelspitzen der unteren Frontzähnen und dem Unterkieferrand vorhanden ist. Als Nachteile dieser Entnahmelokalisation sind die Beeinträchtigung der superfiziellen sensorischen Funktion mit Hypo-oder Hyperästhesien mit nur partieller Remission 12 Monate postoperativ sowie ein Vitalitätsverlust der Unterkiefer (UK)-Frontzähne zu erwähnen (Chiapasco *et al.*, 1999; Nkenke *et al.*, 2001). Als risikoärmere Alternative hat sich der Retromolarbereich als Spenderegion etabliert. Hierbei waren keine signifikanten Schäden 12 Monate postoperativ anzutreffen (Chiapasco *et al.*, 1999; Nkenke *et al.*, 2002).

Die Gewinnung von extraoralen autologen Transplantaten hat als wichtigste Indikationsbereiche, neben der sekundären und tertiären Osteoplastik bei Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten, die Rekonstruktion von knöchernen Defekten nach Tumorresektion. Weiterhin sei die präprothetische Augmentation bei fortgeschrittener Kieferatrophie genannt. Hierbei wird am Häufigsten der Beckenkamm als Entnahmelokalisation für das Knochenaugmentat gewählt. Diesbezüglich können eine anteriore und eine posteriore Entnahmetechnik unterschieden werden. Bei einer Untersuchung zur Gegenüberstellung der anterioren

(*Spina iliaca anterior*) und posterioren (Beckenschaufel) Entnahmetechniken der autologen Beckenkammtransplantate haben Schenck und Mitarbeiter zeigen können, dass die posteriore Region ein 2- bis 3-fach größeres Spongiosavolumen bietet (Burchardt, 1987). Nachteilig ist hierbei die Notwendigkeit der intraoperativen Umlagerung des Patienten, mit Auswirkungen auf die Operationsdauer. Allgemein setzt die Entnahme von extraoralen Knochenaugmentaten eine Behandlung in Intubationsnarkose voraus und ist mit einer höheren Rate an postoperativer Morbidität verbunden.

1.2.1 Typen autologer Knochentransplantate

Autologe Knochentransplantate können in Form von Knochenblöcken (Neukam, 1990), Knochenespänen (Savant *et al.*, 2001; Chiriac *et al.*, 2004) oder einer Kombination von Knochenblöcken und Knochenespänen entnommen und eingesetzt werden (Tinti *et al.*, 1996; Chiapasco *et al.*, 1999; Lindorf, 2001, 2002). Die Knochenespäne können durch Zerkleinern der intra- oder extraoral entnommenen Knochenblöcke mit Hilfe einer Knochenmühle (Erpenstein *et al.*, 2001; Springer *et al.*, 2004) oder durch Einsatz einer Kugelfräse und eines Knochenfilters gewonnen werden (Tinti *et al.*, 1996; Lindorf, 2002; Young *et al.*, 2002; Blay *et al.*, 2003; Springer *et al.*, 2004). Das Konzept der kombinierten Verwendung eines oder mehrerer autologer kortikospongiöser Knochenblöcke im Zentrum des Defektes und von Knochenespänen in den marginalen Arealen hat sich als optimales Augmentationsverfahren erwiesen (Buser *et al.*, 1996). Dieser Ansatz basiert auf dem biologischen Prinzip, dass die kortikale Schicht des Knochenblocks mit bukkaler Orientierung zur Wiederherstellung einer neuen Kortikalis beitragen und eine exzellente Stabilität des Implantatbettes ermöglichen kann. Erkenntnisse aus der

Orthopädie (Burchardt, 1983) weisen darauf hin, dass die Kortikalis des transplantierten Knochenblockes eine langsame Revaskularisation und Umbauprozesse vorweist. Der spongiöse Teil des Transplantates und die Knochenspäne, beide lokalisiert zum angrenzenden Implantatbett, sorgen für eine schnelle Revaskularisation und einen reibungslosen Umbauvorgang (Burchardt, 1987).

1.3 Biologie des Knochenstoffwechsels: Charakterisierung der Osteoblasten durch spezifische osteoblastäre Marker

Die Forschung in den letzten Jahren hat durch die Isolierung und Charakterisierung der zellulären und extrazellulären Bestandteile der Knochenmatrix zur Identifikation von spezifischen molekularen Marker des Knochenstoffwechsels geführt, die entweder die Knochenneubildung oder den Knochenabbau widerspiegeln.

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

AP ist ein Enzym, das durch einen carboxyterminalen Glykanphosphatidylinositol-Anker an die extrazelluläre Oberfläche der Zellmembran geheftet wird (Gundberg, 2000; Seibel, 2000). Es sind mehrere Isoformen der AP beschrieben worden, die in Leber, Niere, Knochen und Plazenta synthetisiert werden, wobei die größte Bedeutung dem Leber-Nieren-Knochen-Typ zukommt. Den hepatisch und ossär gebildeten Isoenzymen liegt das gleiche Gen zugrunde, der einzige Unterschied bestehend im Grad der posttranslationalen Glykosylierung des Proteins. Die im Knochen gebildete AP ist an der Plasmamembran lokalisiert und wird von den

Osteoblasten als zweite Stufe in der Reifung während der Knochenapposition in großen Mengen synthetisiert (Garnero and Delmas, 1997). Somit spielt die AP eine entscheidende Rolle bei der Mineralisation der Knochengrundsubstanz. Hierbei ist ihre Kapazität, die Spaltung von Monophosphatester zu bewirken, von zentraler Bedeutung (Wlodarski and Reddi, 1986). Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus der AP bisher nur unvollständig geklärt ist, werden dem Enzym folgende mögliche Rollen im Mineralisationsprozess zuerkannt: Anstieg des anorganischen Phosphats, die Zerstörung der Inhibitoren des Hydroxylapatits, Transport von Phosphat, calciumbindendem Protein, Calcium und Magnesium-Adenosintri-phosphatase und eine tyrosinspezifische Phosphoproteinphosphatase-Aktivität (Whyte, 1994). Ein Defekt des Enzyms geht mit einer Hypomineralisation des Knochengewebes einher und führt zum Entstehen des Krankheitsbildes der Hypophosphatasie (Rathburn-Syndrom) (Whyte, 1994). Bei gesunden Erwachsenen tragen Leber und Knochen im gleichen Ausmaß zum Anstieg der Serum-AP bei. Eine quantitative Auftrennung der beiden Isoenzyme ist mittels chromatographischer Verfahren oder durch Lektinbildung möglich. Ausserdem kann eine quantitative Bestimmung der Aktivität der Knochen-AP mittels kinetischer Tests erfolgen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der spektrophotometrischen Bestimmung von p-Nitrophenol, entstanden durch die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat durch AP. p-Nitrophenol weist ein Absorptionsmaximum bei 405 nm auf und das gemessene Signal ist dem AP-Gehalt der Probe proportional (Hoegel *et al.*, 2004).

Die Aktivität der AP als spezifischer Marker der osteoblastären Aktivität wird auch bei der Induktion der heterotopischen Osteogenese erfasst. Hierbei wird die osteogene Potenz verschiedener epithelialer Strukturen wie dem Epithel der Harnröhre, humanes Amnion, aber auch neoplastischer Zelllinien oder viral modifizierter Fibroblasten untersucht (Wlodarski and Reddi, 1986).

Wenngleich die genaue Wirkungsweise der alkalischen Phosphatase nicht vollständig bekannt ist, kann zweifellos behauptet werden, dass dieser molekulare Marker am häufigsten in wissenschaftlichen Arbeiten als osteoblastärer Differenzierungsparameter verwendet wird (Wlodarski and Reddi, 1986; *Chiriac et al.*, 2004; Hoegel *et al.*, 2004; Springer *et al.*, 2004).

Ein anderer Parameter des Knochenanbaus ist das OC. Nach Kollagen ist OC das häufigste Knochenprotein und wird neben den Odontoblasten und hypertrophischen Chondroblasten primär von Osteoblasten synthetisiert (Gallop *et al.*, 1980; Garnero and Delmas, 1997). Das Enzym, ein 49-Aminosäureprotein, wird wegen seiner drei Vitamin-K-abhängigen Gamma-Carboxyglutaminsäure-Reste auch "Bone Gla Protein" genannt (Hauschka *et al.*, 1989). Reife Osteoblasten bilden OC kurz vor der Matrixniederlegung. Somit ist das Enzym ein später osteoblastärer Differenzierungsmarker. Der bedeutendste Anteil des synthetisierten OC wird in die Knochenmatrix eingelagert, wo es ca. 15% der nichtkollagenen Proteine ausmacht. Hierbei kommt es Vitamin-K-abhängig zu einer direkten Interaktion zwischen Hydroxylapatit und den Gla-Resten des OC (Gallop *et al.*, 1980). Auf diese Weise bleibt das OC in die Knochenmatrix integriert und wird von dort nur während Resorptionsvorgängen wieder freigesetzt. Ein kleiner Teil des OC gelangt in die Blutbahn und wird schnell inaktiviert (Hauschka *et al.*, 1989; Seibel, 2000).

1.4 Mögliche Nachteile der konventionellen Knochenspanentnahmemethoden

Autologe Knochenspäne können im Zuge oralchirurgischer Eingriffe einhergehend mit einer Osteotomie oder Osteoplastik mittels MK und Knochenfilter gewonnen werden. Die während der Knochenpräparation entstandenen Knochenpartikel werden abgesaugt und in einem in der Absauganlage eingegliederten Knochenfilter gesammelt. Nach erfolgter Implantation oder Präparation des zu augmentierenden Empfänger-Knochenbettes werden die Knochenspäne mit oder ohne Beimischung von Knochenersatzmaterialien appliziert und eventuell durch eine Membran abgedeckt.

Tierexperimentelle und klinische Studien weisen auf nachfolgende mögliche Nachteile der Entnahme autologer Knochenspäne mittels MK hin (Lundskog, 1972; Eriksson and Albrektsson, 1983; Nkenke *et al.*, 2001; Nkenke *et al.*, 2002; Clavero and Lundgren, 2003; Ercoli *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Hoegel *et al.*, 2004).

1.4.1 Übererwärmung des Knochens

Bei einer unzureichenden Kühlung kann es zu einem Temperaturanstieg im präparierten Knochen kommen, der zu einer lokalen Osteonekrose führen kann. Die Hauptgründe, die zu einem histodestruktiven Effekt durch Temperaturanstieg führen, sind die hervorgerufenen Veränderungen in der Proteinstruktur, der veränderte lokale Metabolismus, sowie Veränderungen in der enzymatischen Aktivität und in der Zusammensetzung der protoplasmatischen Lipide (Hoegel *et al.*, 2004). Bei einer näheren Betrachtung der Physiologie des Knochengewebes konnte festgestellt werden, dass eine Osteonekrose nach einer 5-minütigen Exposition bei 46°C auftritt.

Der Grund dafür besteht in der höheren Sensibilität der kleinen afferenten intraossären Blutgefäße, die durch den Temperaturanstieg zerstört werden. Dadurch wird die Ernährungsgrundlage des Knochens zerstört (Lundskog, 1972). Durch spezifische Untersuchungsmethoden ("thermal chamber") konnte ein Grenzwert für die thermische Osteonekrose bei 47°C und einer Expositionszeit von einer Minute festgelegt werden (Eriksson and Albrektsson, 1983). Andere tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass die Verwendung stumpfer Bohrer zu einem höheren Temperaturanstieg im präparierten Knochen führt (Ercoli *et al.*, 2004). Andererseits konnte gezeigt werden, dass klinisch schädliche Temperaturen ab einer Bohrtiefe von 15 mm feststellbar sind, und mit einer Abnahme der Bohreffizienz korrelieren (Garcia *et al.*, 2004).

1.4.2 Metallische Kontamination

Durch den Abrieb der metallischen rotierenden Instrumente, welche für die Präparation des Transplantatbettes verwendet werden, kann es zu einem Transfer von metallischen Partikeln in den ortsständigen Knochen und somit zu einer metallischen Kontamination kommen. Faktoren, die das Ausmaß der metallischen Kontamination bestimmen sind:

- die metallische Zusammensetzung der Fräse (Fräsen aus rostfreiem Stahl bewirken die geringste Kontamination, Fräsen aus Stahl und Tungstencarbid die höchste);
- der Zustand des Instrumentes: neue Fräsen führen zu einer 2-12 Mal größeren Kontaminationsrate als die älteren; bei der ersten Bohrung wird der bedeutendste metallische Abrieb im Knochen zurückgelassen (Hobkirk and Rusiniak, 1978).

Effekte der metallischen Kontamination sind das Auftreten elektrischer Potentiale im Knochen (Hobkirk and Rusiniak, 1978), das Hervorrufen struktureller Veränderungen im Knochen und das Entstehen toxischer Effekte auf lebende Zellen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch geringe Mengen metallischer Kontamination (im μg Bereich) als Korrosionszentren am Implantat wirksam sein können (Hickman *et al.*, 1958; Ferguson *et al.*, 1960; Grasser, 1972).

1.4.3 Mögliche Verletzungen der benachbarten Weichgewebsstrukturen

Während des Entnahmeverfahrens des autologen Knochens im Rahmen oralchirurgischer Augmentationen mittels rotierender Instrumente kann es zu Schädigungen der benachbarten Weichgewebsstrukturen kommen. Vor allem bei Entnahme autologer Knochenblöcke von intraoralen Lokationen (v.a. Kinn und retromolar im Unterkiefer) wurde über eine mögliche Verletzung des Nerven mit konsekutivem Auftreten von Sensibilitätsstörungen in den versorgten Bereichen berichtet (Nkenke *et al.*, 2001; Nkenke *et al.*, 2002; Clavero and Lundgren, 2003). Andererseits ist die Perforation der Schneiderschen Membran als mögliche auftretende Komplikation im Zuge der Präparation des Knochenfensters in schwierigen klinischen Situationen, z.B. während des Eingriffs zur Kieferhöhlenbodenaugmentation in Betracht zu ziehen, mit dem Risiko einer Infektion der Kieferhöhle. Nicht zu vernachlässigen ist weiterhin die mittels rotierender Instrumente akzidentell hervorgerufene Eröffnung von Blutgefäßen, mit Auftreten intraoperativer intraossärer- oder Weichgewebsblutungen.

1.5 Aufbau und Funktionsprinzip der chirurgischen Ultraschallinstrumente

Das Prinzip der chirurgischen Ultraschallinstrumente basiert auf der Umwandlung eines Ultraschallsignals in mechanische Vibrationen durch Einsatz einer magnetostriktiven Methode. Diese Kategorie chirurgischer Instrumente bietet den Vorteil der lokalen Blutstillung auf Grund der physikalischen und chemischen Auswirkungen des Ultraschalls. Ein Ultraschallinstrument ist aus einem Generator, einem Signalumwandler und einem Wellenleiter zusammengesetzt (**Abb. 2**).

Der Ultraschall-Generator erzeugt ein hochfrequentes Ultraschallsignal. Der Signalumwandler wandelt dieses Signal in eine mechanische Vibration um. Durch den Wellenleiter kann die erzeugte mechanische Energie an dem aktiven Ansatz des Instrumentes konzentriert und amplifiziert werden.

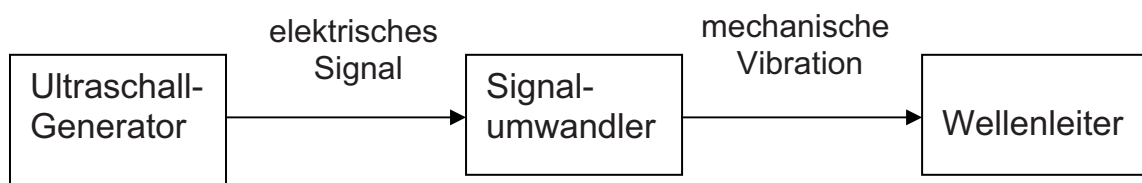


Abbildung 2 Funktionsprinzip der chirurgischen Ultraschallinstrumente.

Beim Weiterleiten der Ultraschallwelle durch biologische Strukturen werden physikalische und chemische Prozesse in diesen ausgelöst. So kommt es zu einem Aneinanderhaften und Erstarren der Blutzellen, wenn beispielsweise eine Ultraschallwelle Blutgefäßwände durchläuft, während das Plasma weiterfließt. Dieser Kavitationseffekt beschreibt somit eine Variation der Impedanz der Blutgefäße der zu einer höheren Kompressibilität der biologischen Flüssigkeiten führt (Sun *et al.*,

1997). Demzufolge haben chirurgische Ultraschallinstrumente auch einen hämostatischen Effekt.

Eine Metaanalyse mehrerer tierexperimenteller Studien zur Untersuchung verschiedener klinischer und operationstechnischer Parameter zum Einsatz des klassischen Skalpells, der Elektrochirurgie und der chirurgischen Ultraschallinstrumente ergab folgende Ergebnisse (**Tabelle1**):

Tabelle 1 Vergleichende Zusammenfassung der Effizienz des klassischen Skalpells, der Elektrochirurgie und chirurgischer Ultraschallinstrumente bezogen auf verschiedene klinische und operationstechnische Parameter.

Chirurgisches Instrument	SKALPELL	ELEKTRO-CHIRURGIE	CHIRURGISCHE ULTRASCHALL-INSTRUMENTE
Inzisionsgeschwindigkeit	++ ^A	+	+
Kontrolle der Inzisionstiefe	++	-	+
Blutstillender Effekt	-	++	+
Auftreten einer Embolie	-	-	-
Präzision der Inzision	++	-	+
Rehabilitationsvermögen	++	-	+
Effizienz im Knochen	-	-	++

nach Daten von Dong Sun *et al*, 1997

^A '+', Effekt vorhanden; '++' Effekt besonders ausgeprägt vorhanden; '-', Effekt nicht vorhanden

1.6 Einsatz des Ultraschalls in der allgemeinen Chirurgie

Die Ultraschalltechnik wurde in der allgemeinen Chirurgie als Alternative zum klassischen Skalpell mit der Zielsetzung eingeführt, eine hohe Präzision der Schnittführung bei einer geringeren intraoperativen Blutung zu gewährleisten. Gleichzeitig sollte das durch die Elektrochirurgie hervorgerufene thermische Gewebetrauma reduziert werden. Das beim harmonischen Skalpell angewandte Ultraschallsystem wandelt die vom Generator bereitgestellte elektrische Energie in mechanische Energie um. Der aktive chirurgische Ansatz des Instrumentes weist eine longitudinale Vibration auf. Diese longitudinale Bewegung der Klingen führt zu einer Vibration der Kollagenmoleküle und somit zu deren Denaturierung und der Bildung eines Blutkoagulums.

Als Einsatzbereiche der Ultraschalltechnik in der allgemeinen Chirurgie sind die Entfernung benigner Tumoren der biliären und pankreatischen Regionen, chirurgische Eingriffe an der Leber, Splenektomien, Cholecystektomien, Nephrektomien, Nissen Fundoplikation, laparoskopische Lymphadenektomie oder die Entnahme der Radialisarterie im Rahmen der koronaren Bypasschirurgie zu erwähnen (Psacioglu *et al.*, 1998; Gertsch *et al.*, 2000; Takao *et al.*, 2000; Murat *et al.*, 2006).

In einer tierexperimentellen Studie wurden bei chirurgischen Eingriffen am Pankreas das klassische Skalpell, die Elektrochirurgie sowie das harmonische Skalpell bezüglich ihres hämostatischen Effektes gegenübergestellt (Takao *et al.*, 2000). Das Verwenden des harmonischen Skalpells führte zu einer signifikant geringeren Blutungsneigung als die anderen Methoden. Darüber hinaus konnte in der

histologischen Analyse des mit den drei chirurgischen Ansätzen behandelten pankreatischen Gewebes festgestellt werden, dass das harmonische Skalpell eine geringere Gewebeschädigung als die Elektrochirurgie verursachte. Das klassische Skalpell hatte den geringsten histodestruktiven Effekt. Eine klinische Studie derselben Arbeitsgruppe umfasste 50 Patienten, bei denen chirurgische Eingriffe der bilio-pankreatischen Region mittels harmonischen Skalpells durchgeführt wurden. Folgende Vorteile dieser Methode wurden festgestellt:

- i) der optimale hämostatische Effekt, wobei eine Ligatur der entstandenen resezierten Stümpfe nicht erforderlich war;
- ii) keine Fistelbildung nach pankreatischer Rekonstruktion;
- iii) einfache Identifizierung und Aufrechterhaltung der Funktion des *Ductus pancreaticus*.

Eine andere klinische Studie bezüglich des ultraschallbasierten Einsatzes in der hepatischen Chirurgie der Gruppe von Gertsch *et al.* konnte feststellen, dass das harmonische Skalpell eine effiziente Durchtrennung des hepatischen Parenchyms gewährleistete (Gertsch *et al.*, 2000). Zudem hat es sich hierbei als effizientes Werkzeug zur Blutstillung und zur präzisen Schnitfführung in intrahepatischen Strukturen erwiesen.

Die Anwendung des harmonischen Skalpells in der koronaren Bypasschirurgie führte einerseits zu einer Reduktion der Entnahmezeit der Radialisarterie und zu einer Verminderung der Frequenz der arteriellen Spastik und andererseits, dank der guten Hämostase, zu einer Reduktion der notwendigen Anzahl arterieller clips (Psacioglu *et al.*, 1998).

1.7 Einsatz des Ultraschalls in der Zahnheilkunde/ zahnärztlichen Chirurgie

Horton beschrieb das Prinzip der zahnmedizinischen Ultraschallinstrumente als “vibration of a slurry of particles between the tip of the instrument and the tooth surface” (Vibration einer zähflüssigen Partikelmasse zwischen der Ansatzspitze und der Zahnoberfläche) (Horton *et al.*, 1981).

Die Verwendung von Ultraschallinstrumenten in der Zahnmedizin wurde zum ersten Mal von Balamuth *et al.* im Jahr 1952 zur Kavitätenpräparation eingesetzt. Für diesen Therapieansatz wurden im Laufe der Zeit die rotierenden Instrumente populärer. Der bislang ultraschallbasierte Bohrer wurde dann dem Entfernen der harten und weichen Beläge von Kronen- und Wurzeloberflächen angepasst. Dieser heute am weitesten verbreitete Einsatz der Ultraschalltechnik in der Zahnmedizin hat sich auf dem Gebiet der zahnärztlichen Prophylaxe und Parodontologie bewährt (Kocher *et al.*, 1996; Drisko *et al.*, 2000; Lea *et al.*, 2003).

In der zahnärztlichen Chirurgie wird die Ultraschalltechnik im Rahmen oralchirurgischer Eingriffe für Wurzelspitzenresektionen verwendet. Hierbei wird nach Abtrennen der Wurzelspitze eine präzise, retrograde Präparation des Wurzelkanals mittels Ultraschallinstrumentarium durch speziell angepasste Ansätze gewährleistet. Damit werden die Voraussetzungen für das Realisieren eines dichten retrograden Verschlusses gesichert und dadurch die Rezidivrate der apikalen Parodontitiden reduziert (Carrotte, 2005; Taschieri *et al.*, 2005).

Die Ultraschalltechnik findet ihre Anwendung auch in der oralen Knochenchirurgie. Dadurch sollen Effekte der rotierenden Instrumente vermieden werden, die einen nachteiligen Einfluss auf den ossären Heilungsprozess haben. Dies sind vor allem das thermische und mechanische Gewebetrauma und die durch den Abrieb verursachte Kontamination mit metallischen Partikeln. Tierexperimentelle Studien untersuchten vom radiologischen und histologischen Standpunkt aus die ossären Heilungsabläufe nach Präparation mit rotierenden Instrumenten und Ultraschalltechnik (McFall *et al.*, 1961; Horton *et al.*, 1975). Obgleich die Präparation mit rotierenden Instrumenten eine regelmäßiger Knochenoberfläche hinterließ, war der Heilungsprozess im Falle der Ultraschallpräparation kürzer und komplikationsloser. Die osteoblastäre Aktivität ist in diesem Fall höher, die Reifung des Knochens erfolgt schneller (Horton *et al.*, 1975). In einer klinischen Studie bezüglich des Einsatzes der Ultraschallinstrumente in der oralen Knochenchirurgie kamen die Autoren zu dem Schluß, daß hierbei:

- i) eine minimale intraoperative Blutung,
- ii) ein komplikationsloser Heilungsprozess,
- iii) geringe intra- und postoperative Beschwerden und eine sehr gute Patientenakzeptanz gewährleistet werden konnten (Horton *et al.*, 1981).

Der Einsatz der Ultraschalltechnik in der oralen Knochenchirurgie wurde durch experimentelle Untersuchungen und klinische Beobachtungen sowohl in technischer als auch biologischer Hinsicht optimiert. Ein wichtiger Moment der Weiterentwicklung der ossären Ultraschallchirurgie war die Entwicklung der Piezochirurgie.

1.8 Prinzip der Piezochirurgie; der Piezoeffekt

Der „Piezoeffekt“ umfaßt komplexe physikalische Phänomene, die Wechselwirkungen der grundlegenden physikalischen Größen Feldstärke, Polarisation, Spannung und Dehnung in kristallinen Festkörpern beinhalten (Cady, 1964). Der Begriff «piezo» stammt ursprünglich aus dem Griechischen «piedein» und bedeutet «drücken». Bereits 1880 entdeckten die französischen Physiker Jaques und Pierre Curie den Piezoeffekt, der sich als Komplex zweier komplementärer Phänomene, des direkten und indirekten Piezoeffekts, erwies.

Der direkte Piezoeffekt bezieht sich auf das Bestreben einiger Festkörper (anisotroper Kristalle), unter Oberflächenapplikation äusserer Kräfte durch eine Verschiebung der Ladungszentren eine oberflächliche Potentialdifferenz zu bilden (Ballato, 1995; Bogdanov, 2002). Hierbei ist zu bemerken, dass es im Falle eines Piezo-Materials bei einer äußeren Krafteinwirkung zu einer Verschiebung der internen Ladungszentren δ^+ und δ^- und zur Entstehung einer Potentialdifferenz an der Oberfläche kommt. Dies ist bei symmetrischen und homogenen Ionenkristallen nicht der Fall. Entscheidend für den piezoelektrischen Effekt ist demzufolge einerseits die kristalline Struktur der Werkstoffe und andererseits die Verschiebbarkeit der positiven und negativen Ladungen einer Elementarzelle gegeneinander (Anisotropie) (Service, 1997).

Der indirekte Piezoeffekt beschreibt die Verformung der Kristalle im elektrischen Feld. Auch in diesem Falle ist die Polarisation der Moleküle von entscheidender Bedeutung.

Die klinische Umsetzung dieses dynamischen Effektes erfolgt durch das Transferieren der longitudinalen und transversalen Ferroelektrika in eine chirurgische Schneideleistung.

1.9 Anwendungsbereiche und Einstellungsparameter des piezoelektrischen Gerätes

Eine Weiterentwicklung der Ultraschalltechnik in der Zahnmedizin mit Anwendung in der oralen Hartgewebeschirurgie erfolgte durch Vercellotti, der 1998 ein neuartiges Gerät, Piezosurgery[®] (Mectron Medical Technology, Italien), einführte (Vercellotti *et al.*, 2001; Vercellotti, 2004). Die neue Technik basiert auf den dreidimensionalen Mikroschwingungen spezieller Ansätze im Ultraschallbereich und wird neben dem oralchirurgischen Bereich auch für Eingriffe in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Orthopädie, Neurochirurgie und Tiermedizin empfohlen. Die hierbei angewandte modulierte Schwingungsfrequenz beträgt 29.000 Hz und die Vibrationsamplitude ist innerhalb eines Intervalls von 60 bis 200 µm regelbar, die optimal auf mineralisiertes Gewebe eingestellt ist (Siervo *et al.*, 2004; Vercellotti, 2004). Das Leistungsspektrum des Geräts ist von 2,8 bis 16W variierbar. Was die Schnittgeschwindigkeit betrifft, kann ein Wert von 24 000 m/s erreicht werden. Um eine Übererwärmung des Knochens während der Präparation zu vermeiden, wird während der gesamten Anwendungsdauer eine Kühlung mittels Kochsalzlösung durch eine eingebaute Pumpe gewährleistet.

Die Vorteile der piezoelektrischen Einheit werden im folgenden beschrieben:

- Hartgewebe Selektivität. Aufgrund der modulierten Ultraschallfrequenz ist das Gerät ideal für die Chirurgie des mineralisierten Gewebes. Im Weichgewebe ist das Gerät inaktiv. Somit können benachbarte Weichgewebsstrukturen wie Nerven, Gefäße oder die Schneidersche Membran im Rahmen einer Sinusbodenelevation nicht verletzt werden. Diese Eigenschaft macht das

Gerät ideal für die Anwendung an den Übergangsoberflächen zwischen Weich- und Hartgewebe;

- Der benötigte Kräfteinsatz im Falle des piezoelektrischen Gerätes ist deutlich geringer als im Falle von rotierenden Instrumenten, da hierbei keine rotierenden Bewegungen, die eine Gegensteuerung erforderlich machen, eingesetzt werden müssen;
- Die Schnittführungspräzision ist maximal (ab 100 µm);
- Die Gewährleistung eines blutarmen Operationsfeldes, gesichert durch den Kavitationseffekt;
- Sicherheit vor dem Abrutschen;
- Patientenfreundlichkeit.

Die Nachteile dieser Methode sind:

- Der relativ hohe Zeitaufwand durch die längere Operationsdauer;
- Die höheren Anschaffungskosten;
- Die schwierigere Präparation in Regionen mit begrenztem Zugang (posteriore Regionen einer Le Fort Osteotomie) (Eggers *et al.*, 2004).

Das Indikationsspektrum der piezoelektrischen Chirurgie umfasst folgende Bereiche (Siervo *et al.*, 2004; Vercellotti, 2004; Gruber, 2005; Stubinger *et al.*, 2005; Hoigne *et al.*, 2006; Kotrikova *et al.*, 2006):

1. Parodontologie:

- resektive Eingriffe;
- chirurgische Kronenverlängerung;

2. Implantologie:

- Sinusbodenelevation;
- *Split crest*;
- Knochengewinnung (Blöcke, Späne).

3. Allgemeine Oralchirurgie:

- operative Zahntfernung;
- Wurzelspitzenresektionen;
- sagittale Splittosteotomien im Rahmen der orthognathen Chirurgie.

4. Allgemeine Chirurgie:

- kraniale Osteoplastiken;
- korrektive Chirurgie der Handknochen (*Ossa digitorum manus* und *Ossa carpi*).

Das piezoelektrische Gerät hat unterschiedliche **Einstellungsparameter**, angepasst an den durchzuführenden oralchirurgischen Eingriff:

„**mode low**“ für Wurzelspitzenresektionen,

„**mode high**“ angewandt bei Sinusbodenelevationen,

„**mode boosted**“ speziell vorgesehen für die Knochenchirurgie. Hierbei führt eine digitale Modulierung der Oszillationen zu einer Alternation von Vibrationen hoher Frequenz mit kurzen Pausen beim Erreichen von 30 Hz. Diese Alternation beugt einer Impaktierung des Ansatzes im Knochen vor und vermeidet eine Überwärmung des Knochens bei optimaler Schneidekapazität.

1.10 Arbeitshypothesen

Ziel der vorliegenden Studie war es, das ultraschallbasierte Verfahren zur Gewinnung autologer Knochenspäne mittels Anwendung eines neuartigen Ultraschallgerätes (Piezosurgery[®], Mectron Medical Technology, Carasco, Italy) der Knochenspangewinnung durch rotierende MK bezüglich Spanmorphologie, Zellvitalität und Zelldifferenzierung gegenüberzustellen.

Unsere Arbeitshypothese war es, dass die durch Piezosurgery[®] entstandenen Mikrovibrationen einen schädlichen, irreversiblen Einfluss auf die Vitalität der entnommenen Knochenspäne haben könnten, so dass diese für ein autologes Transplantat nicht geeignet sein könnten.

Es standen folgende Fragen zur Untersuchung:

1. Sind die durch beide Methoden gewonnenen Knochenspäne nach der Sammlung im Knochenfilter noch vital?
2. Hat der Ultraschallschaber einen Einfluss auf die osteogene Potenz der Späne?
3. Existieren Unterschiede hinsichtlich der Proliferation und Zelldifferenzierung in Abhängigkeit von der chirurgischen Präparationsmethode?
4. Sind Unterschiede in der Anwachszeit der Osteoblasten bezüglich Patientenalter, Entnahmelokalisation und Entnahmemethode festzustellen?

2 Material und Methoden

2.1 Probenentnahme

In die Studie wurden insgesamt 69 Patienten (30 männlich und 39 weiblich), mit einem Alter zwischen 18 und 65 Jahre (mittleres Alter von 39 ± 16.5 Jahren) aufgenommen. Bei allen Patienten waren medizinisch notwendige oralchirurgische Eingriffe einhergehend mit Osteotomien vorgesehen. Dazu zählten operative Weisheitszahnentfernungen, Wurzelspitzenresektionen und Implantatinsertionen. Alle Patienten wurden mindestens 24 Stunden zuvor über Studienzweck und –verlauf aufgeklärt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Referenznummer : 2505/ 2004 „Verwendung von mittels Knochenfilter gewonnenen Knochenspänen aus oralchirurgischen Eingriffen“). Die Teilnahme an der Studie geschah freiwillig nach vorab erfolgter Unterzeichnung einer Probandeneinverständniserklärung.

Einschlußkriterien für die Studienteilnahme:

- geplanter standardisierter oralchirurgischer Eingriff
- guter Gesundheitsstatus
- keine systemischen Erkrankungen wie schwere Stoffwechselerkrankungen, Osteopathien und akute oder chronische Infektionserkrankungen
- Mindestalter von 18 Jahren
- Keine Schwangerschaft bei Patientinnen
- Nichtraucher

Studiengruppen

Nach Aufnahme in die Studie erfolgte eine randomisierte Zuordnung der Patienten zu einer der folgenden Gruppen:

- a) Behandlung mit einem piezoelektrischen Gerät (Testgruppe), Knochenpräparation mittels Piezosurgery[®] (Mectron Medical Technology, Carasco, Italien) (PS, n=33), oder
- b) Konservativ behandelte Gruppe (Kontrollgruppe), Knochenpräparation mittels MK (n=36) (**Abb. 3**).

Die Knochenspäne wurden bei den Knochenabtragungen entnommen (**Abb. 4**) und in einem in die Absauganlage zwischengeschalteten Knochenfilter (KF-T2, Schlumbohm, Brockstedt) (**Abb. 5**) gesammelt. Der Knochenfilter war mit einem Edelstahl-Sieb mit einem Porendurchmesser von 300 µm ausgestattet.

Das piezoelektrische Gerät wurde nach den Anweisungen des Herstellers angewendet (mode boosted, pump 5, burst C) mit einem speziell für Knochenspanpräparation vorgesehenen Ansatz. Der Einstellungsmodus „mode boosted“ beinhaltet eine digitale Modulierung der Oszillationen, die zu einer Alternation von Vibrationen hoher Frequenz mit kurzen Pausen bei Erreichen von 30 Hz führt. Diese Alternation beugt einerseits einer Impaktierung des Ansatzes im Knochen vor. Andererseits wurde durch sie eine Übererwärmung des Knochens bei optimaler Schneidekapazität vermieden.

Um eine Kontamination der Proben durch Speichel und Blut vorzubeugen, wurden zwei Sauger verwendet: der eine Sauger wurde für Speichel- und Blutabsaugung verwendet, während der andere, in dessen System ein Knochenfilter integriert war, ausschliesslich während der Knochenpräparation eingesetzt wurde. Der an den Knochenfilter angeschlossene Sauger wurde während der Osteotomien so nahe wie

möglich an den Ansatz des piezochirurgischen Gerätes oder der Kugelfräse gehalten, um die anfallenden Knochenspäne abzufangen und die Speichelaspiration auf ein Minimum zu reduzieren. Zudem wurde dieser Sauger regelmäßig mit steriler Kochsalzlösung gespült, um ein Eintrocknen der sich im Filter befindlichen Späne zu vermeiden.

Die Verweildauer der Knochenspäne im Knochenfilter (Zeitspanne zwischen erstem Entnahmepunkt und Übertragung ins Röhrchen) wurde mit einer Stoppuhr gemessen und dokumentiert.

Der Knochenfilter wurde unter aseptischen Bedingungen geöffnet.

Die Späne wurden mit einem sterilen Spatel aus dem Filter entfernt und von jeder Probe wurden Knochenspäne auf zwei Röhrchen aufgeteilt:

- ein Teil der Späne wurde in ein Röhrchen mit Kulturmedium eingebracht;
- ein Teil der Knochenspäne war für histomorphometrische Messungen vorgesehen und wurde in ein Röhrchen mit Formalin gefüllt.

Die restlichen Knochenspäne wurden verworfen.

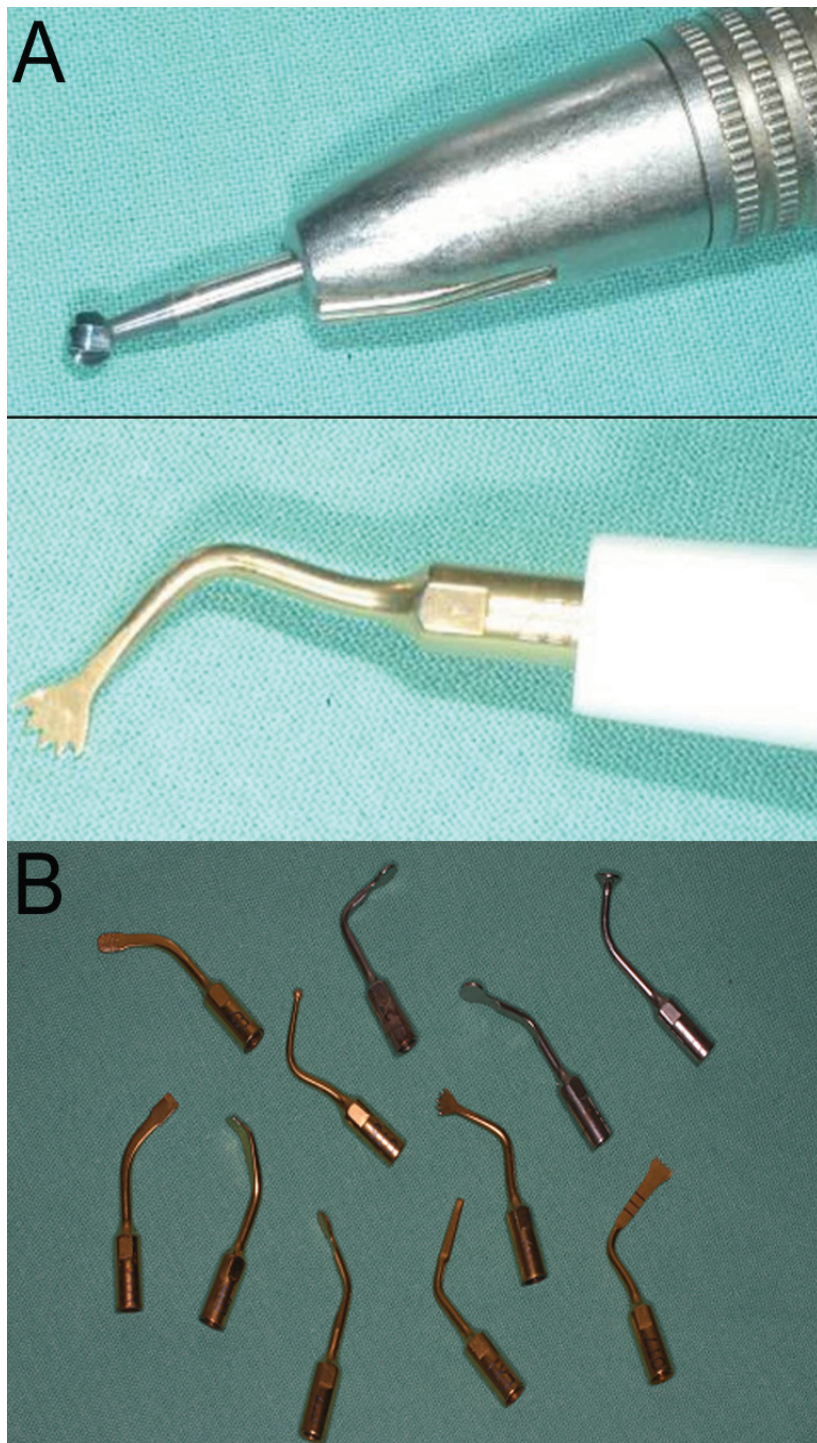


Abbildung 3 Gegenüberstellung der zwei Entnahmemethoden. (A) konventionelle Kugelfräse (oben) und Piezosurgery® (unten). (B) Darstellung der verschiedenen Ansätze des piezoelektrischen Geräts. Unterschiedliche Ansatzformen und -größen werden von dem Hersteller für verschiedene Anwendungsbereiche zur Verfügung gestellt.

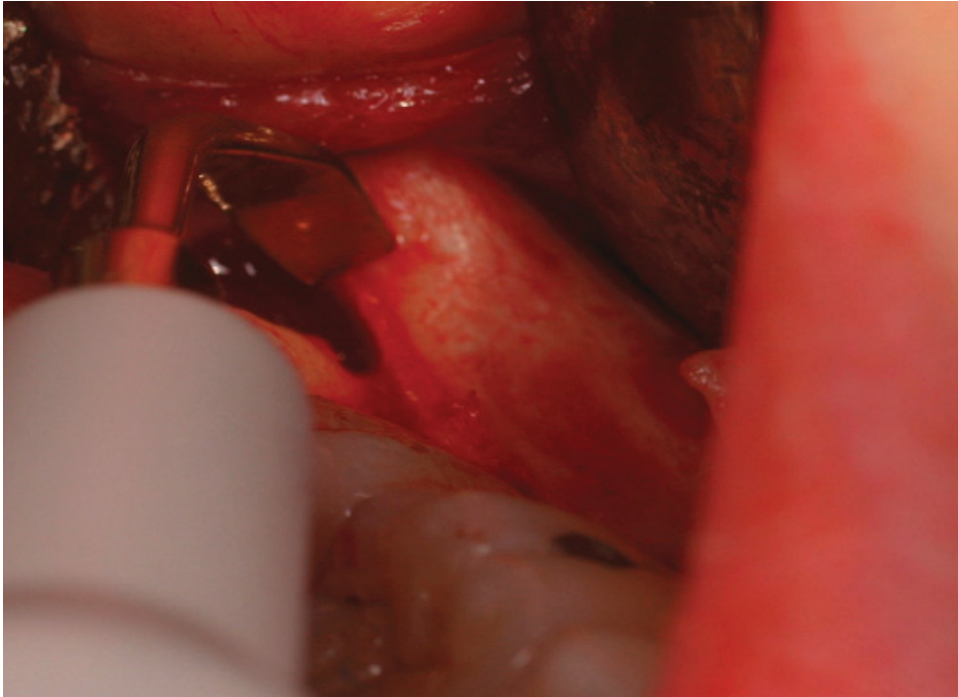


Abbildung 4 Intraoperativer Einsatz des Piezoschabers- retromolare Knochenspangewinnung im Zuge einer operativen Weisheitszahnentfernung. Die angewinkelte Form des Ansatzes vereinfachte den Zugang in der retromolaren Region.

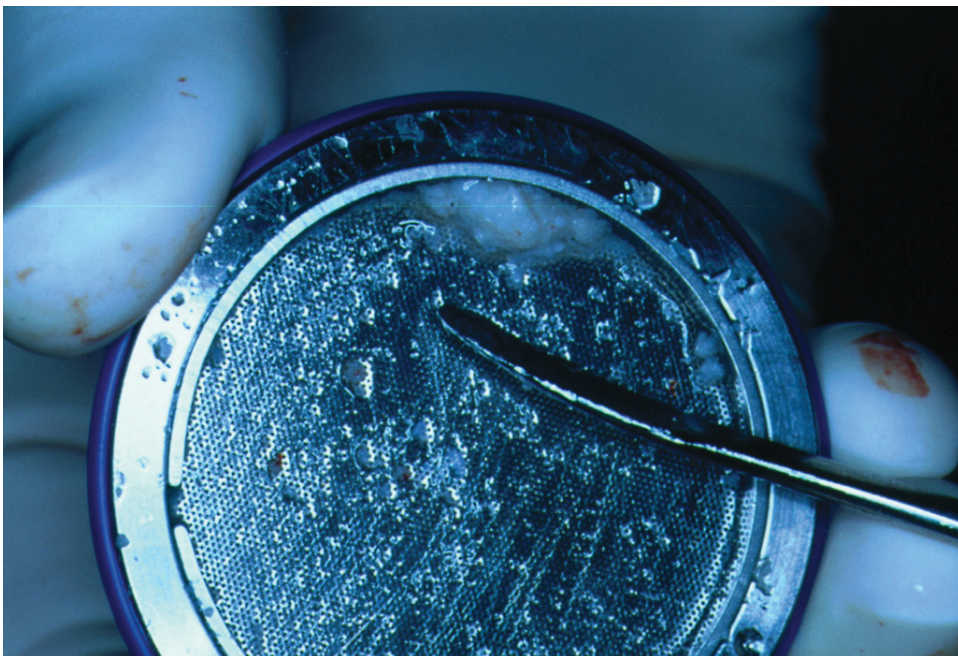


Abbildung 5 Knochenfilter mit intraoperativ gewonnenen Knochenspänen. Die Knochenpartikel, die größer als die Poren des Filtersiebes sind, werden zurückgehalten. Nach Waschen mit steriler Kochsalzlösung können sie als autologe Knochentransplantate verwendet werden.

2. 2 Zellkulturablauf

2.2.1 Zellkulturreagenzien/Nachweismaterialien

- DMEM 1g / 1 Glucose Art. Nr. 21885 – 025; Gibco, Karlsruhe
- Fötale Kälberserum, Art. Nr. 10270 – 106; Gibco, Karlsruhe
- Penicillin/Streptomycin Lösung 10000 U / ml Art. Nr. 15140148; Gibco, Karlsruhe
- Antibiotic/Antimycotic solution 100X liquid 100.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin Art.Nr.15240-096; Invitrogen, Karlsruhe
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Versen) 1% Art. Nr. L2113; Biochrom AG, Berlin
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Art. Nr. 14190094; Gibco, Karlsruhe
- Trypanblau Lösung 0,4% Art. Nr. 15250 – 061; Gibco, Karlsruhe
- 4% Paraformaldehyd (mit Methanol stabilisiert) CHB 6452038; Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
- 30% Wasserstoffperoxid; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Peroxidase Blocking Reagent Dako S 2001; DakoCytomation, Hamburg
- Protein Block Serum – free Reagent Dako X 0909; DakoCytomation, Hamburg
- Antibody Diluent with background reducing components; Dako S 3022; DakoCytomation, Hamburg
- Spezifischer Anti-Osteocalcin-Antikörper; Mouse igG 1; 1mg / ml Acris BM 2002; DPC Biermann, Bad Nauheim
- Negativ-Kontrolle: Mouse IgG 1 Dako X 0931; DakoCytomation, Hamburg

- Sekundärer Antikörper Anti – Goat, Mouse, Rabbit IgGs (biotinyliert) Dako E 0453; DakoCytomation, Hamburg
- Peroxidase – Conjugated Streptavidin, P 0397; DakoCytomation, Hamburg
- AEC Aminoethylcarbazol Substrate – Chromogen System Dako K 3464; DakoCytomation, Hamburg
- Hämatoxylin Dako S 2020; DakoCytomation, Hamburg
- Einbettmedium: Glycergel Mounting Medium DakoCytomation, CO 563
- Alkalische Phosphatase; Sigma 86R AP Leucocyte Kit; Sigma – Aldrich, Taufkirchen
- Levamisol; Sigma L – 9756; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Promega SV Total RNA Isolation System; Kat. Nr. Z3100 (Promega, Mannheim)
- Promega Reverse Transcription System; Kat. Nr. A3500 Kit (Promega, Mannheim)
- 100 bp DNA-Leiter (Promega, Mannheim)
- Gel loading solution Orange Loading Dye, 6x, Kat. Nr. G1881 (Promega, Mannheim)
- Zellkulturflaschen; Greiner, Flacht
- Kryo Tubes; Nunc, Wiesbaden
- Culture Slides (aus Polystyrol); Nunc, Wiesbaden
- Reaktionsgefäße; Eppendorf, Hamburg
- Pipetten, Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg
- Waage ED 200; Shimadzu GmbH, Duisburg
- Tischzentrifuge Heraeus Biofuge A; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau
- Autoklav; Westima – Moller KG, Köln

- Brutschrank CO₂ – Auto – Zero; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau
- Neubauer – Zählkammer; VWR International, Darmstadt
- Durchlichtmikroskop Olympus BX 50; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- Photokamerasystem Canon EOS 10D, Krefeld, Deutschland

2.2.2 Kulturverfahren für humane Knochenzellen

Die im Knochenfilter gesammelten Knochenspäne wurden in 25 cm² große Zellkulturflaschen (Greiner, Flacht) überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Medium wurde Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM, Gibco) mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (Gibco) und 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin (Gibco) gewählt. Es wurden keine weiteren osteogenen Faktoren zugesetzt. An jedem zweiten Tag wurden ein Mediumwechsel und eine mikroskopische Kontrolle der Zellen vorgenommen. Um eine für die Versuche ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 0,2 g/L EDTA₄Na (Biochrom AG) abgelöst und auf 8-Kammer-Zellkulturobjektträger (Lab Tek Chamber Slide, Nunc, Wiesbaden) für immunhistochemische und histochemische Untersuchungen übertragen.

Das Ablösen der Zellen von den Zellkulturflaschen wurde des Weiteren auch zur Zellzahlbestimmung und zum Aufteilen durchgeführt. Das Passagieren der Zellen nach Erreichen der Zellkonfluenz diente einerseits zum Erhalt einer höheren Anzahl von Zellen, die für die verschiedenen Experimente notwendig war. Andererseits konnte auf diese Weise das Bestehen der osteoblastären Differenzierungsmerkmale nach mehrmaligem Passagieren überprüft werden.

Das Splittintervall der Zellen betrug in der Regel 7-9 Tage. Hierfür wurden die Zellkulturflaschen nach dem Absaugen des Mediums mit PBS gespült. Anschliessend wurde EDTA in einer Endkonzentration 0,2 g/l hinzugegeben. Die entstandene Mischung wurde für 5-15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Begutachtung des Ablösungszustandes wurden die Flaschen mehrmals geklopft, um die Zellen vollständig vom Flaschenboden abzulösen. Die Zellsuspension wurde mit PBS nachgespült und in ein Zellüberstandröhrchen eingefüllt. Im Anschluss wurden die abgelösten Zellen und der Zellüberstand in Zentrifugenröhrchen eingegeben und für 8 Minuten bei 200xg zentrifugiert. Danach wurden der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in Medium resuspendiert, in Kulturflaschen eingefüllt und nach mikroskopischer Kontrolle in den Brutschrank gelegt.

Das Bestimmen der Zellzahl wurde vor einer Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung vorgenommen. Dazu erfolgte ein dem Splitten ähnliches Prozedere mit dem folgenden Unterschied: nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, 1 ml Medium zugesetzt und gut durchgemischt. Es wurden 50 µl Zellsuspension in einem Mischverhältnis von 1:1 mit Trypanblau-Farbstoff gemischt und auf die Zählkammer pipettiert. Die verwendete Neubauersche Zählkammer bestand aus sechzehn Quadraten, über welche die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt wurden. Dabei wurden in jedem Quadrat nur die Zellen gezählt, die sich auf der jeweiligen linken und oberen Kante befanden, diejenigen auf der rechten und unteren Linie wurden nicht berücksichtigt. Das Zytoplasma vitaler Zellen ist hell durchscheinend. Abgestorbene Zellen füllten sich mit Trypanblau und erschienen somit dunkler. Die Vitalitätsquote sollte größer oder gleich 95% sein. Der errechnete Mittelwert multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor, ergab die Zellzahl pro ml.

Desweiteren wurde die absolute Zellzahl als Produkt aus Zellzahl pro ml und Gesamtvolumen berechnet.

2.3 Morphologische Untersuchungen

Für die Erfassung der Spanmorphologie wurde eine digitale Kamera (Canon EOS 10D, Krefeld, Deutschland) auf einem binokulären optischen Mikroskop (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) angebracht. Spanform und -größe wurden unmittelbar nach Entnahme der Proben mittels mikroskopischer Vermessung der Präparate durch ein Computerprogramm (Image J, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) bestimmt. Für jeden Knochenspan wurde der größte Durchmesser dokumentiert. Alle Messungen wurden von einem für die Gruppenzugehörigkeit geblindeten und zuvor kalibrierten Untersucher durchgeführt.

2.4 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Die qualitative Bestimmung der AP-Aktivität wurde anhand der Freisetzung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenolphosphat bestimmt. Das Prinzip basiert auf der simultanen Kopplung bei Anwendung substituierter Naphtole und stabiler Diazoniumsalze. Die stabilen Diazoniumsalze werden durch die Reaktion von Arylaminen mit Natriumnitrit in einem sauren Medium gebildet. Dadurch entsteht ein instabiles Diazoniumchlorid, das nach Behandlung mit Naphtalene-1,6- Bisulfonat stabile Salze bildet. Als Ergebnis der Aktivität der AP wird das Naphtol AS-BI

freigesetzt, das sich sofort mit dem Diazoniumsalz verbindet. Dabei entsteht ein unlösliches, sichtbares Pigment an den Stellen der AP-Aktivität.

1. Die Färbelösung wurde gemäß des Protokolls des Sigma Kits 86 R wie folgt hergestellt:
 - Mischung von 22,2 µl Natriumnitritlösung und 22,2 µl FRV-Alkaline-Lösung und
 - 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur; danach
 - Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser (aqua dest.) und 22,2 µl Naphtol AS-BI-Phosphat-Lösung.
2. Die Zellen wurden auf folgende Weise für die Färbung vorbereitet:
 - nach Erreichen der Zellkonfluenz wurden die aus autologen Knochenspänen ausgewachsenen Zellen in einem Volumen von 1 ml auf 8-Kammer-Zellkulturobjektträger ausgesät. Die Zellzahl betrug 10.000 Zellen pro Einzelkammer;
 - nach 3 bzw. 7 Tagen wurden der Zellüberstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 30-45 Sekunden in 4% Formaldehyd. Anschliessend wurde erneut dreimal mit aqua dest. gewaschen.
3. Die histochemische Reaktion erfolgte nach Zusatz der Färbelösung und 15-minütiger Inkubation unter Lichtschutz. Im Folgenden wurde ein 3-maliges Waschen mit aqua dest. und ein Abtrennen der Kammerseiten vorgenommen.
4. In der negativen Kontrolle wurde die Aktivität der endogenen alkalischen Phosphatase mit 0,15 mg/ml Levamisol, als spezifischem Hemmstoff der AP blockiert (Van Belle, 1972).
5. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für 2 Minuten mit 6% Hematoxilin. Nach Differenzierung in Leitungswasser wurden die Objektträger mit Crystal

Mount Aqueous Mounting Medium eingedeckelt.

2.5 Immunhistochemische Färbung für Osteocalcin

Zur Charakterisierung der aus den Knochenspänen ausgewachsenen Zellen wurde immunhistochemisch die Anwesenheit von OC als osteoblastärem Differenzierungsmarker überprüft.

Die auf Culture Slides angezogenen Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert und für 10 Minuten in 10% H₂O₂ inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Das Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mittels Blocking Solution (DakoCytomation) für 30 Minuten. Anschliessend wurden die Proben für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem spezifischen monoklonalen anti-OC Antikörper inkubiert (1:100, Acris, Hiddenhausen). Alle verwendeten Antikörper wurden in einer speziellen Antikörper-Verdünnungslösung (DakoCytomation) verdünnt. Als negative Kontrolle wurde ein mouse IgG1 Antikörper (Isotypkontrolle) (DakoCytomation) in derselben Verdünnung verwendet. Die Proben wurden für 60 Minuten mit dem sekundären Antikörper, einem biotinylierten anti-mouse IgG (1:100, DakoCytomation) inkubiert. Danach wurde ein Streptavidin-Horseradish Peroxidase-Konjugat (1:300, DakoCytomation) für 30 Minuten auf die Proben aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte durch Farbreaktion unter Verwendung von AEC (DakoCytomation) als Substrat. Nach 5 Minuten wurde die Farbreaktion gestoppt und die Zellen wurden mit 6% Hematoxilin (DakoCytomation) gegengefärbt. Die Präparate wurden mit Glycergel Mounting Medium eingedeckt.

2.6 Analyse der Expression osteoblastärer Marker auf RNA Ebene durch RT-PCR

2.6.1 RNA-Isolierung

Die Expression von OC, eines osteoblastären Markers, wurde auch auf RNA-Ebene untersucht. Dazu wurde RNA aus kultivierten Explantzellen isoliert, diese dann in cDNA umgeschrieben, die cDNA mittels PCR amplifiziert und die Produkte im Agarosegel aufgetrennt.

Die Expression von Osteocalcin wird durch die Menge der im Zellkern synthetisierten mRNA bestimmt. Die mRNA wird nachfolgend ins Zytoplasma transportiert und dort translatiert. Im Zytoplasma beträgt der Anteil der mRNA an der Gesamt-RNA weniger als 5%. Die mRNA-selektive cDNA-Synthese mit Oligo-dT Primern und nachfolgende Amplifikation der cDNA mittels PCR erlaubte den Einsatz von Gesamt-RNA für die hier beschriebenen Untersuchungen. Zelluläre/ zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Promega SV Total RNA Isolation Systems (Kat. Nr. Z3100; Promega, Mannheim) isoliert.

Die Prozedur umfaßt vier entscheidende Schritte:

1. Aufschluss der Zellen
2. Denaturierung der Nukleoproteinkomplexe
3. Inaktivierung der endogenen Ribonuklease (RNase)
4. Beseitigung von Proteinen und DNA

Bei der Verwendung dieses Kits werden endogene RNasen, die unmittelbar beim Aufschliessen der Zellen freigesetzt werden, sofort inaktiviert, so dass die Isolation

intakter RNA möglich ist. Die Methode basiert auf einer Kombination der destruktiven und protektiven Eigenschaften von Guanidiniumthiocyanat (GTC) und des β -Mercaptoethanols (Chirgwin *et al.*, 1979). Inkubation mit GTC führt zu einer Spaltung der Nukleoproteinkomplexe, in denen die RNA in der Zelle vorliegt. β -Mercaptoethanol inaktiviert die Ribonukleasen.

Zur Isolierung der RNA wurden jeweils 2×10^4 bis 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden von der Kulturoberfläche abgelöst, sedimentiert und mit dem RNA-Lysispuffer versetzt. Anschließend wurde RNA-Verdünnungspuffer zugegeben. Das im Lysispuffer enthaltene GTC bewirkt eine selektive Präzipitation der zellulären Proteine. Die RNA bleibt in Lösung und wird mittels Zentrifugation von diesen und Zelltrümmern abgetrennt. Der RNA-haltige Überstand wird mit Ethanol versetzt und auf eine Säule aufgetragen. Unter den pH- und Salzbedingungen des eingesetzten Puffers wird die RNA selektiv an die Filteroberfläche der Säule gebunden. Chaotrope Salze beschleunigen die Bindung. Noch vorhandene genomische DNA, die unter den gleichen Bedingungen an das Säulenmaterial bindet, wird durch direkten Zusatz von RNase-freier DNase beseitigt. In mehreren Waschschrritten wurden dann kontaminierende Salze, Proteine und eventuell noch vorhandene Zelltrümmer von der Säule entfernt. Die Elution der RNA erfolgte dann mit nukleasefreiem Wasser. Die RNA wurde dann entweder umgehend in cDNA umgeschrieben oder bei -80 gelagert.

Im gesamten Verlauf der RNA-Isolation wurde mit sterilen Handschuhen und Schutzkleidung gearbeitet, um eine Kontamination der Proben durch RNasen zu vermeiden. Zudem wurden ausschliesslich RNase-freie Geräte und Verbrauchsmaterialien eingesetzt.

2.6.2 Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription)

Die reverse Transkription (RT) erfolgte mit dem Promega Reverse Transcription System Kat. Nr. A3500 Kit (Promega, Mannheim). Hierbei wurde unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers, der mit dem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der einzelsträngigen mRNA hybridisiert, die komplementäre cDNA aus der mRNA durch die Reverse Transkriptase synthetisiert. Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym, das aus bestimmten RNA-Viren gewonnen wird. Zur Verwendung in der Molekularbiologie ist dieses Enzym genetisch so modifiziert, dass die RNase-H-Aktivität um den Faktor 100 reduziert ist. Die Polymerase-Aktivität bleibt in vollem Umfang erhalten.

Die zuvor isolierte und bei -80° C gelagerte RNA wurde in einer Menge von 1 µg mit 9,4 µl Nuklease-freiem Wasser gemischt und für 10 Minuten im Thermocycler bei 70° denaturiert. Anschliessend wurde das Präparat auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Ein Mastermix bestehend aus MgCl₂ (2,5 mM), RT-Puffer, dNTP-Mix (10mM), Rnasin RNase-Inhibitor (1U/µl), Oligo(dT) Primer (0,5 µg/µl) und AMV Reverser Transkriptase (25 U/µl) wurde in einem Gesamtvolumen von 10,6 µl hergestellt und der Probe zugegeben. Die Probe wurde für 15-60 Minuten bei 42° im Thermocycler inkubiert. Danach erfolgte die weitere Verarbeitung der Proben in der PCR.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Zuge der PCR wird ausgehend von einer cDNA oder DNA-Matrize und einem spezifischen Primerpaar, das an den sense- bzw. antisense-Strang hybridisiert, die von den Primern flankierte Sequenz exponentiell amplifiziert. Die gesamte Reaktion

basiert auf drei Etappen, die jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen stattfinden. Im ersten Schritt, der Denaturierung (bei 95 °C für 3 Minuten und für 30 Sekunden bei 94°C im jeweiligen Zyklus bei 33 Zyklen) wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Die Oligonukleotid-Primer hybridisieren mit den beiden Matrizensträngen im Anlagerungsschritt –Annealing- (55 °C, 30 Sekunden). Diese dienen dann im dritten Schritt, der Elongation (72°C, 30 Sekunden und am Ende für 10 Minuten) als Startermoleküle für die Taq-DNA-Polymerase. Die gesamte Reaktionsabfolge – Denaturierung, Anlagerung, Elongation wird 33 Mal wiederholt. Ein spezifisches Primerpaar für die Amplifikation des Housekeeping-Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) wurde nach der Methode von Steinbrenner *et al.* benutzt (Steinbrenner *et al.*, 2003). Das OC Primerpaar wurde mit Hilfe des Programmes DNA Star (DNASStar Inc., Madison, USA) ausgewählt und in der NCBI Gen-Datenbank überprüft. Die Sequenzen der verwendeten Primer waren: 5'CCA AGC AGG AGG GCA GCG AGG TAG TGA A (sense) and 5'CAG GGC AAG GGC AAG GGG AAG GGG AAG AGG AA (antisense).

2.6.4 Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel

Zur Auftrennung im Agarose-Gel wurden die amplifizierten Proben sowie die 100 bp DNA-Leiter (Promega) und die negative Kontrolle (aqua dest.) mit Gel Loading Solution (Orange Blue) in einem Verhältnis von 1:5 gemischt. Der Röhrcheninhalt wurde in die Geltaschen des vorher vorbereiteten 1% Agarose-Gels (in Tris-Acetat-EDTA; Ethidiumbromid 10 mg/ml) in der folgenden Reihenfolge: DNA-Leiter---aqua dest.---Probe1---Probe 2---Probe 3---etc. aufgetragen. Anschließend wurde die Gelkammer mit Hilfe von Elektroden an eine Stromquelle angeschlossen. Im so erzeugten elektrischen Feld (120 V) wandert die negativ geladene DNA zum

positiven Pol. Die DNA konnte durch Interkalation des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach Betrachtung in UV-Licht konnte durch das Verteilen der mit Farbstoff markierten DNA und durch den Vergleich mit den Banden der DNA-Leiter die Produktgröße (Anzahl der Basenpaare, wo ein Signal exprimiert wird) bestimmt werden.

2.7 Statistische Datenanalyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels des Softwarepakets SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für jede der Studiengruppen einzeln berechnet. Zur statistischen Untersuchung der Signifikanz der beobachteten Unterschiede wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc-Test (Bonferroni's Korrektur) durchgeführt.

Die Studienteilnehmer wurden bezüglich folgender Parameter in Gruppen eingeteilt:

- i) Entnahmemethode (PS und MK);
- ii) Patientenalter (unter 30 Jahren (n=30) und über 30 Jahren (n=39) und
- iii) Entnahmelokalisation (Oberkiefer oder Unterkiefer).

Der Größenvergleich der Knochenspäne erfolgte mittels Student's *t*-Test. Die Ergebnisse wurden ab einem P-Wert von $P < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

Tabelle 2 Einteilung der Patienten bezüglich Geschlecht, Alter, Entnahmemethode und Entnahmelokalisation.

Parameter	Anzahl der Proben			
Geschlecht	männlich	n=30	weiblich	n=39
Alter	>30	n=39	<30	n=30
Entnahmemethode ¹	MK	n=36	PS	n=33
Entnahmelokalisation ²	OK	n=25	UK	n=44

¹ MK, metallische Kugelfräse; PS, Piezosurgery®; ² OK, Oberkiefer; UK, Unterkiefer

3 ERGEBNISSE

3.1 Verweildauer im Knochenfilter

Die Verweildauer der Knochenspäne im Knochenfilter bis zur Übertragung in das Probengefäß betrug im Mittel 184 ± 165 Sekunden. Die längste Verweildauer war 1225 Sekunden, die kürzeste 43 Sekunden .

3.2 Zellproliferation

Die mikroskopische Untersuchung zeigte in 61 der 69 untersuchten Proben erste adhärenente Zellen in der Umgebung der Knochenspäne nach 6-19 Tagen (**Tabelle 3**). In der Kontrollgruppe wurden auswachsende Zellen in 32 Proben (88.9%) und in der Testgruppe in 29 Proben (87.9%) beobachtet. In beiden Gruppen waren die Zellen nach 20 bis 25 Tagen Inkubation konfluent ($p > 0,05$, ANOVA). Die auswachsenden Zellen wiesen eine fibroblastenähnliche Form auf und waren durch ihre zytoplasmatischen Ausläufer miteinander verbunden (**Abb. 6**).

In beiden Gruppen gab es jedoch jeweils 4 Proben (insgesamt $n=8$), die nach 35 Tagen Inkubation keine Zeichen einer Zellproliferation aufwiesen.

Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Anwachszeit der Zellen und dem Patientenalter (**Abb. 7A**), der Entnahmelokalisation (**Abb. 7B**), dem Patientengeschlecht (**Abb. 7C**) und der Entnahmemethode (MK versus PS) (**Abb. 7D**) ($p > 0,05$, ANOVA).

Tabelle 3 Exemplarischer Datenauszug - Adhärenz- und Konfluenzintervalle bezogen auf das Patientengeschlecht und -alter, Entnahmemethode und -lokalisierung, sowie Verweildauer im Knochenfilter.

Probe Nummer	Sex	Alter	Entnahmemethode	Region	Zeit im Filter ^A	Adhärenz nach Tagen	Konfluenz nach Tagen
1	w	31	PS	OK	313	8	33
2	m	30	PS	UK	137	13	21
3	w	23	PS	OK	126	13	28
4	w	60	PS	OK	120	13	26
5	w	39	PS	OK	86	14	27
6	m	65	PS	OK	73	18	25
7	m	43	PS	UK	125	8	24
8	w	55	MK	UK	110	18	26
9	m	62	MK	OK	287	24	31
10	w	53	MK	UK	89	22	42
11	m	18	MK	OK	43	15	27
12	w	58	MK	UK	60	14	23
13	w	20	PS	UK	182	14	26
14	m	49	MK	UK	780	11	24
15	m	41	MK	UK	240	10	24
16	w	23	MK	UK	54	9	33
17	m	44	PS	UK	120	11	21
18	m	40	PS	OK	476	6	18
19	w	46	MK	UK	107	---	---
20	m	19	PS	UK	117	---	---
21	w	29	MK	UK	285	13	18
22	w	66	MK	UK	300	21	42
23	w	34	MK	OK	1125	13	22
24	m	36	PS	UK	61	14	28
25	w	23	PS	UK	128	10	34

^A in Sekunden.

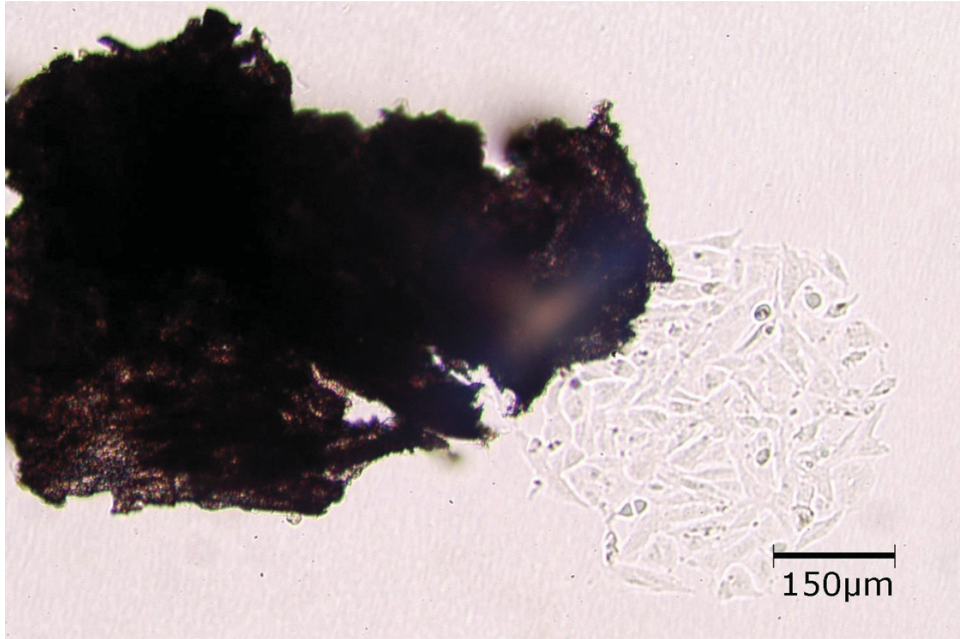


Abbildung 6 Knochenspan mit auswachsenden Osteoblasten nach 9 Tagen Inkubation (Kugelfräse). Charakteristischer mikroskopischer Aspekt der Zellen.

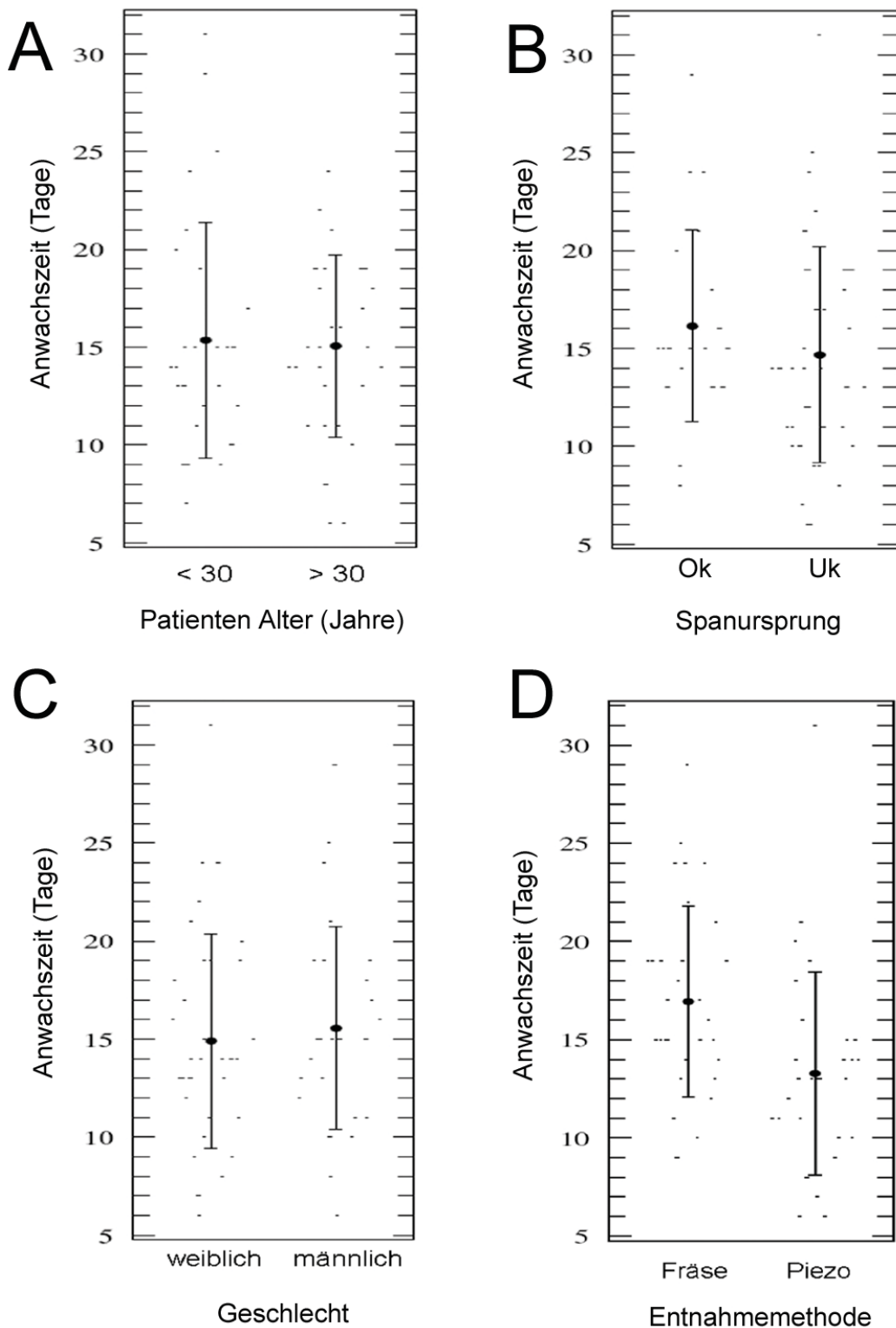


Abbildung 7 Graphische Darstellung der Anwachszeit. (A,B) In Abhängigkeit von Patientenalter (<30 Jahre bzw. >30 Jahre) und Entnahmelokalisation (OK versus UK) waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant. (C,D) Auch das Patientengeschlecht und die Entnahmemethode hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Anwachszeit.

3.3 Morphometrische Analyse

3.3.1 Partikelgröße

Die morphometrische Untersuchung der durch beide Methoden entnommenen Knochenspäne ergab, dass die PS Gruppe statistisch signifikant größere Partikel aufwies als die MK Gruppe ($p < 0,01$, unpaired t test). Somit konnte für die mittels Rosenbohrer entnommenen Proben eine maximale Größe von 2035 μm bzw. minimale Größe von 4 μm bei einem mittleren Wert von $153 \pm 201 \mu\text{m}$ festgestellt werden. Die piezoelektrisch gewonnenen Späne hatten eine mittlere Größe von $486 \pm 355 \mu\text{m}$, bei einem Minimum von 43 μm und einem Maximum von 1653 μm (Tabelle 4, Abb. 8 und Abb. 9).

Tabelle 4 Zusammenfassung der Partikelgrößen.

	Entnahmeart	N ¹	M ²	SA ³	SFM ⁴
	Piezosurgery®	96	486,02	355,60	36,29
Spangröße in μm	Kugelfräse	434	153,74	201,11	9,65

¹Probenzahl; ² Mittelwert; ³ Standardabweichung; ⁴Standardfehler des Mittelwertes.

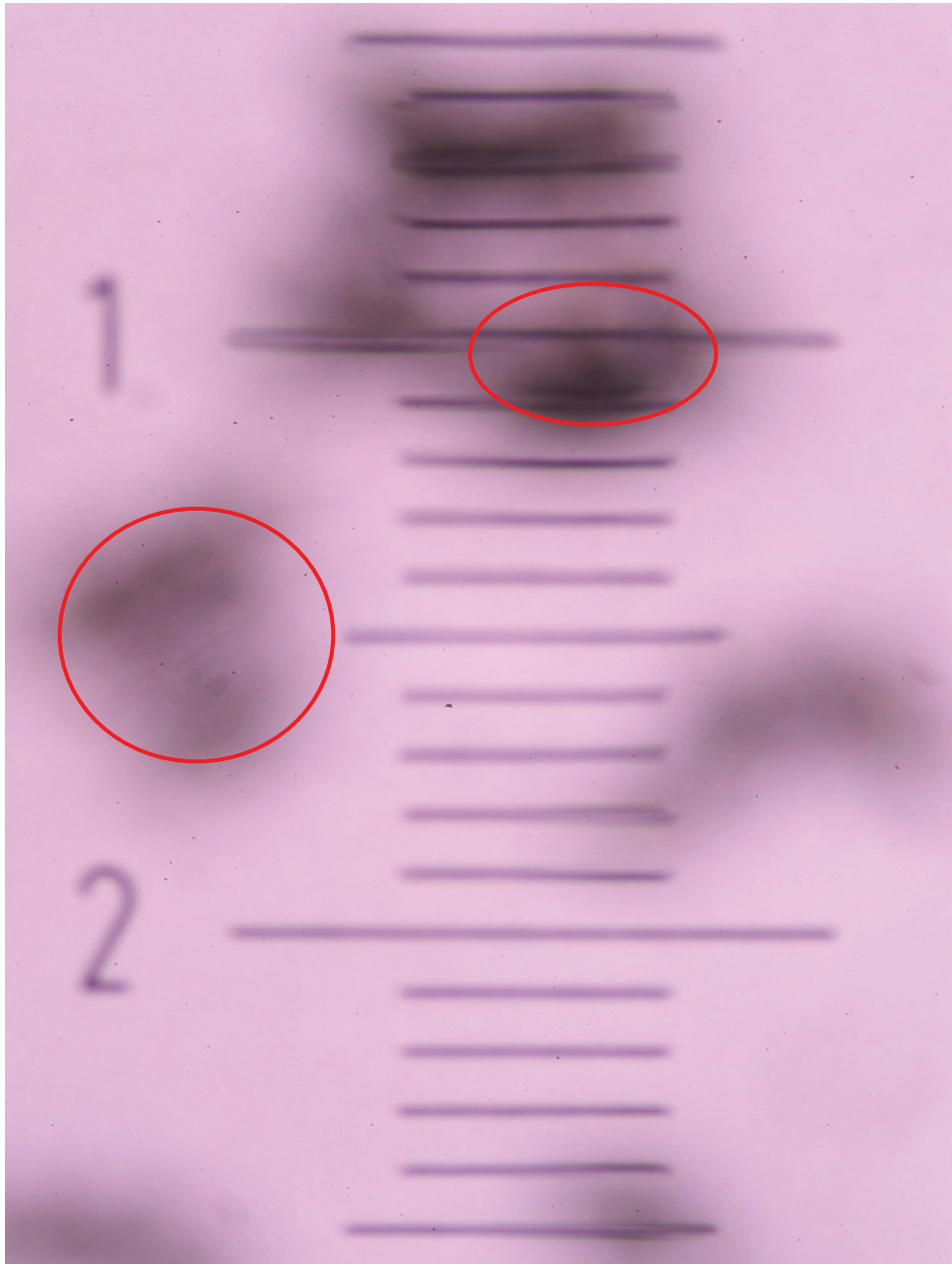


Abbildung 8 Mikrometrische Messung der Knochenspäne. Die Form und der Durchmesser der Knochenspäne sind unterschiedlich (oben: Ellipse, $300\mu\text{m}$; unten: Kreis, $500\mu\text{m}$). Die großen Einheiten auf der Skala entsprechen einem Millimeter.

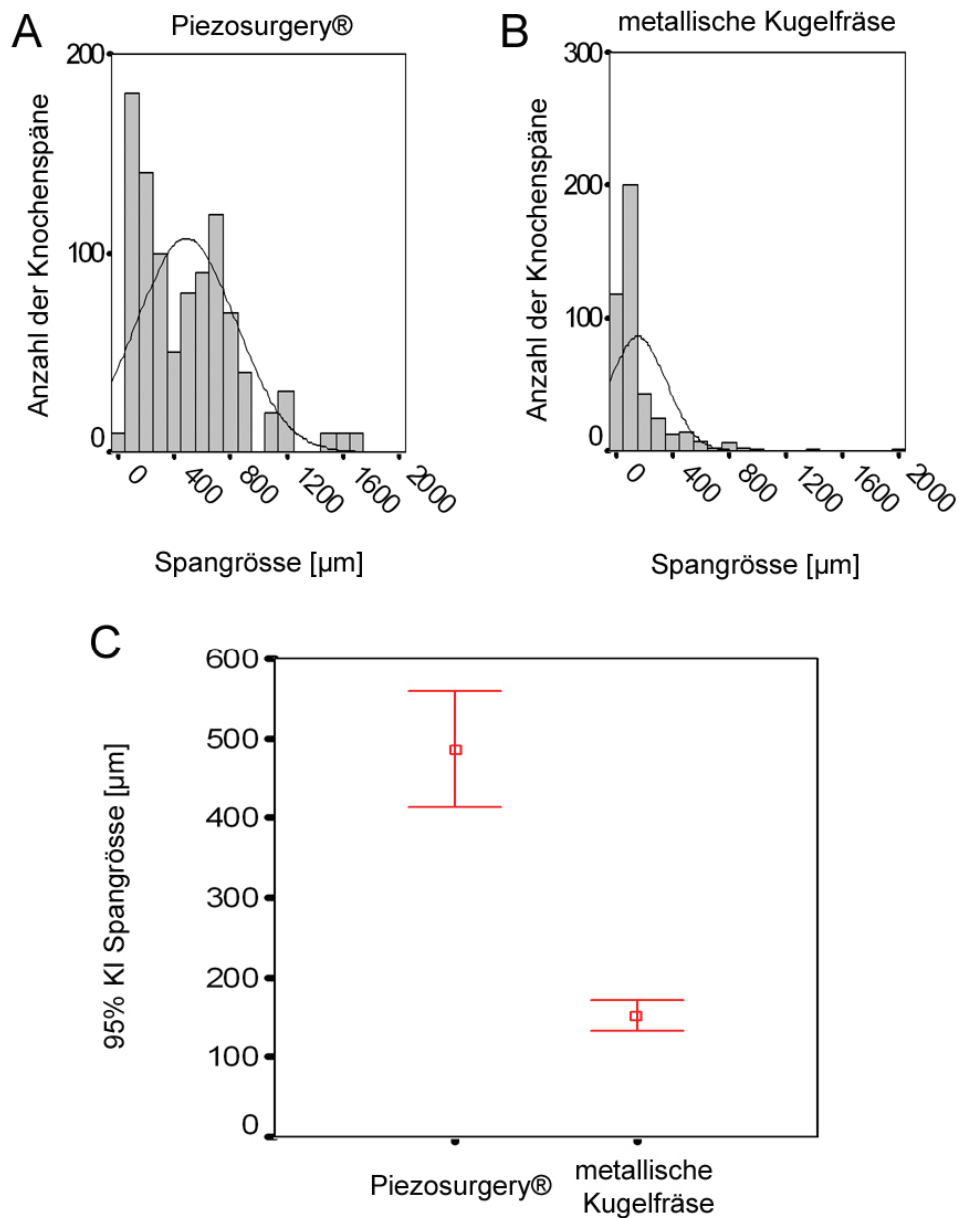


Abbildung 9 Graphische Darstellung der Spangröße. (A,B) Histogramme der Spangrößen (μm) in der Testgruppe (PS) und Kontrollgruppe (MK). **(C)** Box plot der Spangrößen in beiden Gruppen. Konfidenzintervalle (95%).

3.3.2 Partikelform

Unabhängig von der Entnahmemethode wiesen alle Knochenspäne eine unregelmäßige, polygonale Form auf (**Abb. 10**).

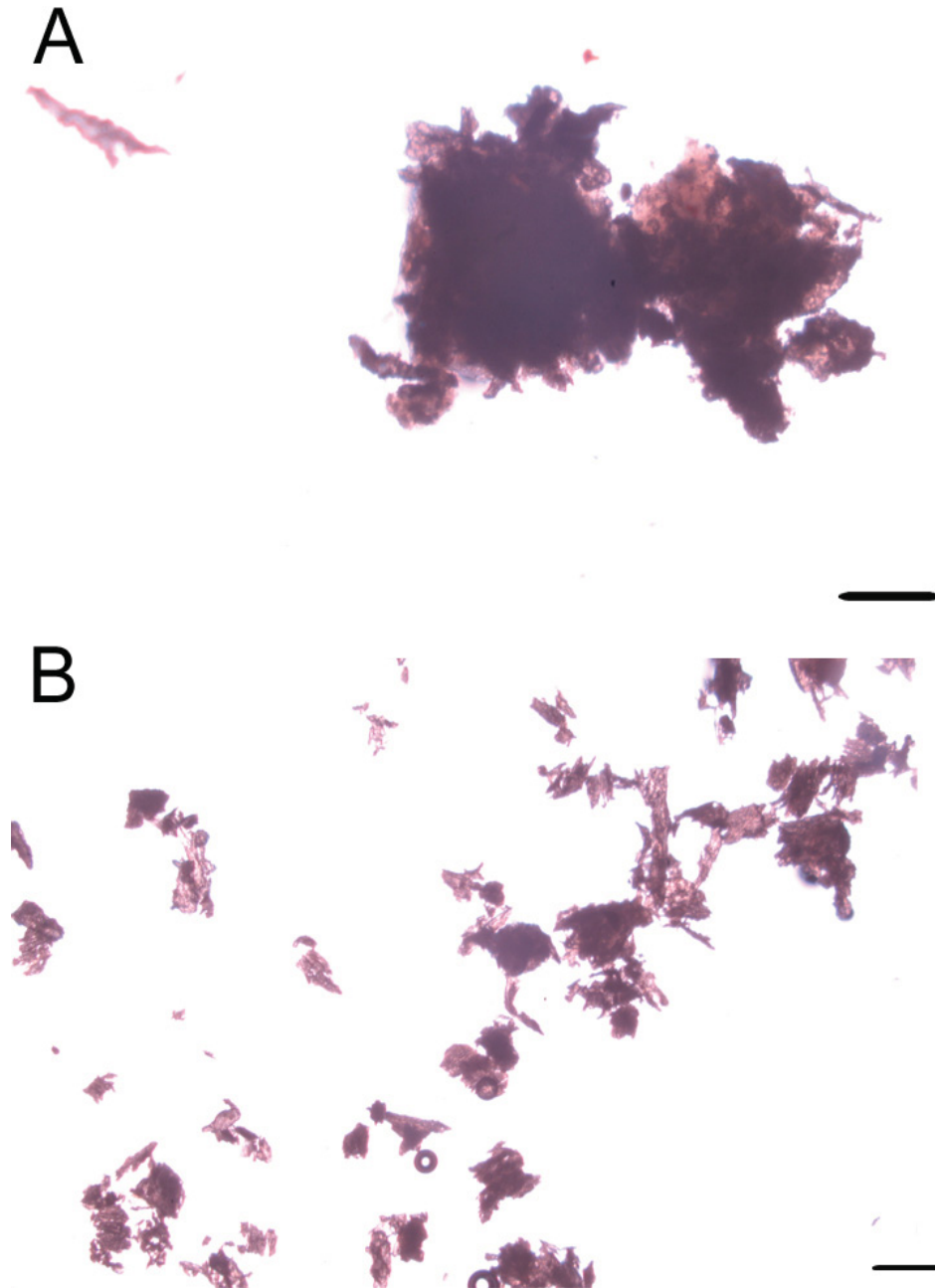


Abbildung 10 Form und Größe der Späne. (A) Spangröße Piezo - KS 80 2,5x Vergrößerung. (B) Spangröße Kugelfräse - KS 81, 2,5x Vergrößerung. Die Messbalken entsprechen 500 µm.

3.4 Zellcharakterisierung

3.4.1 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Sowohl in der Testgruppe als auch in der Kontrollgruppe konnte eine positive Färbung auf AP als früher Marker der osteoblastären Differenzierung gezeigt werden: nach einer 2-wöchigen Zellanzucht war eine intensive rote extrazelluläre Färbung neben den gegengefärbten, blauen Zellkernen feststellbar (**Abb. 11A**). Diese positive Reaktion aller Proben erwies sich als endogen (spezifisch), da die AP mittels Levamisol vollständig hemmbar war (**Abb. 11B**).

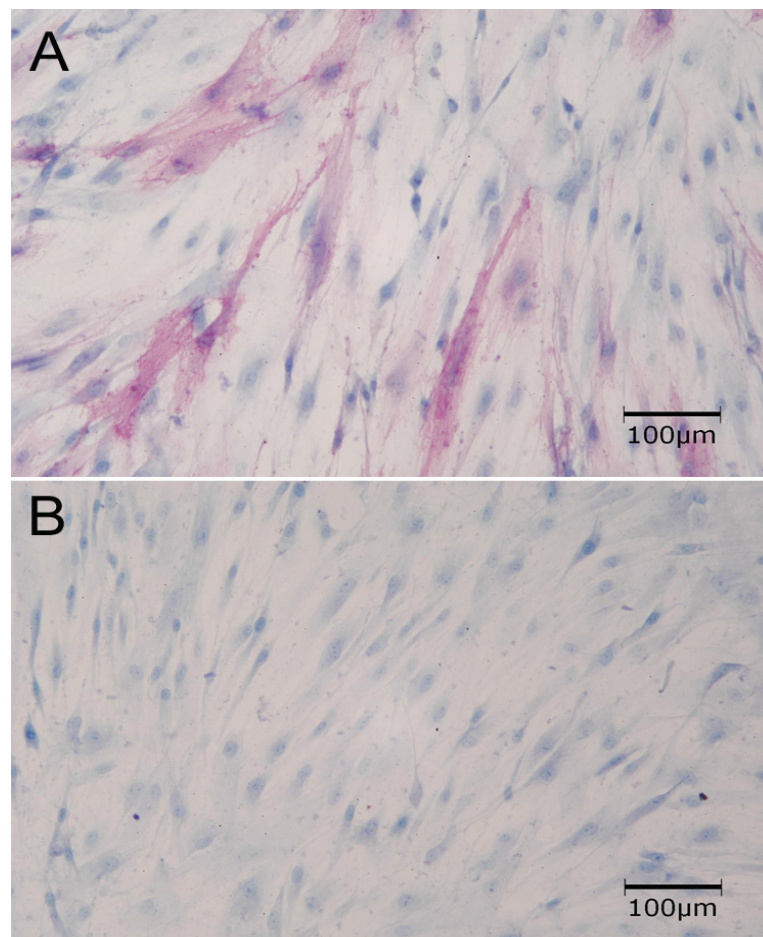


Abbildung 11 Histochemische Färbung auf AP (Kugelfräse). (A) Primäre Osteoblasten. (B) Inhibition mit Levamisol. Die dargestellten Zellen stammen aus einem Präparat, für das die Knochenspäne mittels Kugelfräse gewonnen worden waren.

3.4.2 Analyse der Expression eines osteoblastären Markers (Osteocalcin) auf RNA Ebene

Zusätzlich zum immunhistochemischen Nachweis wurde die Osteocalcin-Expression auch auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Die OC RNA konnte in allen Proben als später Marker der osteoblastären Differenzierung nachgewiesen werden. Um Abweichungen in der Qualität der RNA Präparationen und methodische Fehler in der RT-PCR zu kontrollieren, wurden zusätzlich PCR-Reaktionen mit für HPRT (ein housekeeping-Gen) spezifischen Primern durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte zeigte Banden der erwarteten Längen von 277bp (OC) und 439bp (HPRT) (**Abb. 12**) Während das Expressionsniveau der HPRT in allen Proben annähernd gleich war, zeigte der Vergleich der Bandenintensität in der Osteocalcin-RNA-Expression Unterschiede. Diese waren jedoch unabhängig von der Gewinnungsmethode (**Abb. 12**).

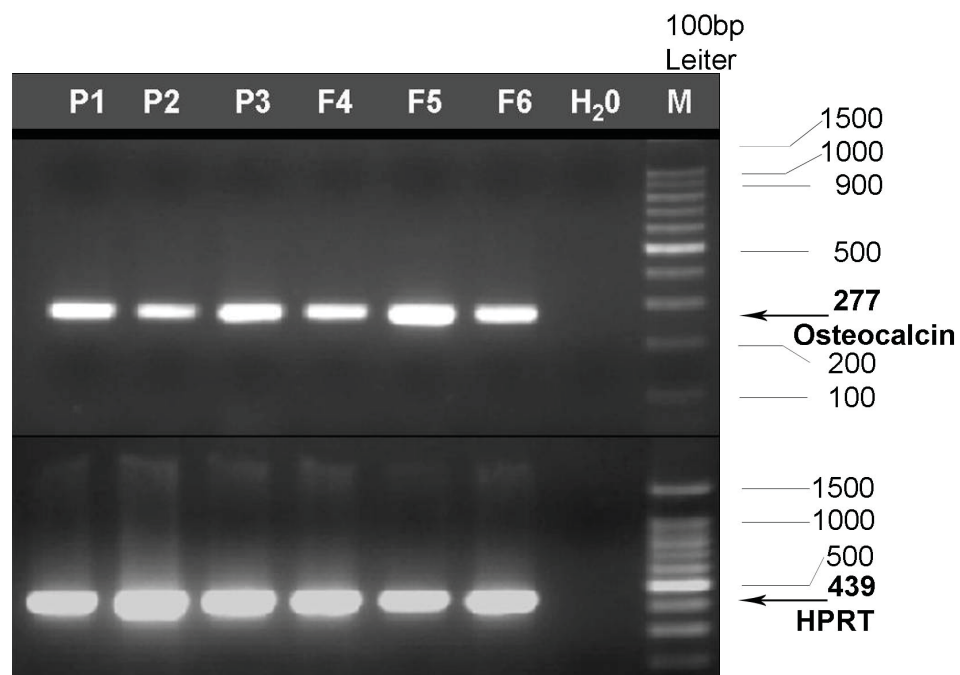


Abbildung 12 Expression von Osteocalcin und eines Housekeeping Gens (HPRT) auf RNA Ebene in Piezosurgery® (P1-P3) und Kugelfräsenproben (F4-F6).

3.4.3 Immunhistochemische Färbung für Osteocalcin

Die immunhistochemische Analyse zeigte die Präsenz von OC in allen Proben. Somit konnte die Synthese dieses extrazellulären Matrixproteins in allen Proben durch das Erscheinen der rötlich-braunen Färbung nachgewiesen werden (**Abb. 13A**). In der negativen Kontrolle sind lediglich die Zellkerne mit Hämatoxylin blau gefärbt (**Abb. 13B**). Die Präsenz beider Marker (AP und OC) in den untersuchten Proben deutete auf eine Differenzierung der auswachsenden Zellen in Osteoblasten hin.

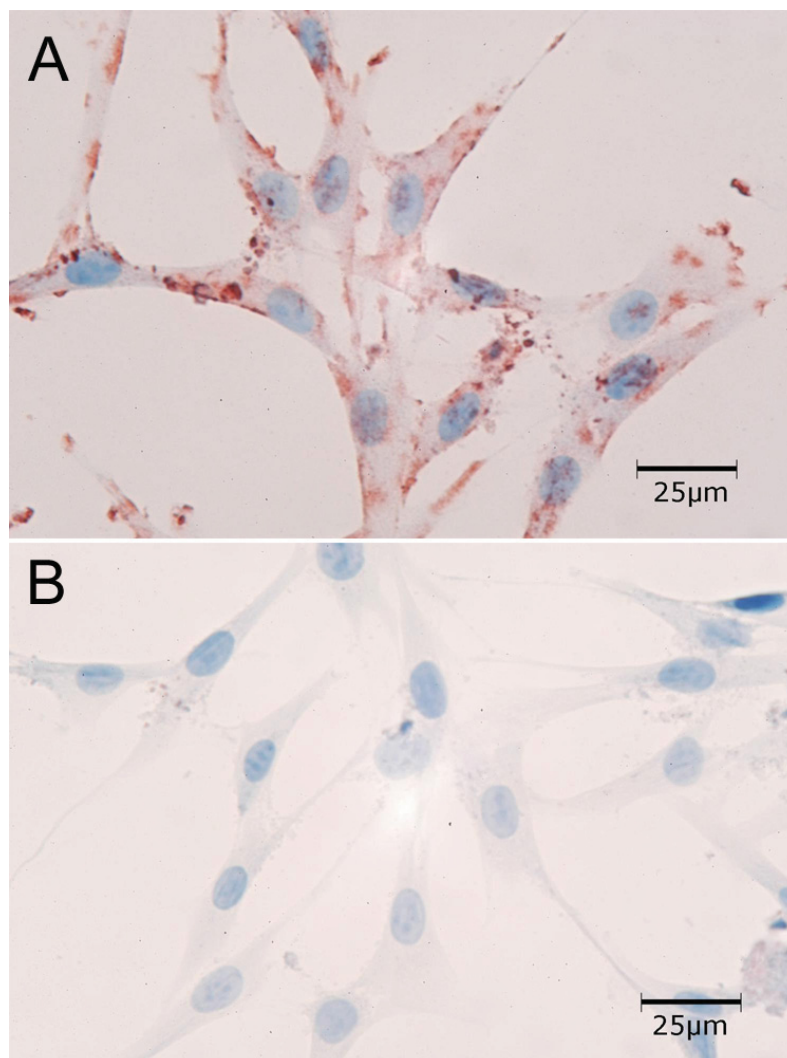


Abbildung 13 Immunhistochemische Färbung auf Osteocalcin (Piezosurgery®). (A) Primäre Osteoblasten mit Antikörper gefärbt. (B) Negative Kontrolle.

4 DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG

In der hier vorgelegten Studie konnte gezeigt werden, dass keine Unterschiede zwischen PS und MK bezüglich Vitalität und Differenzierung der aus Knochenspänen ausgewachsenden Zellen besteht. Die Daten wurden im Verlauf standardisierter oralchirurgischer Maßnahmen erhoben. Weiterhin konnten wir zeigen, dass weder Alter und Geschlecht der Patienten noch die Entnahmelokalisation einen Einfluss auf die untersuchten Parameter hatte. Signifikante Unterschiede konnten hingegen für die Größe der mit den beiden Methoden gewonnenen Knochenpartikel nachgewiesen werden (Mittelwert PS:MK = $486\pm 355\mu\text{m}$: $153\pm 201\mu\text{m}$).

Das Überleben der Transplantate ist in erster Linie vom Ausmaß und der Geschwindigkeit der Revaskularisierung bestimmt (Burchardt, 1983). Diese ist von der Architektur des Transplantates selbst abhängig. Der in Partikel zerkleinerte Knochen stellt möglicherweise eine geringere Barriere für die Einwanderung von Blutgefäßen dar, was eventuell zu einer besseren Diffusion von Nährstoffen im Gewebe führt. In einer tierexperimentellen Studie haben Fonseca und Mitarbeiter autologe Beckenkamm-Knochentransplantate zweier unterschiedlicher Partikelgrößen (2x2x2 mm und 5x5x2 mm) bezüglich Revaskularisationsrate und Heilverlauf bzw. Resorptionsrate bei Implantation in die Unterkieferkortikalis gegenübergestellt. Die kleineren Partikel wurden schneller revaskularisiert, wiesen eine intensivere osteoklastische Aktivität auf und wurden somit vollständig und schneller als die großen Knochentransplantate resorbiert. Der absolute resultierende Knochengewinn in der Alveolarfortsatzkontur war jedoch deutlich geringer bei den kleineren Partikeln. Damit müssen diese als schwächeres Augmentationsmaterial angesehen werden (Fonseca *et al.*, 1980). In einem *in vitro* Modell konnte zudem

gezeigt werden, dass autologe Knochentransplantate größeren Volumens eine höhere Stabilität aufweisen, und dass eine Tendenz zur Rotation nach Einbringen im Empfängerknochenbett unter Einwirkung physiologischer Kräfte weniger wahrscheinlich ist (Ullmark, 2000).

In diesem Zusammenhang müssen auch die Ergebnisse aktueller tierexperimenteller Untersuchungen einbezogen werden, die zeigen konnten, dass Knochenpartikel der Größenordnung zwischen 125-1.000 μm eine höhere osteogene Potenz besitzen als Partikel mit einem Durchmesser unter 125 μm . Die optimale Partikelgröße konnte folglich dem Größenintervall zwischen 100 und 300 μm zugeordnet werden (Shapoff *et al.*, 1980). Andererseits wurde ebenfalls gezeigt, dass kleinere Partikel schneller von Makrophagen resorbiert werden. Die Folge ist eventuell eine geringere oder fehlende Knochenneubildung (AAP, 2001). In demselben Zusammenhang widmete sich die dänische Forschergruppe von Pallesen *et al.* dem Studium des Einflusses der Partikelgröße autogener Transplantate auf die frühen Stadien der Knochenregeneration (Pallesen *et al.*, 2002). Ihre Ergebnisse zeigten, dass kleinere Knochenespäne (0.5 bis 2 mm^3) eine deutlich bessere Substitutionsrate als die größeren Späne (10 mm^3) aufwiesen. Weiterhin war im Falle der kleinen Partikel der totale Volumengewinn in der Knochenneubildung größer und der Neoknochen reifer. Kleine Partikel wurden deshalb als „ideale“ autogene Transplantate bezeichnet (Pallesen *et al.*, 2002).

Bei einer näheren Betrachtung dieser Daten aus der Literatur und der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann geschlussfolgert werden, dass die Knochenpartikel beider untersuchten Gruppen im Bereich der optimalen Partikelgröße lagen.

Die Hypothese, dass die MK eine adäquate Methode der Knochengewinnung darstellt, bestätigt in einem gewissen Ausmaß die Schlussfolgerungen früherer *in*

vitro Studien (Hoegel *et al.*, 2004; Springer *et al.*, 2004). Insbesondere haben Hoegel *et al.* eine Untersuchung der Knochenpartikel durchgeführt, die durch Aufbereitung der Schafttibia mittels zweier verschiedenartiger Bohrerdesigns gewonnen worden waren. Auswachsene Zellen wurden hinsichtlich Zellvitalität durch die Bestimmung der AP-Aktivität charakterisiert (Hoegel *et al.*, 2004). Der Nachweis von AP-Aktivität in den meisten untersuchten Knochenproben war hierbei Indiz dafür, dass die Osteoblasten nach dem Bohrprozess unabhängig von Grösse und Design des Bohrers vital sind. Springer *et al.* berichteten hingegen, dass aus mittels Kugelfräse gewonnenen trabekulären oder kortikalen Knochenspänen weniger vitale Osteoblasten auswachsen als aus mittels Implantat- oder Diamantbohrer gewonnenen (Springer *et al.*, 2004). Diese Diskrepanz lässt sich auf unterschiedliche Art und Weise erklären. Einerseits muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Studie die Knochenpartikel hauptsächlich von kortikalen Entnahmestellen gewonnen und in einem Knochenfilter gesammelt wurden. Unter diesen Umständen ist es schwierig, den Einfluss der Lagerungszeit der Späne im Knochenfilter auf die Zellvitalität zu bestimmen. Allerdings konnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie das Überleben von osteogenen Zellen belegen, bewiesen durch eine positive Aktivität der alkalischen Phosphatase als frühem Marker und Osteocalcin-Synthese als spätem Marker der Osteoblastendifferenzierung. Ein weiterer Parameter, der in der Literatur im Zusammenhang mit mechanischen Entnahmemethoden diskutiert wird, sind die schädlichen Effekte der hohen Temperaturen, die durch Bohren bei der Knochenpräparation entstehen können. Zahlreiche Studien widmeten sich dieser Problematik (Danckwardt-Lilliestrom *et al.*, 1970; Stürmer KM, 1986; Hoegel *et al.*, 2004). Diesem zufolge bewirkt eine Überhitzung des Knochens während des Bohrprozesses eine Zerstörung seiner Morphofunktionalität. Dieser Zerstörung der Morphofunktionalität liegen

Veränderungen der Proteinstruktur, der Zusammensetzung des Protoplasmas, ein veränderter lokaler Metabolismus sowie Inhibition bestimmter Enzyme zugrunde (Danckwardt-Lilliestrom *et al.*, 1970; Hoegel *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass eine kleine Anzahl von Proben aus beiden Gruppen kein Zellwachstum und somit keine Anzeichen der Zellvitalität nach 35-tägiger Inkubation aufwies. Diese Tatsache könnte auf eine kritische Temperatur im kortikalen Knochenbett während der Aufbereitung zurückzuführen sein. Weil die vorliegende Studie die erste ist, die den Einfluss der PS auf die Vitalität und Differenzierung von Osteoblasten untersuchte, ist ein Vergleich mit anderen Studien ähnlichen Designs schwierig. Wie bereits erwähnt, wurde dieses Ultraschallsystem erst kürzlich als schonende Alternative in der oralen Knochenchirurgie eingeführt. Piezosurgery[®] wird in ersten klinischen Studien als effiziente Methode der Osteotomie und Osteoplastik beschrieben. Sie ist durch eine hohe Präzision und Hartgewebselektivität den konventionellen Systemen überlegen (Eggers *et al.*, 2004; Lambrecht, 2004; Siervo *et al.*, 2004; Vercellotti, 2004; Gruber, 2005; Stubinger *et al.*, 2005; Kotrikova *et al.*, 2006; Metzger *et al.*, 2006; Vercellotti and Pollack, 2006). Diese Eigenschaften machen die Methode ideal für den Einsatz an den Übergangszonen zwischen Hart- und Weichgewebe. In diesem Sinne wurde Piezosurgery[®] einerseits bei Sinusbodenelevationen (Vercellotti *et al.*, 2001; Vercellotti and Pollack, 2006), aber auch in der orthognathen Chirurgie für Splittosteotomien (Gruber, 2005) und in demselben Rahmen für Le Fort Osteotomien (Robiony *et al.*, 2004) eingesetzt. Hierbei wurden die Schonung der Nervstrukturen wie auch der Erhalt der Vitalität der Zähne im Osteotomie-Bereich als Vorteile beschrieben. Der erzeugte Kavitationseffekt führte ausserdem zu einem blutarmen Operationsfeld mit einer sehr guten Visibilität für den Operateur. Als Nachteile wurden der höhere Zeitaufwand und die höheren Anschaffungskosten erwähnt

(Robiony *et al.*, 2004; Gruber, 2005). Erste klinische Fallbeschreibungen existieren auch für den Einsatz des piezoelektrischen Gerätes in der kranialen Osteoplastik, wodurch vor allem im Falle der Rekonstruktion von Missbildungen der Calvaria bei Kindern die Gefahr einer Blutung aus dem duralen Sinus, die Bildung von Hämatomen oder die Gefahr einer Meningitis umgangen werden können (Kotrikova *et al.*, 2006).

Unsere Arbeitshypothese war es, dass die durch PS entstandenen Mikrovibrationen möglicherweise einen schädlichen, irreversiblen Einfluss auf die Vitalität der entnommenen Knochenspäne haben könnten, so dass diese für ein autologes Transplantat nicht geeignet sein könnten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung konnten jedoch zeigen, dass beide Entnahmetechniken zu vergleichbaren Zellproliferations- sowie Differenzierungsverhalten der Osteoblasten führten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer aktuellen Studie über die histomorphometrischen Eigenschaften mittels der neuen Entnahmetechniken gewonnener Knochenspäne beschrieben (Berengo *et al.*, 2006). Hierbei zählten die mittels piezoelektrischer Geräte gewonnenen autologen Knochenpartikel zu den qualitativ besten (Berengo *et al.*, 2006). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass Piezosurgery[®] eine geeignete Methode zur autologen Knochenspanngewinnung ist. Nichtsdestotrotz muss berücksichtigt werden, dass dies Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen sind, die die komplexen Zellwechselwirkungen *in vivo* nicht vollständig widerspiegeln können. Weitere Studien mit kontrollierten *in vivo* Modellen sind erforderlich, um die vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die mit PS und MK gewonnenen autologen Knochenspäne vitale Zellen aufwiesen, die sich *in vitro* zu Osteoblasten

differenzierten. In beiden Gruppen hatten das Patientenalter und die Entnahmelokalisation keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss eines neuartigen piezoelektrischen Gerätes, vorgesehen für die Entnahme autologer Knochenspäne von intraoralen Stellen, bezüglich Spanmorphologie, Zellvitalität und Zelldifferenzierung zu untersuchen.

Dafür wurden insgesamt 69 Proben von kortikalen Knochen randomisiert entweder mit einem piezoelektrischen Gerät (PS) oder mit einer metallischen Kugelfräse (MK) entnommen und in einem Knochenfilter gesammelt. Form und Größe der gewonnenen Knochenspäne wurden mittels morphometrischer Analyse erfasst und verglichen. Die auswachsenden Osteoblasten wurden durch Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP), immunhistochemische Färbung auf Osteocalcin (OC) und Analyse der OC Expression auf RNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion charakterisiert.

In 88,9% der MK und 87,9% der PS Proben waren auswachsende Zellen in der Umgebung der Knochenspäne nach 6-19 Tagen zu beobachten. Zellkonfluenz wurde nach 4 Wochen erreicht. Der Nachweis von AP-Aktivität und OC-Expression charakterisierte diese Zellen als Osteoblasten. Die morphometrische Analyse der Proben zeigte ein statistisch signifikant größeres Volumen der Knochenpartikel in der MK Gruppe im Vergleich zur PS Gruppe.

Auf Grundlage der Resultate der vorliegenden Studie kann geschlussfolgert werden, dass sich die untersuchten Knochenentnahmemethoden voneinander bezüglich ihres Einflusses auf die Vitalität des von intraoralen Stellen gewonnenen kortikalen Knochenmaterials nicht unterscheiden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AAP. (2001). Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration. *J Periodontol*, 72: 834-838
- Ballato A. (1995). Piezoelectricity: old effect, new thrusts. *IEEE Transactions*, 42: 916-926
- Berengo M, Bacci C, Sartori M, Perini A, Della Barbera M, & Valente M. (2006). Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. *Minerva Stomatol*, 55: 189-198
- Blay A, Tunchel S, & Sendyk WR. (2003). Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study. *Pesqui Odontol Bras*, 17: 234-240
- Bogdanov SV. (2002). The origin of the piezoelectric effect in pyroelectric crystals. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 49: 1469-1473
- Burchardt H. (1983). The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*: 28-42
- Burchardt H. (1987). Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*, 18: 187-196
- Buser D, Dula K, Hirt HP, & Schenk RK. (1996). Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*, 54: 420-432; discussion 432-423
- Cady WG. (1964). Piezoelectricity. *Dover Book Pub., New York*
- Capelli M. (2003). Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 23: 277-285
- Carrotte P. (2005). Surgical endodontics. *Br Dent J*, 198: 71-79
- Chiapasco M, Abati S, Romeo E, & Vogel G. (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: 278-288
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, & Rutter WJ. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18: 5294-5299
- Chiriac G, Herten, M., Rothamel, D., Becker, J. (2004). Einsatz eines Knochenfilters zur Gewinnung autologer Knochentransplantate. *Oralchirurgie Journal*, 2: 31-35
- Clavero J and Lundgren S. (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: 154-160
- Danckwardt-Lilliestrom G, Lorenzi GL, & Olerud S. (1970). Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl*, 134: 1-78
- Donos N, Kostopoulos L, & Karring T. (2002). Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. *Clin Oral Implants Res*, 13: 185-191
- Drisko CL, Cochran DL, Blieden T, Bouwsma OJ, Cohen RE, Damoulis P, et al. (2000). Position paper: sonic and ultrasonic scalers in periodontics. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J Periodontol*, 71: 1792-1801
- Eggers G, Klein J, Blank J, & Hassfeld S. (2004). Piezosurgery: an ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 42: 451-453

- Ercoli C, Funkenbusch PD, Lee HJ, Moss ME, & Graser GN. (2004). The influence of drill wear on cutting efficiency and heat production during osteotomy preparation for dental implants: a study of drill durability. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19: 335-349
- Eriksson AR and Albrektsson T. (1983). Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent*, 50: 101-107
- Erpenstein H, Diedrich P, & Borchard R. (2001). Preparation of autogenous bone grafts in two different bone mills. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21: 609-615
- Ferguson AB, Jr., Laing PG, & Hodge ES. (1960). The ionization of metal implants in living tissues. *J Bone Joint Surg Am*, 42-A: 77-90
- Fonseca RJ, Clark PJ, Burkes EJ, Jr., & Baker RD. (1980). Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primates. *J Oral Surg*, 38: 572-577
- Gallop PM, Lian JB, & Hauschka PV. (1980). Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med*, 302: 1460-1466
- Garcia OG, Mombiola FL, De La Fuente CJ, Aranguéz MG, Escribano DV, & Martín JV. (2004). The influence of the size and condition of the reamers on bone temperature during intramedullary reaming. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A: 994-999
- Garnero P and Delmas PD. (1997). Bone markers. *Baillieres Clin Rheumatol*, 11: 517-537
- Gertsch P, Pelloni A, Guerra A, & Krpo A. (2000). Initial experience with the harmonic scalpel in liver surgery. *Hepatogastroenterology*, 47: 763-766
- Grasser HH. (1972). [Hazards of metallosis from osteosynthesis materials]. *Dtsch Zahnärztl Z*, 27: 413-422
- Gruber RM, Kramer F.-J., Merten, H., Schliephake, H. (2005). Ultrasonic Surgery- an alternative way in orthognathic surgery of the mandible A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 34: 590-593
- Gundberg CM. (2000). Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med*, 20: 489-501
- Hallman M, Sennerby L, & Lundgren S. (2002). A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17: 635-643
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, & Gundberg CM. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69: 990-1047
- Hickman J, Clarke EG, & Jennings AR. (1958). Structural changes in bone associated with metallic implants. *J Bone Joint Surg Br*, 40-B: 799-803
- Hobkirk JA and Rusiniak K. (1978). Metallic contamination of bone during drilling procedures. *J Oral Surg*, 36: 356-360
- Hoegel F, Mueller CA, Peter R, Pfister U, & Suedkamp NP. (2004). Bone debris: dead matter or vital osteoblasts. *J Trauma*, 56: 363-367
- Hoigne DJ, Stubinger S, Von Kaenel O, Shamdasani S, & Hasenboehler P. (2006). Piezoelectric osteotomy in hand surgery: first experiences with a new technique. *BMC Musculoskelet Disord*, 7: 36
- Horton JE, Tarpley TM, Jr., & Wood LD. (1975). The healing of surgical defects in alveolar bone produced with ultrasonic instrumentation, chisel, and rotary bur. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 39: 536-546

- Horton JE, Tarpley TM, Jr., & Jacoway JR. (1981). Clinical applications of ultrasonic instrumentation in the surgical removal of bone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 51: 236-242
- Kocher T, Ruhling A, Herweg M, & Plagman HC. (1996). Proof of efficacy of different modified sonic scaler inserts used for debridement in furcations--a dummy head trial. *J Clin Periodontol*, 23: 662-669
- Kotrikova B, Wirtz R, Krempien R, Blank J, Eggers G, Samiotis A, et al. (2006). Piezosurgery--a new safe technique in cranial osteoplasty? *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35: 461-465
- Lambrecht JT. (2004). [Intraoral piezo-surgery]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 114: 28-36
- Lea SC, Landini G, & Walmsley AD. (2003). Ultrasonic scaler tip performance under various load conditions. *J Clin Periodontol*, 30: 876-881
- Lindorf H. (2001). Die gebündelte Sacklochbohrung Teil I: Ein Verfahren zur Knochengewinnung mittels Knochenspankollektor aus dem Kieferbereich. *ZMK*, 17
- Lindorf H. (2002). Die gebündelte Sacklochbohrung Teil II: Knochengewinnung mittels Knochenspankollektor im Kieferbereich. *ZMK*, 18
- 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
- McFall TA, Yamane GM, & Burnett GW. (1961). Comparison of the cutting effect on bone of an ultrasonic cutting device and rotary burs. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv*, 19: 200-209
- Metzger MC, Bormann KH, Schoen R, Gellrich NC, & Schmelzeisen R. (2006). Inferior alveolar nerve transposition--an in vitro comparison between piezosurgery and conventional bur use. *J Oral Implantol*, 32: 19-25
- Murat FJ, Lafon C, Cathignol D, Theillere Y, Gelet A, Chapelon JY, et al. (2006). Bloodless partial nephrectomy with a new high-intensity collimated ultrasonic coagulating applicator in the porcine model. *Urology*, 68: 226-230
- Neukam FW. (1990). [Bone transplantation in combination with implants]. *Niedersachs Zahnarztl*, 25: 446-450
- Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, & Neukam FW. (2001). Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*, 12: 495-502
- Nkenke E, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, & Neukam FW. (2002). Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*, 13: 514-521
- Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, & Melsen F. (2002). Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17: 498-506
- Psacioglu H, Atay Y, Cetindag B, Saribulbul O, Buket S, & Hamulu A. (1998). Easy harvesting of radial artery with ultrasonically activated scalpel. *Ann Thorac Surg*, 65: 984-985
- Robiony M, Polini F, Costa F, Vercellotti T, & Politi M. (2004). Piezoelectric bone cutting in multipiece maxillary osteotomies. *J Oral Maxillofac Surg*, 62: 759-761
- Savant TD, Smith KS, Sullivan SM, & Owen WL. (2001). Bone volume collected from dental implant sites during osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg*, 59: 905-907
- Seibel MJ. (2000). Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int*, 11 Suppl 6: S18-29

- Service RF. (1997). Shape-changing crystals get shiftier. *Science*, 275: 1878
- Shapoff CA, Bowers GM, Levy B, Mellonig JT, & Yukna RA. (1980). The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J Periodontol*, 51: 625-630
- Siervo S, Ruggli-Milic S, Radici M, Siervo P, & Jager K. (2004). [Piezoelectric surgery. An alternative method of minimally invasive surgery]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 114: 365-377
- Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Harle F, Hedderich J, & Acil Y. (2004). Particulated bone grafts--effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res*, 15: 205-212
- Steinbrenner H, Ramos MC, Stuhlmann D, Sies H, & Brenneisen P. (2003). UVA-mediated downregulation of MMP-2 and MMP-9 in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 486-491
- Stubinger S, Kuttenberger J, Filippi A, Sader R, & Zeilhofer HF. (2005). Intraoral piezosurgery: preliminary results of a new technique. *J Oral Maxillofac Surg*, 63: 1283-1287
- Stürmer KM TE. (1986). Verminderung der corticalen Gefäßschädigung durch kontinuierliches Spülen und Absaugen während des Aufbohrens der Markhöhle. *Hft Unfallheilkunde*, 181: 236-240
- Sun D, Zhou ZY, Liu YH, & Shen WZ. (1997). Development and application of ultrasonic surgical instruments. *IEEE Trans Biomed Eng*, 44: 462-467
- Takao S, Shinci H, Maemura K, & Aikou T. (2000). Ultrasonically activated scalpel is an effective tool for cutting the pancreas in biliary-pancreatic surgery: experimental and clinical studies. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 7: 58-62
- Taschieri S, Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, & Weinstein R. (2005). Endodontic surgery with ultrasonic retreaters: one-year follow-up. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 100: 380-387
- Tinti C, Parma-Benfenati S, & Polizzi G. (1996). Vertical ridge augmentation: what is the limit? *Int J Periodontics Restorative Dent*, 16: 220-229
- Turunen T, Peltola J, Yli-Urpo A, & Happonen RP. (2004). Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res*, 15: 135-141
- Ullmark G. (2000). Bigger size and defatting of bone chips will increase cup stability. *Arch Orthop Trauma Surg*, 120: 445-447
- Van Belle H. (1972). Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. *Biochim Biophys Acta*, 289: 158-168
- Vercellotti T, De Paoli S, & Nevins M. (2001). The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 21: 561-567
- Vercellotti T. (2004). Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol*, 53: 207-214
- Vercellotti T and Pollack AS. (2006). A new bone surgery device: sinus grafting and periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent*, 27: 319-325
- Whyte MP. (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*, 15: 439-461
- Wlodarski KH and Reddi AH. (1986). Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int*, 39: 382-385
- Young MP, Worthington HV, Lloyd RE, Drucker DB, Sloan P, & Carter DH. (2002). Bone collected during dental implant surgery: a clinical and histological study. *Clin Oral Implants Res*, 13: 298-303

7 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Becker für die Überlassung dieses Themas und für seine Unterstützung während meiner Zeit als Studentin und als Gastärztin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ich möchte Frau Dr. Monika Herten, Herrn Dr. Daniel Rothamel und Frau Brigitte Hartig sehr herzlich für ihre Unterstützung beim Erlernen der Zellkultur und für die ständige Hilfestellung bei den zellbiologischen Arbeiten danken. Insbesondere möchte ich auch Herrn Dr. Daniel Rothamel für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung sehr herzlich danken.

Den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme bin ich zu Dank verpflichtet für die Mitwirkung bei der Gewinnung der Proben.

Ich danke Herrn Dr. Schwarz für die wissenschaftliche Betreuung und Beratung.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine ganze Familie und vor allem an die zwei Männer an meiner Seite, Mircea und Maximilian Chiriac.

8 LEBENS LAUF

Name: Chiriac (geb. Anghel)
Vorname: Gabriela Stanca Doina
Geburtsdatum: 14.07.1977
Geburtsort: Cluj-Napoca, Rumänien
Nationalität: Rumänisch
Konfession: Griech.-katholisch
Eltern: Ion Anghel, Universitätsprofessor- Lehrstuhl für Physiologie
Mihaela Anghel, Zahnärztin
Geschwister: eine Schwester, Ioana
Familienstand: verheiratet
Ehemann: Mircea Teodor Chiriac
Kinder: ein Sohn, Maximilian Anghel Chiriac
Adresse: Str. Alex. Bohatiel nr.3; 400476 Cluj-Napoca, Rumänien
Telefon: +40-746781224
E-mail: gchiriac@gmx.de

SCHULAUSSBILDUNG

1984-1996: Schülerin der deutschen Grundschule und des deutschen Gymnasiums "G. Cosbuc" aus Cluj-Napoca
1996: Erwerb des deutschen Sprachdiploms, verliehen von der ständigen Konferenz der Kultusminister der Länder in der Bundesrepublik Deutschland
Juli 1996: Baccalaureat (Hochschulzugangsberechtigung-Abitur)
September 1996: Bestehen der Aufnahmeprüfung an der Universität für Medizin und Pharmazie "I.Hatieganu" Cluj-Napoca, Fakultät für Zahnmedizin

STUDIUM

1996 -2002: Studium der Zahnmedizin an der Universität „Iuliu Hatieganu“ Cluj-Napoca (Klausenburg), Rumänien
Okt.2000- Febr.2001: Generalsekretärin der European Dental Students Association
Okt. 2001-Febr. 2002: ERASMUS-Semester an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Sept. 2002: Diplomarbeit: „Die Dynamik einiger physiologischen Parameter im Kontext des „zahnärztlichen Stresses““, am Lehrstuhl für Odontologie-Parodontologie der Medizinischen Universität Cluj-Napoca (Betreuer: Prof. Dr. med. dent. A. Pop)
Sept.2002: Lizenzdiplom als „Doktor-Zahnarzt“
Jan. 2003-Okt 2003: Assistenzärztin an der Abteilung für konservative Zahnheilkunde und Parodontologie-Univ. für Medizin und Pharmazie "I. Hatieganu" Cluj-Napoca
Okt. 2002-Sept. 2003: Masterstudium im Fach"Bioinformatik und Biostatistik"-Univ.für Medizin und Pharmazie "I. Hatieganu" Cluj-Napoca

- Sept. 2003: Abschluss als M.Sc. an der "I. Hatieganu"-Universität Cluj-Napoca , mit dem Dissetrtationsthema: „Odontogene Infektionen-ein Risikofaktor für das Auslösen systemischer Infektionskrankheiten“
- Okt.2003-März 2005: DAAD-Forschungsstipendium an der Abteilung für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Leiter: Prof.Dr. J. Becker)

BERUFLICHER WERDEGANG

- November 2002: Staatliche Aufnahmeprüfung zur Facharztausbildung in der allgemeinen Zahnmedizin
- Jan. 2003-Sept. 2003: Assistentärztin an der Universitäts-Zahnklinik Klausenburg, Abteilung für konservative Zahnheilkunde und Parodontologie (Direktor: Prof. Dr. Pop Angela)
- Okt. 2003-März 2005: Assistenzärztin und Doktorandin an der Abteilung für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als DAAD-Stipendiatin
- Juli 2004: Erwerb des Uebungsscheins für Versuchstierkunde
- Seit 01.03.2005: Universitätsassistent an der Abteilung für Odontologie (Direktor: Prof. Dr. Muresan Liviu)
- Oktober 2005: Erwerb des Facharzt-Titels für Allgemeinzahnmedizin