

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dieter Drescher

Volumetrische mikrocomputertomographische Analyse der
Heilungsmuster von Extraktionsalveolen nach Zugabe
verschiedener injizierbarer Knochenfüllmaterialien –
Eine Mikrocomputertomographie-Studie am Hundemodell

Dissertation

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

vorgelegt von
Makbula Agirman

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Kathrin Becker

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Giulia Brunello, PhD

Ji bo malbata min

Zusammenfassung

Die Vermeidung einer Knochenatrophie nach der Extraktion von Zähnen ist von hoher Bedeutung, um die Funktion einer späteren prothetischen Rehabilitation zu gewährleisten. Typischerweise kommt es jedoch bereits in den ersten Wochen nach einer Zahnextraktion zu markanten Knochenumbauvorgängen und einem vertikalen sowie horizontalen Knochenverlust. Tierexperimentelle sowie klinische Studien konnten jedoch zeigen, dass der Hartgewebeschwund durch Augmentation mit einem Knochenersatzmaterial signifikant reduziert werden kann. Auch Sofortimplantationen in eine frische Extraktionsalveole waren mit einem größeren Knochenverlust assoziiert als eine simultane Socket-Preservation mit einem xenogenen Knochenersatzmaterial. Aufgrund einer hohen Osseinduktivität und Osseokonduktivität und der Vermeidung einer Morbidität im Entnahmegebiet, welche mit autologen Knochenblöcken einhergeht, finden xenogene Knochenersatzmaterialien sehr häufig Anwendung. Die Fragestellung dieser Arbeit beinhaltete deshalb, ob injizierbare xenogene hergestellte Nano-Knochenersatzmaterialien ähnlich effektiv, wie xenogene Knochenersatzmaterialien beim Knochenersatz nach Zahnextraktion sind und ob es nach der Heilung Unterschiede in der Knochenmikromorphometrie gibt. Dazu wurden in n=9 Beaglehunden die distalen Zahnwurzeln der unteren Prämolaren entfernt und die sechs Extraktionsalveolen zufällig wie folgt versorgt: mit je einem von vier verschiedenen Nano-Knochenfüllern (Bio Flow M2L plus Eigenblut [T1], Bio Flow M2L plus Kochsalzlösung [T2], einem injizierbaren Kollagenfüller *ready-to-use* Bio Flow M4rtu [T3], Bio Flow M4L plus Speichel [T4]), mit einem xenogenen Knochenersatzmaterial und zuletzt eine Alveole leer belassen (N) Sham-Operation. Die mesiale Wurzel wurde devitalisiert und belassen. Nach 12 Wochen wurden die Proben entnommen, in Methylmethacrylat eingebettet und mit einem Mikro-CT gescannt. Die computergestützte Evaluation umfasste folgende Schritte: (1) Ausrichtung der Datensätze entlang der Wurzelachse, (2) Segmentierung des Knochengewebes / Definition eines geeigneten Schwellwerts, (3) Definition standardisierter Volumes of Interest (VOIs) für die morphometrische Analyse des augmentierten Areal und (4) Vermessung der bukkalen und lingualen Kompaktadicke auf verschiedenen Höhen im augmentierten Areal und in einer Referenz-Region (mesiale Wurzel). Die linearen Messungen ergaben in allen Gruppen eine vergleichbare bukkale Kortikalisdicke. Die vertikale Knochenhöhe war in der Gruppe T3 tendenziell erhöht. Die approximative Bestimmung des bukkalen Knochenverlusts zeigte eine hohe Variabilität, welche in der Gruppe T3 am schwächsten ausgeprägt war. Die Knochenfraktion (*Bone Volume/Tissue Volume*) war zwischen allen Gruppen vergleichbar, jedoch in den Gruppen T1 und T4 tendenziell erniedrigt. Die trabekuläre Dicke war in Gruppe T3 tendenziell am höchsten und in der BioOss® sowie der Sham-Gruppe tendenziell niedriger. Insbesondere war die intra-sample Variabilität der trabekulären Dicke in der Gruppe T3 deutlich geringer als in den anderen Gruppen. Unter den Limitationen eines Tierexperiments und einer geringen Fallzahl bestätigen die vorliegenden Daten die Hypothese, dass synthetische nano-Knochenersatzmaterialien der xenogenen Kontrolle nicht unterlegen sind. Die höchste Vorhersagbarkeit (geringste Streubreite) und tendenziell höchste Knochenhöhe konnte mit dem Material Bio Flow M2rtu erzielt werden.

Summary

The prevention of bone atrophy after tooth extraction is of high importance to ensure the function of subsequent prosthetic rehabilitation. Typically, however, marked bone remodeling processes and vertical as well as horizontal bone loss occur already in the first weeks after tooth extraction. However, animal and clinical studies have shown that hard tissue loss can be significantly reduced by augmentation with a bone graft substitute. Immediate implant placement into a fresh extraction socket was also associated with greater bone loss than simultaneous socket preservation with a xenogeneic bone graft substitute. Due to high osseointegrability and osteoconductivity and the avoidance of morbidity in the extraction site associated with autologous bone blocks, xenogeneic bone graft substitutes are widely used. Recent studies suggested that similarly good bone preservation after tooth extraction can also be achieved using a synthetically produced nano-bone substitute. Nevertheless, further studies are needed to compare the exact healing patterns and to investigate the osteoconductivity of synthetic nano-fillers. Thus, the question of this work is whether injectable xenogeneic produced nano-fillers are similarly effective as xenogeneic bone substitutes in bone preservation after tooth extraction and whether there are differences in bone micromorphometry after healing. For this purpose, in n=9 beagle dogs, the distal roots of the lower premolars were removed and the six extraction sockets were randomly restored as follows: (A) with one of each of four different nano-bone fillers (Bio Flow M2L plus autologous blood [T1], Bio Flow M2L plus saline [T2], an injectable collagenfiller ready-to-use Bio Flow M4rtu [T3], Bio Flow M4L plus saliva [T4]), (C) with a xenogeneic bone graft substitute (BioOss®), and lastly one socket left empty (N) Sham surgery. The mesial root was devitalized and left in place. After 12 weeks, specimens were harvested, embedded in methylmethacrylate and scanned with a micro-CT. Computer-assisted evaluation included the following steps: (1) alignment of the datasets along the root axis, (2) segmentation of the bone tissue/definition of an appropriate threshold, (3) definition of standardized volumes of interest (VOIs) for morphometric analysis of the augmented area, and (4) measurement of buccal and lingual compact thickness at different heights in the augmented area and in a reference region (mesial root). Statistical analysis was performed using R. Linear measurements revealed comparable buccal cortical thickness in all groups. Vertical bone height tended to be increased in group T3. Approximate determination of buccal bone loss showed high variability, which was weakest in group T3. Bone fraction (bone volume/tissue volume) was comparable between all groups, but tended to be decreased in groups T1 and T4. Trabecular thickness tended to be highest in group T3 and tended to be lower in the Bio-Oss and Sham groups. Notably, the intra-sample variability of trabecular thickness was significantly lower in group T3 than in the other groups.

Abkürzungsverzeichnis

AB	autologer Knochenblock
ARP	<i>Alveolar ridge preservation</i>
ASBMR	<i>Association of Bone and Mineral Research</i>
BB	<i>Bundle bone</i> ; Bündelknochen
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein
BS/BV	<i>Specific bone surface</i> ; Spezifische Knochenoberfläche
BV	<i>Bone volume</i> ; mineralisiertes Knochenvolumen
BV/TV	<i>Bone volume fraction</i> ; Knochenvolumenfraktion
Dens.	<i>Connectivity density</i> ; Konnektivitätsdichte
DBBA	<i>Deproteinized bovine bone mineral</i> ; Deproteinisierter mineralisierter Knochen
DVT	Digitale Volumentomographie
DFDBA	Demineralisierter allogener Knochen
ePTFE	Polytetrafluorethylen
FDBA	<i>Freeze Dried Bone Allograft</i> ; Mineralisierter allogener Knochen
FOV	<i>Field of View</i> ; Rekonstruktionsfeld
GBR	<i>Guided bone regeneration</i> ; Gesteuerte Knochenregeneration
HA	Hydroxylapatit
IQR	Interquartilsabstand
ISQ	<i>Image Sequence File</i> (proprietärer Datentyp der Firma Scanco Medical AG, Brüttsellen, Schweiz)
KEM	Knochenersatzmaterial
keV	Kiloelektronenvolt
Max	Maximum
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
Min	Minimum
MW	Mittelwert
NHA	Nano-Hydroxylapatit
PMMA	Polymethylmethacrylat
PDL	Parodontales Ligament
Tb. N	<i>Trabecular number</i> ; Durchschnittliche Trabekelanzahl pro Millimeter
Tb. Sp	<i>Trabecular separation</i> ; Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand
Tb. Th	<i>Trabecular thickness</i> ; Durchschnittliche Trabekeldicke
TCP	<i>Tricalcium phosphate</i> ; Trikalziumphosphat

TV	<i>Tissue volume</i> ; Nicht-mineralisiertes Knochenvolumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factors</i> ; Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren
VOI	<i>Volume of Interest</i> ; Umfang des Interesses

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zahnextraktionsschema	22
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Prämolaren bei einem Beaglehund	23
Abbildung 3: Klinisches Bild der Hemisektion des Prämolaren	24
Abbildung 4: Extraktion der distalen Wurzel	24
Abbildung 5: Devitalisierung der mesialen Wurzel	25
Abbildung 6: Schematische Übersicht über die Injektion des Knochenersatzmaterials sowie der Devitalisierung des Prämolaren im Sinne einer Hemisektion	26
Abbildung 7: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T1: Bio Flow M2L (gemischt mit Eigenblut) 752_R_P4	26
Abbildung 8: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T2 Bio Flow M2L (gemischt mit Eigenspeichel) 617_L_P2	27
Abbildung 9: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T3 ready-to-use Bio Flow M2rtu (T3)	27
Abbildung 10: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T4 Bio Flow M4L (gemischt mit Eigenspeichel) 324_L_P4	28
Abbildung 11: xenogenes Knochenersatzmaterial (BioOss®) (C)	28
Abbildung 12: Datensatz nach Ausrichtung der Achsen rot: Z-Achse, blau: X-Achse, grün: Y-Achse, grüner Bereich: Bereich der Augmentierten Alveole und Volume of Interest (VOI), roter Bereich: Augmentationsgranulat	31
Abbildung 13: Schema-Zeichnung zur Berechnung der horizontalen Ausdehnung des Granulats auf 50 % der Defekthöhe (entspricht der im Mikro-CT-Scan erkennbaren Granulathöhe). In der Sham-Gruppe wurde (da kein Granulat vorhanden war) der Bereich im Scan noch erkennbarer Knochenremodellierung erfasst und analog die 50%-ige Defekthöhe bestimmt	33
Abbildung 14: Messung der kortikalen Dicke bukkal auf 50% der Defekthöhe	34
Abbildung 15: Messung der kortikalen Dicke oral auf 50% der Defekthöhe	34
Abbildung 16: Roter Pfeil zeigt auf Apexbeginn auf der Z-Achse	35
Abbildung 17: Granulat am apikalsten Punkt des Augmentationsbereichs	35

Abbildung 18: Granulat am koronalsten Punkt des Augmentationsbereichs	36
Abbildung 19: 3D Auswertung der Probe; „0“ und „zentral“	37
Abbildung 20: Darstellung der Defekteinzeichnung	37
Abbildung 21: Knochenhöhe (mm)	40
Abbildung 22: Höhe des Bereichs mit Wundheilung (mm)	42
Abbildung 23: Kortikale Dicke bukkal (mm)	44
Abbildung 24: Kortikale dicke oral (mm)	46
Abbildung 25: Granulatlokalisierung	48
Abbildung 26: Ergebnisse der Messung der residuellen Gesamtdefekte zusammengefasst im Boxplot (in Voxeln)	49
Abbildung 27: Ergebnisse der Messung der Knochenfraktion (BV/TV) im VOI	51
Abbildung 28: Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th. in mm)	53
Abbildung 29: Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand (Tb.Sp.)	55
Abbildung 30: Spezifische Knochenoberfläche (mm^2/mm^3)	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Knochenhöhe (mm)	41
Tabelle 2: Höhe des Bereichs mit Wundheilung (mm)	43
Tabelle 3: Kortikale Dicke bukkal (mm).....	45
Tabelle 4: Kortikale Dicke oral (mm)	47
Tabelle 5:Granulatlokalisierung	48
Tabelle 6: Ergebnisse der Messung der residuellen Gesamtdefekte (in Voxel).....	50
Tabelle 7: Ergebnisse der Messung der Knochenfraktion (in %).....	52
Tabelle 8: Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb. Th. in mm).....	54
Tabelle 9: Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand (Tb. Sp. in mm).....	56
Tabelle 10: Spezifische Knochenoberfläche (mm ² /mm ³)	58

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ÄTIOLOGIE LATERALER KIEFERKAMMDEFEKTE.....	1
1.2	AUGMENTATIONSTECHNIKEN	3
1.3	KNOCHENERSATZMATERIALIEN.....	4
1.3.1	<i>Autologer Knochen</i>	5
1.3.2	<i>Allogene KEM</i>	6
1.3.3	<i>Xenogene KEM</i>	7
1.3.4	<i>Alloplastische (synthetische) KEM</i>	7
1.4	METHODEN ZUR STRUKTURANALYSE.....	9
1.4.1	<i>Histologie</i>	9
1.4.2	<i>(Mikro-)Computertomographie</i>	10
1.4.3	<i>Histologie und Mikrocomputertomographie im Vergleich</i>	11
1.5	AUFBAU EINES MIKRO-CT	12
1.5.1	<i>Physikalisch-technische Grundlagen</i>	13
1.5.2	<i>Bilderkonstruktion</i>	14
1.5.3	<i>Bildbearbeitung (Image Processing)</i>	15
1.5.4	<i>Quantitative Analysen</i>	16
1.6	ZIELE DER ARBEIT	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	STUDIENDESIGN.....	19
2.1.1	<i>Tiere</i>	19
2.1.2	<i>Augmentationsmaterialien</i>	20
2.2	METHODE	21
2.2.1	<i>Studiendesign und Operationsprotokoll</i>	21
2.2.2	<i>Augmentation der Defekte</i>	25
2.2.3	<i>Nachsorge</i>	29
2.2.4	<i>Entnahme und Aufbereitung der Biopsien</i>	30
2.3	MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE-SCANS.....	30
2.4	DREIDIMENSIONALE ANALYSE DER DATENSÄTZE	30
2.4.1	<i>Ausrichtung der Datensätze entlang der Zahnachse (Z-Achse)</i>	31
2.4.2	<i>Bestimmung des Volumes of Interest</i>	32
2.4.3	<i>Filterung und Schwellwertbestimmung (Segmentierung)</i>	32
2.4.4	<i>Lineare Messungen</i>	33
2.4.5	<i>Knochenmikromorphometrie im Volume of Interest</i>	34

2.4.6	<i>Anwesenheit von Granulatresten außerhalb des augmentierten Bereiches</i>	36
2.4.7	<i>Volumetrische Messung des bukkalen Knochendefektes</i>	37
2.5	STATISTISCHE ANALYSE	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE-ANALYSE	39
3.2	LINEARE MESSUNGEN	39
3.2.1	<i>Vergleich der Knochenhöhe</i>	39
3.2.2	<i>Wundheilung (Höhe)</i>	41
3.2.3	<i>Vergleich der kortikalen Dicke bukkal</i>	43
3.2.4	<i>Vergleich der kortikalen Dicke oral</i>	45
3.2.5	<i>Granulatlokalisierung</i>	47
3.3	VOLUMETRISCHE MIKROMORPHOMETRISCHE ANALYSEN	48
3.3.1	<i>Anteil des horizontalen Knochendefektvolumens (mm³)</i>	48
3.3.2	<i>Knochenfraktion (BV/TV)</i>	50
3.3.3	<i>Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb. Th.)</i>	52
3.3.4	<i>Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand (Tb. Sp.)</i>	54
3.3.5	<i>Spezifische Knochenoberfläche (BS/BV)</i>	56
4	DISKUSSION	59
4.1	DISKUSSION DER METHODIK MITTELS MIKRO-CT	59
4.2	EINFLUSS DES AUGMENTATIONSMATERIALS AUF DIE KNOCHENMIKROSTRUKTUR DER DEFECTBEREICHE	62
4.3	LIMITATIONEN	66
4.4	FAZIT	67
	LITERATURVERZEICHNIS	68

1 Einleitung

Heutzutage gelten dentale Implantate als eine etablierte Methode, um sowohl herausnehmbaren als auch festen Zahnersatz in der zahnärztlichen Praxis zu befestigen. Der Begriff der Osseointegration, welcher die direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen der Oberfläche des Implantats und dem angrenzenden lebenden Knochengewebe beschreibt, hat ihre Bedeutung im Laufe der Zeit stetig erhöht (Schroeder, 1976; Branemark, 1983). Die Osseointegration gilt als das Hauptkriterium für eine erfolgreiche Stabilität eines Implantats und ist somit einer der wichtigsten Faktoren für den Langzeiterfolg. Seit der offiziell wissenschaftlichen Anerkennung der Implantation durch die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) im Jahre 1982 ist die Behandlungsmethode nicht mehr wegzudenken. Jährlich werden etwa 1,3 Millionen Implantate in Deutschland inseriert (DGI, 2018). Viele langfristige retrospektive Studien und systematische Übersichten, die Zeiträume von 8 bis 15 Jahren abdeckten, haben Überlebensraten von dentalen Implantaten im Bereich von 82,9% bis 95% nachgewiesen (Lindquist, 1996; Buser, 1997; Lambrecht et al., 2003, Daubert et al. 2015).

1.1 Ätiologie lateraler Kieferkammdefekte

Es wurden nach und nach sowohl die Implantateinheilung sowie deren Einflussfaktoren weitestgehend untersucht und verstanden, wobei vor allem anfangs periimplantäre Erkrankungen weniger berücksichtigt wurden (Buser, 1997). So erschwert ein unzureichendes Knochenangebot im Sinne eines ungesunden periimplantären Implantatlagers einen entsprechenden Langzeiterfolg. Für eine Knochenatrophie gibt es eine Reihe von Ursachen. Zu den funktionellen Faktoren gehören prothetische sowie chirurgische Faktoren wie z.B. Zahnextraktionen. Weitere Einflussfaktoren sind entzündliche Prozesse wie eine Parodontitis, vorhergegangene Periimplantitis oder andere lokale Entzündungen (McCaul et al., 2001). Ein Zahnverlust durch systemische oder metabolische Ursachen, sowie Tumoren oder Zysten sind hier ebenfalls zu nennen (Jerosch et al., 2002). Diese führen durch Resorptionsvorgänge zu einer Kompromittierung des Knochens und des darum liegenden Weichgewebes sowohl auf funktioneller, als auch ästhetischer Ebene (Cardaropoli, 2003; Fick et al., 2008; Cheung et al., 2011). Schon im Jahr 1988 entdeckte das Forscherteam um Cawood et al., dass innerhalb von zwei Jahren ohne funktionelle

Belastung des Kieferkamms ein Verlust der Alveolarkammhöhe um bis zu 60% eintreten kann (Cawood, 1988). Am auffälligsten stellt sich eine ausgeprägte Resorption im Bereich der bukkalen Knochenlamelle dar, die besonders innerhalb 8-12 Wochen nach Zahnextraktion aufzuzeichnen war (Schropp et al., 2003; Araujo & Lindhe, 2005). Sechs Monate post extractionem konnte ein horizontaler Knochenabbau von 29-63% verzeichnet werden (Schropp et al., 2003; Tan et al., 2012). Wie ein solcher Knochenumbau von statten geht, wird in einer Studie von Cardaropoli und Kollegen untersucht (Cardaropoli, 2003). Gezeigt wird dieser Heilungsprozess in Extraktionsalveolen von Hunden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Heilungsphase wurden Biopsien entnommen, welche anschließend einer histologischen Untersuchung vollzogen wurden. In diesen 6 Monaten konnte die Heilung der Alveole in folgende Phasen unterteilt werden: Nach Extraktion des Zahnes ist direkt ein Blutkoagulum zu erkennen, worum nach drei Tagen Granulationsgewebe zu erkennen ist. Ab dem siebten Tag bildet sich postoperativ eine provisorische Matrix aus pluripotenten Zellen, Blutgefäßen und kollagenen Fasern. Nach vier bis sechs Wochen ist ein Epithel im Sinne eines Wundverschlusses zu erkennen und etwa sechs bis acht Wochen nach Extraktion auch Geflechtknochen erkennbar. Nach drei Monaten konnte die Bildung eines kortikalen Kieferkamms festgestellt werden, und der schrittweise Ersatz von Geflechtknochen durch Lamellenknochen sowie eine vermehrte Durchdringung mit Knochenmark war bis zum 180. Tag nach der Operation zu beobachten. Bereits 2 Wochen nach der Extraktion konnte kein Bündelknochen (BB) mehr nachgewiesen werden (Cardaropoli, 2003; Araujo & Lindhe, 2005). Ein zentraler Bestandteil des Parodontiums ist der Bündelknochen, der die innere Knochenschicht der Zahnalveole bildet. Der BB ist von den parodontalen Fasern (Sharpey'schen Fasern) durchzogen und dienten der Versorgung des BB. Die oralen Anteile der Alveole setzen sich im Wesentlichen aus einer dünnen Schicht BB und Lamellenknochen zusammen, wobei der bukkale Anteil des Alveolarknochens jedoch hauptsächlich aus BB besteht. Das Risiko einer Resorption der bukkalen Lamelle im Sinne eines Bone remodellings ist somit also stark erhöht. Folglich wird nach einer Zahnextraktion die Blutversorgung des Bündelknochens unterbrochen, was dazu führt, dass er seine Funktion verliert. Osteoklasten, welche bereits eine Woche post extractionem nachgewiesen werden können, führen folglich zum Abbau des Knochens und weiter zum Weichgewebseinfall (Araujo & Lindhe, 2005). Ferner wird durch den Einfall des Weichgewebes in die Alveole die Knochenneubildung weiter beeinträchtigt, da weiterer Raum eingenommen wird. Dies führt zu einer Kompromittierung der bukko-oralen

Kieferkammausdehnung. Es folgt eine Verschiebung der Kieferkammmittle nach oral (Pietrokovski, 1967; Fickl et al., 2008).

1.2 Augmentationstechniken

Um den defizitären Kieferknochen wieder für eine Implantation vorzubereiten, ist eine Wiederherstellung der Knochendimension notwendig. Knochenaufbauende Maßnahmen sind in der Zahnmedizin sehr vielseitig und bilden eine fundamentale Möglichkeit, um vor allem die häufig anzutreffenden Kieferkammdefekte in der seitlichen Mandibula wiederherzustellen. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten, welche im nachfolgenden Abschnitt näher beleuchtet werden sollen.

Zu den bewährten Methoden zum Aufbau von lateralen Kieferkammdefekten gehören die laterale autologe Knochenblocktransplantation, das Bone Splitting oder Bone Spreading (osteoplastische Techniken) sowie die gesteuerte Knochenregeneration (GBR, engl.: Guided-Bone-Regeneration).

Für ausgedehnte Defekte ist hier vor allem die autologe Knochenblocktransplantation zu nennen (Von Arx, 2001). Insbesondere bei einer Alveolarkammbreite von unter 3 mm gilt diese Methode als Mittel der Wahl. In diesem Prozess wird in einem zweistufigen Verfahren, bei dem zwischen der Augmentation und der Implantation ein zeitlicher Abstand von drei bis vier Monaten liegt, vorgegangen (Khoury & Hanser, 2009). Der Knochenblock wird aus der Spenderregion transplantiert und das Augmentat anschließend in den gleichen Organismus implantiert. Als ausschlaggebenden Nachteil ist hier die Morbidität in Spenderregion, sowie Transplantatresorption zu nennen (Nkenke et al., 2001; Nkenke & Neukam, 2014; Khan et al., 2015). Aber die osteoplastischen Verfahren haben auch Einschränkungen. Demnach ist das Bone Spreading ausschließlich bei einer Kieferkammbreite von 4 bis 6 mm und einer Kieferkammhöhe von 6 bis 10 mm angezeigt. Dabei wird der verbliebene Kieferkamm in zwei Teile geteilt und aufgespreizt. Bei dem Bone Splitting ist eine Breite von 2,5 bis 3 mm und eine Höhe von mindestens 10 mm und ausreichend spongiösem Knochen notwendig (Jerosch et al., 2002). Ein Augmentationsverlust könnte durch eine Fraktur der bukkalen Knochenlamelle oder etwa den Verlust seiner Ernährung zu Stande kommen (McAllister & Haghghat, 2007). Doch im Vergleich zum autologen Knochenblock ist eine geringere Operationsdauer nötig und auch der zweite Operationsbereich der Spenderregion fällt weg, was letztlich zu einer geringeren

Morbidität führt. Die GBR beschreibt die Abdeckung der Defekte mittels zelloklusiver Membranen. Somit kann im Sinne einer gesteuerten Knochenregeneration neuer Knochen gebildet werden, ohne dass Weichgewebe in die Extraktionsalveole migriert (Linde et al., 1993). Hier können für tierische Membranen eine gute Weichgewebsantwort beobachtet werden, was sich wiederum negativ auf die Barrierefunktion auswirkt. Bei den Kollagenmembranen ist eine sekundäre Epithelialisierung möglich, was zu einer besseren Regeneration des Wundgebiets führt (Rothamel, 2012). Bei der Verwendung von synthetischen Membranen, insbesondere jenen aus Polytetrafluorethylen (e-PTFE), wurden Entzündungsreaktionen im Weichgewebe registriert (McAllister & Haghighat, 2007). Aufgrund der Nichtresorbierbarkeit von ePTFE muss die Membran in einem weiteren chirurgischen Eingriff entfernt werden. Untersuchungen dokumentieren einen Anstieg der Breite des lateralen Kieferkamms um 2 bis 4,5 mm nach einer Augmentation durch GBR. Für eine erfolgreiche Primärstabilität sind etwa 1,8 bis 2,0 Millimeter Knochen notwendig. Insgesamt kann man bei den aufgeführten Augmentationstechniken Überlebensraten von 97,4-100% für Implantate erwarten.

1.3 Knochenersatzmaterialien

Eine weitere Möglichkeit, laterale Kieferkammdefekte zu rekonstruieren besteht in der Nutzung von Knochenersatzmaterialien (KEM). Die Hauptaufgabe eines Knochenersatzmaterials besteht darin, mechanische Unterstützung zu bieten und die Knochenregeneration zu stimulieren. Daher sollte ein ideales Knochenersatzmaterial folgende Eigenschaften haben, um die Knochenregeneration zu unterstützen:

- Osteogenese
- Osteokonduktivität
- Osteoinduktivität

Zudem sollte ein Material, was in den Organismus eingebracht wird, unbedingt biokompatibel sein. Die Resorbierbarkeit des Materials spielt eine wichtige Rolle, muss aber nicht zwangsläufig erfüllbar sein. Es gibt kaum ein ideales Knochenersatzmaterial, welches alle Kriterien erfüllt. Es reicht aus, wenn mindestens einer der Kriterien Osteogenese, -konduktivität oder – induktivität erfüllbar ist. Umso mehr Eigenschaften das Material aufweist, als desto besser gilt es.

Osteogenese bezeichnet den Prozess, bei dem durch lebende Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen, die im Transplantationsmaterial enthalten sind, neuer Knochen gebildet wird (Giannoudis et al., 2005; McAllister & Haghigat, 2007). Ein Knochenersatzmaterial, welches osteokonduktiv ist, enthält eine bioaktive Matrix für proliferierende Gefäße und Osteoblasten, um eine Leitstruktur für neuen Knochen zu bilden (Zerbo et al., 2005). Die Osteoinduktivität bezeichnet die Fähigkeit, gewebständigen pluripotenten Mesenchymzellen zu stimulieren, um in der Transplantationsstelle in knochenbildende Osteoblasten umgewandelt zu werden (Artzi et al., 2005). Lokal beeinflussen Proteine und andere Faktoren wie zum Beispiel Platelet-derived Growth Factors (PDGFs), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) und transformierende Wachstumsfaktoren (TGFs) diesen Prozess (Zhao et al., 2021). In der Zahnmedizin wird die Klassifizierung von Knochenersatzmaterialien nach deren Herkunft, strukturellen Merkmalen oder chemischer Zusammensetzung vorgenommen. Knochenersatzmaterial kann somit autogen (eigener), allogene (von einem anderen Individuum), xenogen (tierisch) oder alloplastisch (synthetisch) sein.

1.3.1 Autologer Knochen

Autologer Knochen ist der einzige Knochen, welcher die Kriterien Osteogenese, -konduktivität, und -induktivität kombiniert und somit als Goldstandard gilt. Entnahmestellen können intraoral oder extraoral sein. Beispiele sind die Symphyse, der Ramus mandibularis, der äußere Kieferkamm, der Beckenkamm, die proximale Ulna oder der distale Radius. Diese rufen somit im Regelfall keine immunologischen Reaktionen hervor. Auch herrschen keine Probleme in der Histokompatibilität und damit haben autologe KEM den höchsten Grad an biologischer Sicherheit (Bhatt & Rozental, 2012). Doch einige Nachteile mit den Autotransplantaten sind zu nennen; so ist einmal eine Verletzung an der Donorstelle und das Potential für eine Narbenbildung zu nennen. Bei Entnahmen aus der Kinnregion wurden postoperativ in 10-50% der Fälle Hypästhesien, Parästhesien oder Sensibilitätsverluste beobachtet (Nkenke et al., 2001). Zudem werden sie mit höheren chirurgischen Kosten in Verbindung gebracht, mit mehr erheblichen chirurgischen Risiken wie zum Beispiel Blutungen, Infektionen, Entzündungen und Schmerzen (Kurz, 1989). Die Spongiosa wird sehr häufig für eine autologe Knochenaugmentation verwendet, da sie Osteoblasten und Vorläuferzellen mit beträchtlichem osteogenen Potential aufweist und

durch ihre große trabekuläre Oberfläche eine osteoinduktive Umgebung durch Revaskularisierung und Inkorporation in die Empfängerstelle fördert (Roberts & Rosenbaum, 2012). Studien zeigen, dass ein Volumenverlust infolge von Resorptionen häufig vorkommt. Es wurde berichtet, dass die Resorptionsraten für Transplantate vom Beckenkamm durchschnittlich bei 50% liegen, während sie für intraorale Knochentransplantate bis zu 25% erreichen (Nkenke & Neukam, 2014). Folglich ist bei etwa 11% der behandelten Defekte eine zusätzliche Augmentation im Rahmen der Implantation erforderlich (Atwood, 1971; Jensen & Terheyden, 2009). Insgesamt werden autologe Knochentransplantate trotz neuer Methoden routinemäßig verwendet, vor allem bei komplexeren Augmentationsverfahren wie beispielsweise zur Rekonstruktion des zahnlosen Kieferkammes im posterioren Unterkiefer (Pikos, 2000; Misch, 2010).

1.3.2 Allogene KEM

Die vorrangige Alternative zu einem Autograft bilden allogene KEM. Diese stammen entweder von einem lebenden, kompatiblen Spender oder von einem Verstorbenen und weisen überwiegend osteokonduktive sowie potenziell osteoinduktive Eigenschaften auf. Aufgrund des strengen Transplantationsgesetzes, welches am 1. Dezember 1997 in Kraft getreten ist, sind allografte KEM aufgrund der immunologischen Relevanz im Sinne einer Host versus graft Reaktion in Deutschland bislang nur unter strengen Aufreinigungsprozessen zugelassen (BGBl. I S. 2754, 2802). Allogene KEM unterliegen in Deutschland dem Arzneimittelgesetz (§3 Ziffer 2) und müssen vor Anwendung eine aufwendige chemische Dezellularisierung durchlaufen.

Üblicherweise sind Allografte hauptsächlich in zwei Formen verfügbar: als mineralisiertes (FDBA) und als demineralisiertes oder gefriergetrocknetes (DFDBA) Material (Mollen, 2014). Frische und gefrorene Allograftmaterialien besitzen weitestgehend osteoinduktive Eigenschaften, sind aber heutzutage aufgrund des höheren Risikos einer immunogenen Reaktion des Wirtes selten in Verwendung, haben eine begrenzte Lagerfähigkeit und ein erhöhtes Risiko der Krankheitsübertragung. Die Weiterverarbeitung von allogenen KEM durch Gefriertrocknung kann die Haltbarkeit des Materials erhöhen und die Immunogenität verringern, auch wenn dies auf Kosten eines verringerten osteoinduktiven Potenzials geschieht. Zudem nimmt die strukturelle Festigkeit und die Fähigkeit zur Osseointegration ab. Insgesamt hat die Verwendung von allogenen Knochenersatzmaterialien in den letzten

Jahren zugenommen, da so große Komplikationen, die beispielsweise bei autologen Knochentransplantationen auftreten können. Als negative Punkte sind jedoch das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten wie zum Beispiel HIV und Hepatitis B und C zu nennen. Durch verschiedene Gewebeerarbeitungen wie Sterilisation, mechanisches Debridement, Ultraschallwäsche und Gammabestrahlung können diese Risiken abgeschwächt werden (Giannoudis et al., 2005; Kao & Scott, 2007). In Kombination mit xenogenen KEM haben allogene KEM gute Ergebnisse für die Verwendung bei der GBR aufzeigen können.

1.3.3 Xenogene KEM

Xenogene Knochenersatzmaterialien haben ihren Ursprung in nicht humanen Spezies und besitzen osteokonduktive Eigenschaften. Sie sind häufig equiner (vom Pferd), porciner (vom Schwein) oder boviner (vom Rind) Herkunft. Zu dem bekanntesten, xenogenen KEM zählt das vom Rind stammende BioOss® (Geistlich Pharma AG mbH, Wolhusen, Schweiz), welches sehr häufig genutzt wird. Die deproteinisierte, mineralisierte Form (DBBM, engl.: *deproteinized bovine bone mineral*) ähnelt stark dem menschlichen Knochen und kann somit eine gute mechanische Unterstützung bieten und die Knochenheilung durch Osteokonduktion stimulieren. Durch die poröse, vergrößerte Oberfläche wird das Wachstum neuer Blutgefäße über eine Angiogenese unterstützt. Dennoch konnten Araujo et al. zeigen, dass die Knochenheilung durch Ummauerung der BioOss® Partikel von Entzündungsgewebe verzögert stattfinden (Araujo et al., 2009).

1.3.4 Alloplastische (synthetische) KEM

Alloplastische KEM werden aus biokompatiblen Keramiken wie Hydroxylapatit (HA), Kalziumphosphatzementen wie Trikalziumphosphat (TCP, engl.: *tricalcium phosphate*), Bioglas, Metallen und Polymeren wie Polymethylmethacrylat (PMMA) hergestellt. Ziel hierbei ist es, potenzielle Immunogenität und Morbidität an den entsprechenden Spenderstellen zu vermeiden und möglichst nah an den biologischen Eigenschaften von natürlichem Knochen zu kommen. Dennoch besitzen sie, wie die xenogenen KEM, lediglich osteokonduktive Eigenschaften. Synthetisches Hydroxylapatit hat aufgrund seines relativ hohen Ca/P- Verhältnisses eine verzögerte Resorptionsrate. Außerdem zeigt HA eine relativ

geringe mechanische Belastung, wodurch es für Insertionsorte mit möglichst geringer Belastung geeignet ist. Weiter enthält synthetisches HA keine Spuren von Na^+ , Mg^{2+} , K^+ und Sr^{2+} , welche im natürlichen HA vorhanden sind und verschiedene biologische Reaktionen positiv beeinflusst. So regt beispielsweise Mg^{2+} über eine Signalkaskade die Produktion von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF, engl.: *vascular endothelial growth factors*) an und sorgt somit zu einer verbesserten Durchblutung im Defektbereich. Weiter fördert das im HA enthaltene Sr^{2+} die Aktivität knochenbildender Osteoblastenzellen und hemmt gleichzeitig die Osteoklasten (Wang & Yeung, 2017). Aktuellere Studien zeigen jedoch Fortschritte bei HA- basierten KEM in nanokristalliner Struktur. Dies soll verbesserte biomechanische Eigenschaften zeigen und dem natürlichen Knochen ähneln. Das nanogroße KEM entspricht viel eher der extrazellulären Knochenmatrix. Dadurch wird eine schnellere Reaktion auf Reize sowie eine verbesserte Lieferung und kontrollierte Freisetzung bioaktiver Moleküle wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren gewährleistet. Dies bedeutet wiederum eine verbesserte Knochenregeneration (Wang et al., 2012). Durch die Nanostruktur ist ein größeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen möglich. Dadurch ist eine effektivere Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen gewährleistet. Die mechanischen Eigenschaften und verbesserte Bruchzähigkeit werden durch Verdichtung erreicht (Kattimani et al., 2016).

Eine weiteres weit verbreitetes KEM in der Zahnmedizin ist das TCP. Es besitzt zwei Formen; α -TCP und β -TCP. Das β -TCP ist die gängige Struktur zur Förderung des Knochenaufbaus im oralen Bereich. Im Vergleich zu HA ist das Ca/P-Verhältnis bei β -TCP geringer und führt somit zu einem schnelleren biologischen Abbau und einer schnelleren Absorption. Besonders hervorzuheben sind die einfache Applizierbarkeit sowie Röntgenopazität des β -TCP, was eine Überwachung der Heilung ermöglicht. Durch die makroporöse Struktur wird das fibrovaskuläre Einwachsen und die osteogene Zelladhäsion begünstigt. Im Vergleich zu Rinderknochenimplantaten wurden eine bessere Resorbierbarkeit und geringe Immunogenität im Sinne eines geringeren Risikos der Krankheitsübertragung festgestellt (Kao & Scott, 2007). Die verbundene, poröse Struktur von β -TCP erlaubt zwar eine verbesserte Vaskularisierung, führt aber auch zu einer schlechteren mechanischen Festigkeit bei Belastung (Hsu et al., 2017; Haugen et al., 2019). Bislang waren β -TCP eher als Füllstoffe bei Knochendefekten und morphologischen Bereichen wie beispielweise für die Reparatur von parodontalen oder periapikalen Defekten

bekannt (Stavropoulos et al., 2010). Neuere Studien der Arbeitsgruppe von Janssen et. al. untersuchten die Anwendung von β -TCP bei Patienten mit unilateralen Spalten- und Gaumendefekten und konnten auch nach einem Jahr postoperativ einen Erhalt von 65% Knochenvolumen beobachten. Laut der Studie erlaubt die besondere Mikro -und Makrostruktur des genutzten β -TCP mit einer Porosität von 70% und einer Granulatgröße von 250-1000 μ m eine zügige Absorption, welche wesentlich für den Zahndurchbruch in den Spaltdefekten ist (Janssen, 2019). Dies könnte in Zukunft einen höheren Stellenwert von β -TCP für größere Knochenaufbauten darstellen.

Als übliche klinische Darreichung der KEM für einen Knochenaufbau ist die Granulatform bekannt. Hierbei werden die Granulate intraoperativ mit NACL angefeuchtet und präpariert. Anschließend wird mit einem entsprechenden Instrument das Granulatgemisch aufwendig in das Augmentationsgebiet gegeben.

Allerdings ist diese Darreichungsform aufwendig, weshalb von Klinikern immer wieder injizierbare „ready to use“ Alternativen gewünscht werden. Aus diesem Grunde besteht ein Bedarf zu untersuchen, inwiefern sich alternative, injizierbare (ggf. durch Eigenspeichel/-Blut aufzubereitende) KEM als alternative zu bestehenden Materialien und auch der natürlichen Heilung (ohne Augmentation) eignen.

1.4 Methoden zur Strukturanalyse

1.4.1 Histologie

Zur Untersuchung von Körpergeweben eignet sich die konventionelle Histologie. Zur Untersuchung von Knochengewebe werden häufig nicht-dekalzifizierte Dünnschliffpräparate entsprechend der Donath Technik hergestellt, welche zunächst in PMMA eingebettet und anschließend mit Lichtmikroskopen untersucht werden (Donath, 1982). Auf diesem Wege kann eine etwa 1000-fache Vergrößerung mit einer Auflösungsgrenze von 0,3 μ m erreicht werden (Welsch, 2006a). Durch Histomorphometrie können die angefertigten Präparate analysiert und räumlich interpretiert werden.

1.4.2 (Mikro-)Computertomographie

Als besonders gut geeignetes Verfahren zur Untersuchung von knöchernen Strukturen eignet sich die Computertomographie. Sie ist ein bildgebendes Verfahren, welches auf Röntgenstrahlen basiert, bei denen im Regelfall das System aus Röntgenröhre und Detektor um das zu untersuchende Areal rotiert. Es resultieren aus verschiedenen Winkeln Schwächungsprofile oder sogenannte Projektionen, welche durch den Computer mithilfe verschiedener mathematischer Algorithmen (z. B. gefilterte Rückprojektionen) in Schnittbilder umgerechnet werden (Feldkamp et al., 1989). Dadurch lässt sich die innere Struktur einer Probe dreidimensional in hoher Auflösung und zeiteffizient abbilden, ohne dass die Probe dabei zerstört wird (Müller et al., 1998). Als maßgeblichen Parameter für die räumliche Auflösung eines Schnittbildes gelten die Röntgenröhre (Brennfleckausdehnung), die Zahl der Projektionen und der Detektor (Anzahl und Größe der Detektorelemente) (Stauder et al., 2011). Durch spezielle Detektor-Sensor-Kombinationen und optische Vergrößerung erreichen sogenannte Mikro-Computertomographie (Mikro-CT)- Geräte Voxelgrößen (Voxel= Volume Matrix Element) von 1 bis 50 μm , während klinische Ganzkörper-CTs eine Ortsauflösung von bis zu 70 μm erzielen (Ritman, 2011; Kampschulte et al., 2016). Umso länger die Untersuchungszeit, desto höher die applizierbare Photonenmenge. Dadurch resultiert auch bei höheren räumlichen Auflösungen ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis. So werden für die Erstellung klinischer CTs wenige Sekunden benötigt und während Mikro-CT- Scans für den gleichen Probenabschnitt je nach Gerät oftmals mehrere Minuten bis Stunden in Anspruch nehmen.

Das aktuelle Mikro-CT-Verfahren basiert auf einem von Feldkamp et al. Beschriebenen System (Feldkamp et al., 1989). Es konnten so eine dreidimensionale Rekonstruktion gleichzeitig mit einer deutlich besseren Auflösung realisiert werden. Schließlich wurde das Mikro-CT zum Standard in der Knochenforschung, und findet auch in der Zahnmedizin Anwendung (Hildebrand et al., 1999; Stauber et al., 2008; Irie et al., 2018).

Im Jahr 2010 hat die ASBMR Empfehlungen für die Akquisition, Rekonstruktion und Auswertung von Mikro-CT-Aufnahmen als Teil einer standardisierten Untersuchungsmethode zusammengestellt und herausgegeben. Gegenwärtige Mikro-CT-Gerätehersteller bieten oft auch Analysesoftware an, die obengenannte standardisierte Parameter berechnen können.

Dies stellt einen Vorteil gegenüber konventionellen histologischen Präparaten dar, welche lediglich Analysen auf Grundlage zweidimensionaler Präparate ermöglichen. Zu nennen ist außerdem die Zeitersparnis beim Herstellen von Mikro-CT Datensätzen. Sie sind nach wenigen Stunden verfügbar, wobei die Herstellung konventioneller Schnittpräparate Wochen bis Monate dauern kann (Feldkamp et al., 2009). Weiterhin ermöglicht die computergestützte Berechnung der mikromorphologischen Indizes, welche auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden, eine Standardisierung der Auswertung (Müller et al., 1998).

1.4.3 Histologie und Mikrocomputertomographie im Vergleich

Viele Jahre galt die histomorphometrische Untersuchung von Dünnschliffpräparaten als Mittel der Wahl zur Untersuchung von Gewebeproben aus dem Kieferknochen (Goldschlager et al., 2010). Heutzutage wird diese Untersuchungsmethode durch die Mikrocomputertomographie komplementiert. Gründe hierfür sind vor allem der non-destruktive Charakter, die schnelle Datengewinnung der Aufnahmen in einer vergleichsweise besseren oder genauso guten Qualität im Vergleich zu den aufwändig hergestellten histologischen Schnittpräparaten, dessen mögliche Auswertung teilweise mehrerer Wochen bedarf sowie der Vorteil der dreidimensionalen Untersuchung der Gewebestruktur (Donath, 1982).

Nicht nur die Herstellung der Gewebsschnitte, sondern auch deren Analyse bieten durch die weitestgehend standardisierten Berechnungen morphometrischer Indizes relevante Vorteile.

Falls Kleintiere eingesetzt werden, bieten in-vivo Mikro-CT Analysen die Möglichkeit, mehrere Untersuchungszeitpunkte (longitudinal) festzulegen und die Daten longitudinal auszuwerten, so dass nicht für jeden Untersuchungszeitpunkt Tiere getötet werden müssen (Bouxsein et al., 2010; Becker et al., 2015).

Nach Abschluss der in- oder ex- vivo Scanvorgänge besteht die Möglichkeit, weitere Untersuchungen und biomechanische Tests sowie histologische Untersuchungen durchzuführen, weshalb die Mikro-CT als komplementäre Technik aufgefasst wird. Zudem spielt die Auswahl der histologischen Schnittebene eine entscheidende Rolle für die Ergebnisse der Stereometrie (Kopp et al., 2012). Durch den Verarbeitungsprozess der histologischen Anschnitte gehen nicht nur Zeit, sondern auch entscheidende Informationen verloren. So können durch die chemische Fixationsprozedur der Schnitte deren Strukturen

verändert werden. Doch auch bei nicht-entkalkten Schnitten ist ein Informationsverlust nach dem Schleifen und der Politur zu beobachten (Welsch, 2006a). Im Gegenteil dazu können in der Mikrocomputertomographie Schnittbilder in gleichmäßiger Schichtstärke und mit identischer Auflösung hergestellt werden und dies in jeder Ebene (Bouxsein et al., 2010).

Limitationen der Mikrocomputertomographie lassen sich jedoch auch beobachten. Hartgewebe, welches in unmittelbarer Nähe zu Implantaten liegt, wird häufig artefaktbehaftet dargestellt. Um Knochengewebe im Mikro-CT Bild erkennen zu können, ist ein Mindestmineralisationsgrad notwendig (van Oosterwyk et al., 2000). Sobald Projektionsbilder des Objekts auf den Detektor übertragen werden, können außerdem Artefakte in der Bildberechnung entstehen. Dies passiert beispielweise, wenn das Projektionsbild größer ist als der genutzte Detektor. Außerdem ließen sich je nach Art des Detektors mit zunehmendem Alter Defekte der Szintillatorkristalle beobachten, was die Entstehung von Ringartefakten begünstigt (Bernhardt et al., 2004). Im Gegensatz zur Histologie erlaubt die Mikro-CT zudem keine Analyse auf Zellebene. So werden Osteoide, Osteoklasten und Osteoblasten sowie dynamische Knochenumbauprozesse wie Mineralappositionsraten, ruhende oder resorbierende Knochenoberflächen weiterhin histologisch analysiert (Müller et al., 1998; Bernhardt et al., 2004). Eine weitere Restriktion der Microcomputertomographie ergibt sich aus der Abhängigkeit zwischen Systemauflösung und der Auswirkung der Segmentierung auf die Parameter. So nimmt die Aussagekraft von morphologischen Indizes im Falle einer niedrigeren Auflösung ab (Müller et al., 1998). Aus diesem Grunde werden derzeit in der Regel histologische Untersuchungen und Mikro-CT Auswertungen kombiniert, was bedeutet, dass sich die beiden Techniken komplementieren.

1.5 Aufbau eines Mikro-CT

Ein Mikro-CT Scanner besteht -ähnlich wie ein herkömmliches CT-Gerät- aus einer Strahlenquelle, einem Probenhalter und einem Detektor. Verbunden damit ist ein Computer, um die Projektionen weiterzuverarbeiten. Um die Bildqualität zu optimieren, können optional Filter auf Hardware und Softwarelevel integriert werden.

Das grundlegende physikalische Prinzip der Mikro-CT beruht auf der Wechselwirkung von ionisierender Strahlung, wie Röntgen- (oder Synchrotron)strahlung mit Materie. Der Photoeffekt führt zu einer Abschwächung der Photonen, die proportional zur dritten Potenz

der Ordnungszahl der Elemente und umgekehrt proportional zur dritten Potenz der Photonenenergie ist. Sobald ein Röntgenstrahl die Probe durchdringt, wird er exponentiell entsprechend dem Material entlang seines Pfades abgeschwächt. Die Wahl der Strahlenquelle ist abhängig von der Geometrie des Mikro-CT Scanners. Fein- und Mikrofokusröhren emittieren Kegelstrahlen, wohingegen ältere Mikro-CTs noch mit einer Parallelstrahlgeometrie arbeiten. Um ein dreidimensionales CT-Bild zu erzeugen, müssen eine Serie zweidimensionaler Projektionen erfasst werden. Bei der Mikro-CT werden diese Projektionen in der Regel in einer Anordnung aufgenommen, bei der die Quelle und der Detektor ortsgebunden sind und das Objekt um seine Längsachse (z-Achse) gedreht wird. Die Röntgenstrahlung kann somit jeden Ort der Probe durchdringen (Stauber et al., 2008).

Nachdem die Röntgenstrahlen durch die Probe gesandt wurden, treffen sie abgeschwächt auf den Detektor, wo diese in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Die elektrischen Signale entsprechen der Intensität der empfangenen Strahlung. Der nachgeschaltete Computer steuert sämtliche Bedienvorgänge und Funktionsabläufe. Durch das Durchstrahlen von Röntgenstrahlen durch das Untersuchungsobjekt von mehreren Winkeln wird anschließend eine Zahl von zweidimensionalen Identitätsprofilen erzeugt, welche anschließend in eine dreidimensionale Projektion umwandelt werden (Grillenberger & Fritsch, 2012). Um die niedrigerenergetische Strahlung zu eliminieren und dadurch die Bildqualität zu optimieren, werden oftmals Filter aus Aluminium, Zinn oder Kupfer eingesetzt. Diese haben somit die Funktion, Strahlenaufhärtung, Signalrauschen und Streustrahlung zu reduzieren (Du Plessis et al., 2017).

1.5.1 Physikalisch-technische Grundlagen

Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen mit einer Wellenlänge von 10^{-8} bis 10^{-13} λ und werden erzeugt, wenn schnelle Elektronen von einer Kathode ausgehend auf eine Wolframanode treffen. Die Zahl der Elektronen ergibt sich aus der Stromstärke (im Falle eines Mikro-CTs erfolgt die Angabe in μA), während die Ladungsenergie, welche die Elektronen transportieren, aus der angelegten Spannung (gemessen in KeV) resultiert. Bei dem Aufprall der beschleunigten Elektronen entsteht ein Spektrum an Photonenenergien (Bremsstrahlung), wohingegen das Zurückfallen von Elektroden auf eine niedrigeres Energieniveau als charakteristische Strahlung bezeichnet wird. Durch ein spezielles Fenster wird diese dann als polychromatischer, kegelförmiger Röntgenstrahl emittiert.

Je nach Anwendung müssen geeignete Spannungen und Stromstärken gewählt werden, wobei diese bei Mikro-CTs üblicherweise im Bereich von 20-100 keV liegen (Ritman, 2004).

Standardmäßig wird bei einem Mikro-CT die Strahlung aus der Röntgenquelle stillstehend auf das sich um seine eigene Achse rotierende Objekt gestrahlt und die Strahlen mit Energien $<50\text{keV}$ werden anschließend aufgrund des photoelektrischen Effekts absorbiert. Fester Knochen absorbiert mehr Strahlung als Weichgewebe. Bei höherenergetischen Röntgenstrahlen ($>90\text{keV}$) ist bei Berührung mit Materie der Compton-Effekt zu betrachten (Ritman, 2004, Huang et al., 2013). Hier ist eine Proportionalität zwischen Strahlenabschwächung und der Materialdichte zu verzeichnen (Ritman, 2004).

Nach Abschwächung treffen die Strahlen auf den Detektor und bilden wie oben beschrieben zweidimensionale Projektionen. Es können durch das Einstellen eines sogenannten *frame averagings* beliebig viele Projektionen pro Rotationsposition erfasst und ein Mittelwert berechnet werden. Mit steigender Belichtungszeit des Detektors je Projektion (Integrationszeit) kann zwar die Bildqualität steigen, jedoch auch das Risiko auf Detektorartefakte. Je mehr Voxel im Rekonstruktionsfeld (FOV, engl.: *Field-of-View*) vorhanden sind, umso kleiner sind sie und umso besser ist das Auflösungsvermögen (Grillenberger, 2007; Bouxsein et al., 2010).

Mit Erhöhung des *frame averagings* und der Integrationszeit (Belichtungszeit je Projektion) wird die totale Scandauer erhöht. Während das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) somit durch Erhöhen der Integrationszeit und *per frame averaging* verbessert werden kann, geht dies zu Lasten einer längeren Scanzeit mit höherer Strahlenbelastung einher, welche jedoch bei ex-vivo Proben in der Regel unerheblich ist.

Die effektive Strahlendosis ist proportional zum Röhrenstrom und zur Dauer der Röntgenbestrahlung und hängt zudem von der Röhrenspannung ab (Bouxsein et al., 2010).

1.5.2 Bilderkonstruktion

Die Erstellung von Bildern in der Computertomographie erfolgt durch eine computergestützte mathematische Rekonstruktion der Projektionsbilder. Nach Durchgang der Röntgenstrahlung durch die Probe wird die ermittelte Intensität mittels eines

Algorithmus (gefilterte Rückprojektionsalgorithmus nach Feldkamp) zurück gerechnet. Der mathematische Ablauf lässt sich folgendermaßen erklären:

Zunächst wird die Probe (beispielsweise ein Schädel) skizzenhaft in gleichgroße Quadrate geteilt, mit dem Ziel die Beschaffenheit der Quadrate mithilfe der Computertomographie zu ermitteln. Die Quelle sendet gleichzeitig mehrere Strahlen aus. Diese durchlaufen die Probe und werden in den Quadraten unterschiedlich stark abgeschwächt. Fester Knochen absorbiert mehr Strahlenenergie als weiches Gewebe. Entsprechend verschieden sind die beim Detektor gemessenen Werte. Die Absorptionswerte der Quadrate werden vom Ausgangswert abgezogen und es ergeben sich Unbekannte und das Gleichungssystem ist unterbestimmt. Durch die neuen Ausgangslagen des Strahls auf die Probe werden bei jedem Strahlengang weitere mathematische Gleichungen erstellt, bis das Gleichungssystem vollständig ist. Die Werte entsprechen der Absorption jedes einzelne durchstrahlte Quadrates. Umso höher die Zahl desto dichter ist das Gewebe. Wird jeder Zahl ein Grauton zugeordnet, ergibt sich ein Muster (Stock, 2008; Feldkamp et al., 2009). Die Intensität der ausgesandten Strahlung abzüglich der von den Detektoren erfassten Intensität ergibt die Schwächung durch das Objekt. Der nachgeschaltete Computer muss die Schwächungswerte in die Objektebene entlang des Röntgenstrahles ‚zurücklegen‘. Das Ergebnis der Rekonstruktion ist eine Matrix mit digitalen Schwächungswerten. Jedem Voxel wird ein numerischer Wert einer Struktur zugeordnet. Dadurch können mineralisierte Bereiche von nicht-mineralisierten unterschieden werden. Helle Voxel bedeuten größere Röntgendichten im gemessenen Areal, dunklere Voxel kleinere Röntgendichten im gemessenen Areal (geringere Abschwächung des Strahls). Durch diese Grauwerteunterschiede lassen sich tomographische Schichten (*slices*) erzeugen, welche optional in eine dreidimensionale Ansicht übertragen werden können (Bouxsein et al., 2010; Grillenberger, 2012).

1.5.3 Bildbearbeitung (Image Processing)

Die Bildbearbeitung umfasst die Schritte Filterung, die Bestimmung des VOI und zuletzt die Segmentierung. Zum Reduzieren des Signalrauschens werden häufig Filter verwendet, welche zu einer Kontrastverschärfung zwischen Knochen und Mark führen. Zur Kontrasterhöhung werden vor Rekonstruktion sogenannte low-pass Filter genutzt, welche jedoch zu einem unschärferen Bild führen können. Um die Kanten im Bild besser darzustellen werden high-pass Filter genutzt, welche wiederum das Rauschen verstärken.

Nach Rekonstruktion werden unter Anwendung beispielsweise eines Gauß'schen Filters die Vorteile der jeweiligen Filter, also weniger Bildrauschen bei hohem Kontrast kombiniert. Dieser ist vergleichsweise einfach zu implementieren und filtert auch bei großen Datensätzen schnell.

Nach der digitalen Filterung muss in den einzelnen Tomographen der zu untersuchende Bereich definiert werden. Die Verknüpfung der eingezeichneten ROIs (Region of Interest) in den Schichtebenen bildet zusammen die Volume of Interest (VOI), welches dem zu untersuchenden Volumen entspricht. Abhängig vom untersuchenden Objekt können verschiedene geometrische Formen wie zum Beispiel Rechtecke, Kreise oder Ellipsen als ROI verwendet werden. Für eine individuellere Analyse besteht auch die Möglichkeit, die ROIs freihändig in die tomographischen Schichten einzuzichnen, was die methodische Grundlage dieser Arbeit darstellt. Für eine gute Vergleichbarkeit sollen die VOIs in allen zu untersuchenden Scans gleichermaßen erzeugt werden (Bouxsein et al., 2010).

Als nächsten Arbeitsschritt erfolgt die Segmentierung, welche durch Bouxsein et al. als kritischer Arbeitsschritt formuliert wird. Sie beschreibt die Trennung der mineralisierten und nicht mineralisierten Strukturen in einer knöchernen Probe und bildet somit das Fundament für die quantitative Analyse. Dazu wird im besten Fall ein globales Thresholding ausgeführt. Hierfür wird ein Grauwert, der den Schwächungskoeffizienten repräsentiert, als absoluter oder relativer Schwellenwert definiert, auf dessen Basis die Datensätze binarisiert werden (Becker et al., 2019). Die Werte über den gewählten Schwellenwert werden gleich 1 und alle Werte darunter gleich 0 oder umgekehrt gesetzt. Durch die Segmentierung werden also Strukturen voneinander getrennt und es entsteht so ein binäres Bild. Um Fehlerquellen zu vermeiden (Wahl eines zu hohen oder zu niedrigen Schwellwertes), welche sich durch die gesamte Analyse ziehen würden, müssen die binären Bilder mit den Graustufendarstellungen verglichen werden (Bernhardt et al., 2004; Bouxsein et al., 2010).

Aus den so bearbeiteten dreidimensionalen Datensätzen können nun morphometrische Parameter automatisiert berechnet werden (Becker et al., 2017).

1.5.4 Quantitative Analysen

Um schließlich die Knochenmorphologie der Mikro-CT Schnitte in den segmentierten VOIs analysieren zu können, werden besonders häufig die Parameter Knochenfraktion (BV/TV),

Trabekeldicke (Tb.Th.), trabekulärer Abstand (Tb. Sp.), die spezifische Knochenoberfläche (BS/BV) sowie die Trabekelzahl (Tb. N.) herangezogen.

Die Knochenvolumenfraktion (BV/TV) – auch bekannt als bone volume density oder Knochenfraktion (Dias et al., 2015) - drückt das Verhältnis des mineralisierten Volumens zum Gesamtvolumen des VOIs aus und wird als Prozentwert angegeben. Es wird durch Bildung des Quotienten aus Knochenvolumen (BV, engl.: *bone volume*) und dem Gesamtvolumen (TV, engl.: *total volume*) ausgedrückt. Dabei beschreibt TV das Gesamtvolumen des VOI, während BV allein das Gesamtvolumen der mineralisierten Gefüge umfasst, welche zuvor als solche im Rahmen der Segmentierung definiert wurden. Zur Bestimmung der Parameter können entweder die Voxelzählermethode oder die Triangulationsmethode (Volmetric-Marching-Cubes; VOMAC) verwendet werden. Dabei werden in den Schnitten die zu untersuchenden Strukturen als Voxel abgebildet, aus dem anschließend ein Gesamtvolumen errechnet werden kann. Die Kenngröße (BV/TV) erfolgt gewöhnlich in der Maßeinheit % (Bouxsein et al., 2010).

Die durchschnittliche Dicke der Knochen trabekel wird durch die Trabekeldicke (Tb. Th., engl.: *trabecular thickness*) ausgedrückt. Sie wird durch die *distance-transformation*-Methode (auch: *sphere-fitting*-Methode) errechnet (Bouxsein et al., 2010). Sie wird typischerweise in der Maßeinheit mm angegeben (Parfitt, 1987; Dias et al., 2015).

Die trabecular separation (Tb. Sp.) gibt den mittleren Abstand zwischen den Trabekeln an. Auch dieser Parameter wird wie die Trabekeldicke unter Zuhilfenahme der *sphere-fitting*-Methode ermittelt (Bouxsein et al., 2010). Die Kenngröße wird üblicherweise in der Einheit mm angegeben (Parfitt, 1987; Dias et al., 2015).

Die *distance-transformation*-Methode, welche wie obig genannt häufig zum Errechnen von Tb. Th. und Tb. Sp. herangezogen wird, beschreibt in den gesamten Anteilen des trabekulären Knochengeflechts (bzw. des Hintergrundes bei Tb. Sp.) die Approximation des euklidischen Abstands eines Voxels zu einer definierten Struktur, z.B. zur nächstgelegenen Bildkante (Danielsson, 1980; Borgefors, 1986). Dies lässt sich so verstehen, dass es um die Ermittlung der größtmöglichen Kugel geht, die an einem bestimmten Punkt in die Struktur eingepasst werden kann. Der Durchschnitt dieser ermittelten Kugelgrößen wird an allen Stellen bestimmt. Dadurch kann die Information über die durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th.) beziehungsweise über den durchschnittlichen intertrabekulären Abstand (Tb.Sp.) errechnet werden. Zur Berechnung der trabekulären Dicke wird der als Knochen

segmentierte Bereich des Scans genutzt, wogegen zur Kalkulation der Tb. Sp. der als Hintergrund identifizierte Bereich genutzt wird.

Die Sphere-fitting-Methode wird ebenfalls verwendet, um den durchschnittlichen Abstand zwischen den Mittelachsen der Kugeln zu berechnen. Ihr gebildeter Kehrwert ergibt die trabecular number (Tb. N.) (Danielsson, 1980).

Die spezifischen Knochenoberfläche (BS/BV, engl.: *specific bone surface*) beschreibt das Verhältnis der segmentierten Knochenoberfläche zum segmentierten Knochenvolumen. Sie wird in mm^2/mm^3 angegeben (Bouxsein et al., 2010).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die vergleichende, volumetrische und mikrocomputertomographische Analyse der Heilungsmuster von Extraktionsalveolen, die durch eine Hemisektion und Entfernung der distalen Wurzel von Prämolaren der Mandibula im Hundemodell künstlich erzeugt wurden. Verglichen werden sollten die Heilungsmuster der Regeneration infolge einer Zugabe verschiedener injizierbarer kollagenbasierter Knochenfüllmaterialien versus eines konventionellen xenogenen Verfahrens (Bio Oss®) bzw. versus einer natürlichen Heilung ohne Zugabe eines Augmentationsmaterials.

Hierbei sollte ein besonderes Augenmerk auf die kritische Diskussion der eingesetzten Methodik computergestützten Auswertung der Mikro-CT Scans und Definition der VOIs gelegt werden.

2 Material und Methoden

Im Rahmen der Studienplanung wurde im Jahr 2018 ein Studienprotokoll verfasst und bewilligt, welches neben der Fragestellung und der Zielsetzung wichtige Daten zum Studiendesign und Operationsprotokoll enthält. Die Tierversuche wurden bei NAMSA (Chasse-sur-Rhône, France) durchgeführt, einer internationalen AAALAC-akkreditierten Einrichtung, die beim französischen Landwirtschaftsministerium für Tierhaltung, -pflege und -untersuchungen registriert ist. Das Studienprotokoll (APAFIS#12878-201801021136883) wurde durch das ethischen Komitee von NAMSA genehmigt und als 3R-Richtlinie (*Replace, Reduce, Refine*) für Tierversuche betrachtet. Die nachfolgenden Ergebnisse entsprechen den ARRIVE-Richtlinien 2.0 für relevante Punkte (Percie du Sert et al., 2020).

2.1 Studiendesign

2.1.1 Tiere

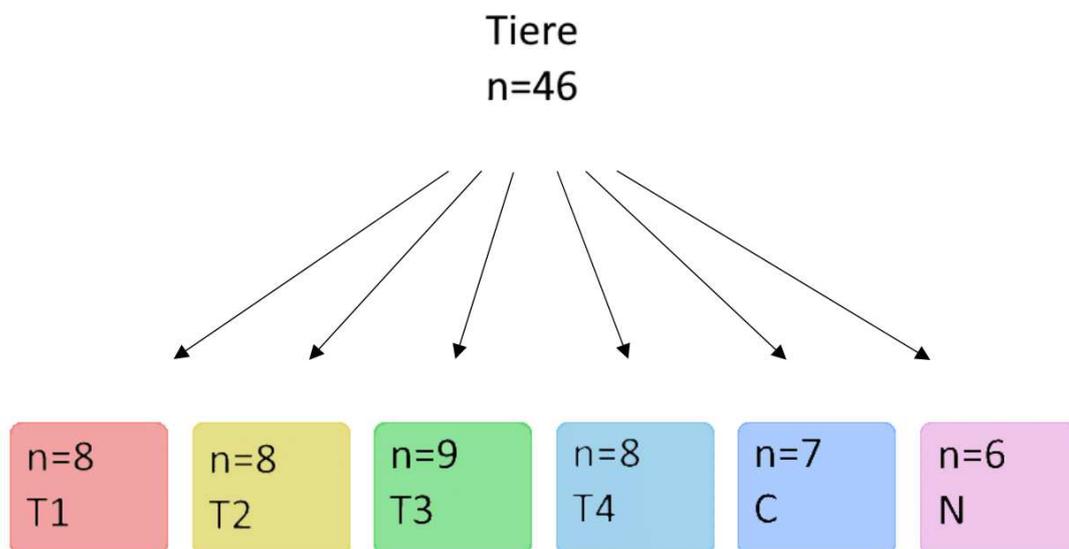


Abb. 1: Augmentationsmaterialien

Quelle: Eigene Darstellung

Im Rahmen dieser Hundestudie wurden nach Extraktion drei verschieden zubereitete, alloplastische Nano-Knochenfüller verwendet, welche mit einem etablierten xenogenen Knochenersatzmaterial (Bio Oss®) und einer Sham-Gruppe (kein Einsatz eines KEM) verglichen wurden. Hierzu wurden n=9 männliche Hunde der Beagle-Rasse (Brut:

HsdRcc:DOBE) ausgewählt, an denen wiederum jeweils sechs Defektbereiche in der Mandibula präpariert wurden. Die ursprünglich aus Frankreich stammenden Tiere wurden unter bestimmten Kriterien ausgewählt. Die Bedingungen entsprechen den europäischen Anforderungen (Richtlinie EU/2010/63). Bei der Ankunft wurden die Hunde in unterschiedliche Gruppen unterteilt. Nach einer Akklimationszeit von mindestens 15 Tagen hat man die Versuche ausgeführt. Im Anschluss an die Versuche hat man die Hunde bis zur vollständigen Wundheilung einzeln untergebracht, um mögliche Dehiszenzen zu vermeiden. Die Hunde wurden unter Laborbedingungen in Käfigen gehalten, wobei die Raumtemperatur zwischen 15-21°C lag. Auch der Lichtzyklus wurde mit einem automatischen Timer gesteuert, wobei 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit eingestellt wurden.

Für den Versuch wurden männliche Hunde mit einem Mindestalter von 12 Monaten und einer Gewichtsklasse zwischen 9,8 und 13,4 Kg ausgewählt, wichtig hierbei war, dass die Tiere skelettal ausgereift waren. Außerdem wurden die Tiere vor dem operativen Eingriff an eine *soft food diet* (SAFE, Frankreich) gewöhnt, Wasser ad libitum wurde ebenfalls bereitgestellt. Im Futter oder im Wasser waren keine Verunreinigungen zu erwarten, was negative Auswirkungen auf die Ergebnisse der Studie haben könnte.

Die n=8 Tiere der Testgruppe T1 erhielten Bio Flow M2L gemischt mit Eigenblut. Für die Testgruppe T2 mit einer n=8 wurde das gleiche Bio Flow 2L durch Eigenspeichel ersetzt. Grundsätzlich handelt es sich um verschiedene injizierbare kollagenbasierte Knochenersatzmaterialien (Geistlich Pharma AG, 2022). In Gruppe T3 hat man in n=9 Tieren das Bio Flow M2rtu eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen injizierbaren Kollagenfüller, welcher als ready-to-use Spritze präpariert ist. Es wurden also weder Eigenblut noch Eigenspeichel hinzugefügt. In Testgruppe T4 hat man bei n=8 Tieren das Bio Flow M4L eingesetzt, hierzu wurde erneut Eigenspeichel zugegeben. Für die Kontrollgruppe mit n=7 wurde xenogenes KEM (Bio Oss®) verwendet. Bei n=6 Tieren wurde die Extraktionsalveole im Sinne einer Negativkontrollgruppe leer gelassen (Sham-Gruppe).

2.1.2 Augmentationsmaterialien

T1: Bio Flow M2L (gemischt mit Eigenblut)

T2: Bio Flow M2L (gemischt mit Eigenspeichel)

T3: Bio Flow M2rtu

T4: Bio Flow M4L (gemischt mit Eigenspeichel)

Kontrolle: Bio-Oss Kollagen

Negative Kontrolle: Sham-Gruppe (kein KEM)

2.2 Methode

2.2.1 Studiendesign und Operationsprotokoll

Präoperativ:

Präoperativ wurden die Tiere gewogen und zur antimikrobiellen Prophylaxe zwei Tage vor dem Eingriff einmal täglich mit Spiramycin und Metronidazol (Stomorgyl®, Merial) per os verabreicht. Sie bekamen außerdem ein vollständiges *full-mouth-scaling*. Innerhalb von ein bis zwei Tagen vor der Operation wurden die Tiere erneut gewogen und erhielten eine intervenöse Premedikation im Sinne von 0,01mg Medetomidin (Dorbene Vet®, Zoetis, NJ, USA) und 0,01mg Buprenorphin (Buprecare®, Axience, Pantin, France) je kg Körpergewicht. Die Anästhesie erfolgte ebenfalls intravenös durch Ketamin (Ketamine® 1000, Virbac, Carros, France). Zuletzt wurden die Hunde intubiert (IsoFlo®, Zoetis) und mechanisch beatmet. Den Hunden wurde für den operativen Eingriff eine intravenöse Infusion mit passender Elektrolytlösung (Ringer-Lactat-Lösung, Baxter, Deerfield, II, USA) verabreicht. Präoperativ erhielten sie außerdem eine subkutane Injektion einer antiinflammatorischen Medikation (Carprofen, Rimadyl, Zoetis). Außerdem erhielten die Hunde eine Augensalbe (Ocrygel®, TVM, Berlin, Germany) um die Corneae vor Austrocknung zu schützen. Zur Anästhesie der Zähne wurde Lidocain mit Zusatz von Adreanlin injiziert (Aguettant, Langenfeld, Germany). Die Versuchstiere wurden für den Eingriff in eine seitliche Position auf ein erwärmtes Operationsfeld gebracht und während der Operation fanden regelmäßig Körpertemperaturmessungen statt. Zusätzlich erfolgte eine Überwachung von dem Elektrokardiogramm, dem peripheren arteriellen Blutdruck und der Sauerstoffsättigung.

Operativ:

Die operativen Eingriffe wurden von den Chirurgen (Prof. Dr. Frank Schwarz, Dr. Puria Parvini, Dr. Karina Obreja, Dr. Jonas Lorenz und Dr. Ausra Ramanauskaite, Universität Frankfurt am Main) durchgeführt. Das Vorgehen wurde wie folgt im Operationsprotokoll festgehalten:

Sechs Prämolaren der Mandibula (bilateral P2, P3 und P4) wurden bei jedem der acht Hunde für jeden Zahn devitalisiert und hemisiziert, wobei die distale Wurzel jeweils entfernt wurde (Abb.1)

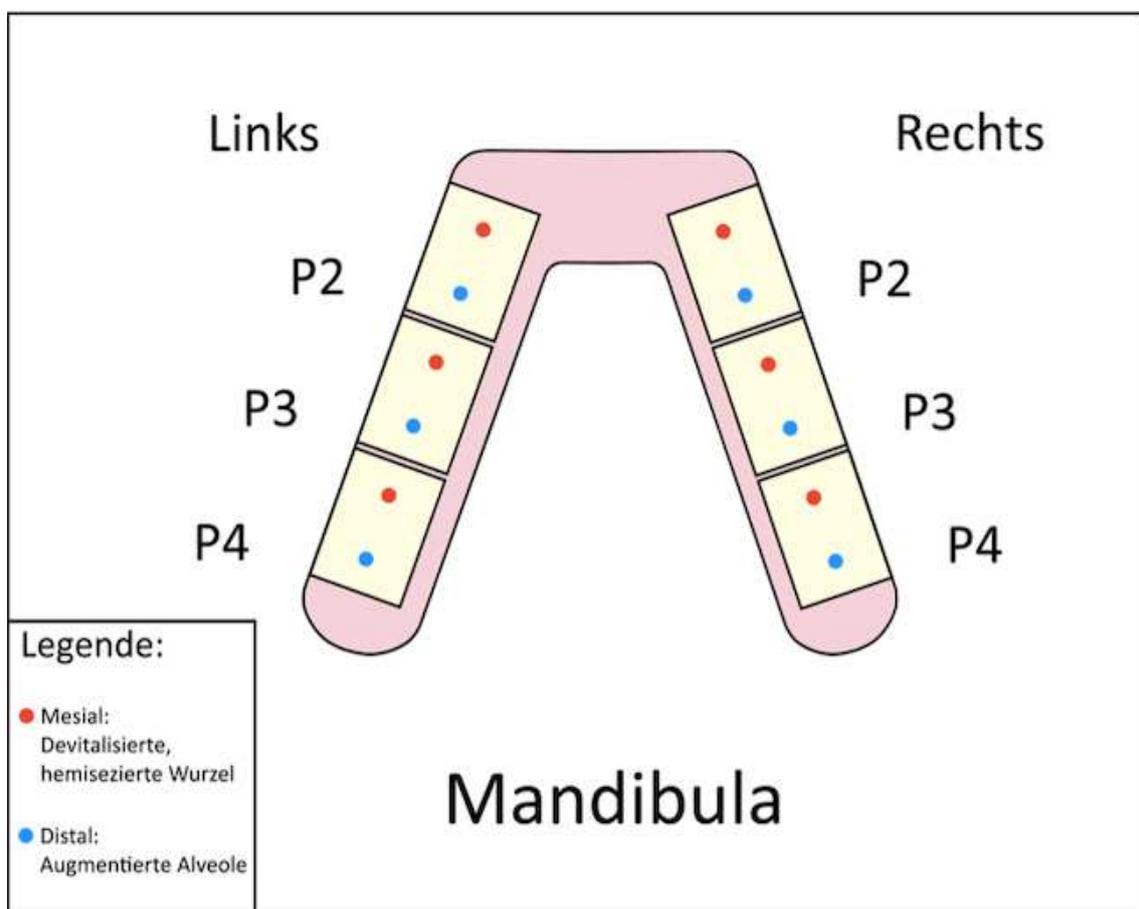


Abbildung 1: Zahnextraktionsschema

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an das Studienprotokoll

Zunächst wurden die Versuchstiere mittels der Infiltrationsanästhesie mit Ultracain D-S Brechampullen, Sanofi- Aventis (1:200.000) betäubt. Es wurde ein Skalpell 15 (Hu Friedy) verwendet, um eine krestale Schnittführung jeweils rechts und links um die Unterkieferprämolaren (P2, P3, P4) durchzuführen. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme eines Freer Raspatoriums ein Mukoperiostlappen gebildet. Danach wurde

mithilfe eines speziellen Fissurenbohrers der Zahn in bucco-lingualer Achse in seine zwei Wurzeln getrennt (Abb. 2, Abb. 2.1). Die distale Wurzel wurde extrahiert (Abb. 2.2). Dazu wurde ein Syndesmotom zwischen die distale Zahnwurzel und den Alveolarknochen eingeführt und die Wurzel anschließend mithilfe eines Hebels mit kontrollierter Kraft in die apikale Richtung gedrückt und um die distale Wurzel gedreht, bis sich die Wurzel gelöst hatte. Wurzelreste, bei denen keine Extraktion möglich war, wurden belassen und notiert. Eine Dekapitation der mesialen Wurzel auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze wurde durchgeführt. Bei Notwendigkeit wurde die Pulpa der mesialen Wurzel ebenfalls mithilfe eines diamantierten Kugelbohrers eröffnet und anschließend mithilfe einer Hedströmfeile exstirpiert (Abb. 2.3). Der Kanal wurde entsprechend bis ISO 25 aufbereitet und mit 2,5%igem Natriumhypochlorid gespült. Zuletzt wurde Calciumhydroxidpaste (Calasept Plus Spritzen 1U/4U, Directa in die Wurzelkanäle eingebracht und mit Glasionomerklebstoff (Ketac-Fil Plus Aplicap Kapseln, 3M Dental) verschlossen. Insgesamt resultierten sechs gleichartige Unterkieferdefekte pro Tier.

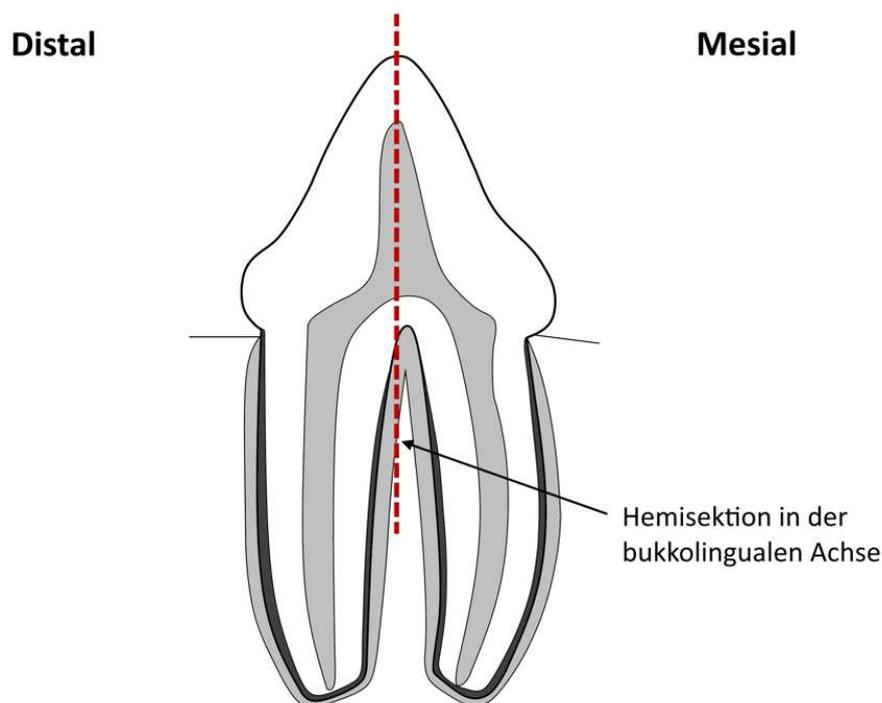


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Prämolaren bei einem Beaglehund

Quelle: Eigene Darstellung



Abbildung 3: Klinisches Bild der Hemisektion des Prämolaren

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials



Abbildung 4: Extraktion der distalen Wurzel

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

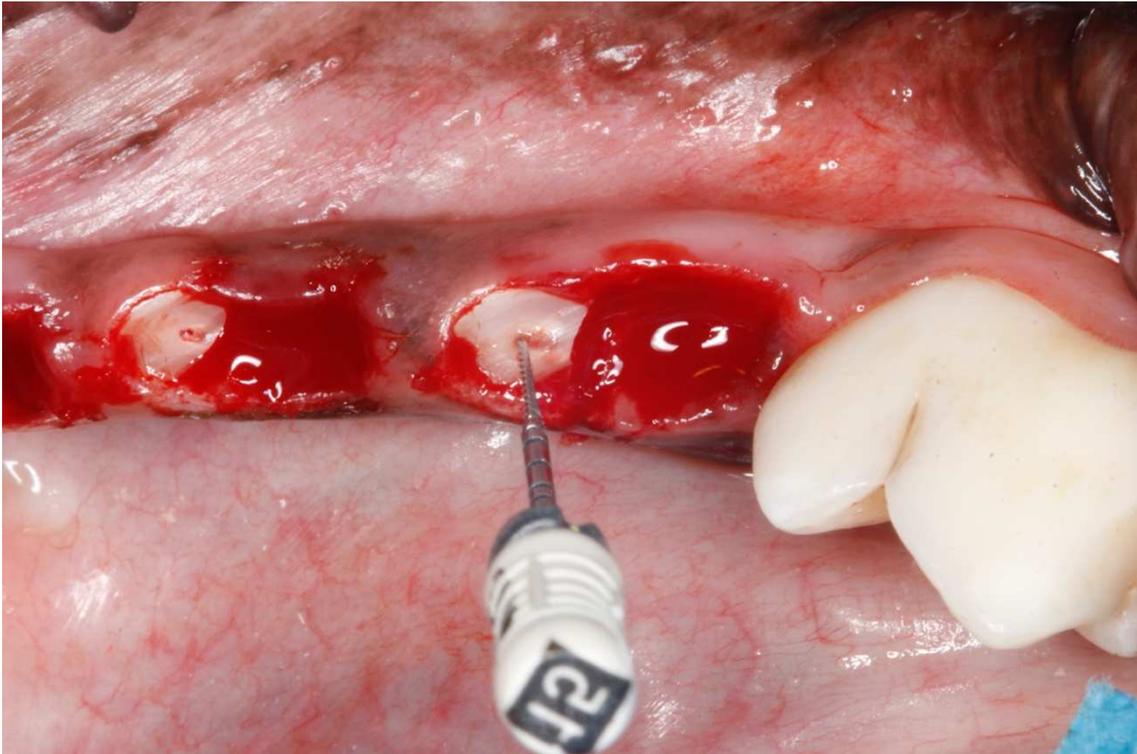


Abbildung 5: Devitalisierung der mesialen Wurzel

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

2.2.2 Augmentation der Defekte

Anschließend wurden die distalen Extraktionsalveolen mit den verschiedenen Knochenersatzmaterialien gefüllt (Testgruppen 1-4 und eine Kontrollgruppe) oder entsprechend im Sinne einer Negativkontrolle leer belassen (Sham-Gruppe). In die Extraktionsalveole der ersten Testgruppe wurde das zu untersuchende Nano-Knochenfüllmaterial in Kombination mit 350µl autologem Blut injiziert. (Abb. 3.1) Schließlich erfolgte ein Wundnahtverschluss mit Einzelknopf- oder Doppel-O-Nähten mit Optilene 5.0 (Optilene 5.0, DSMP16, Braun Petzold).

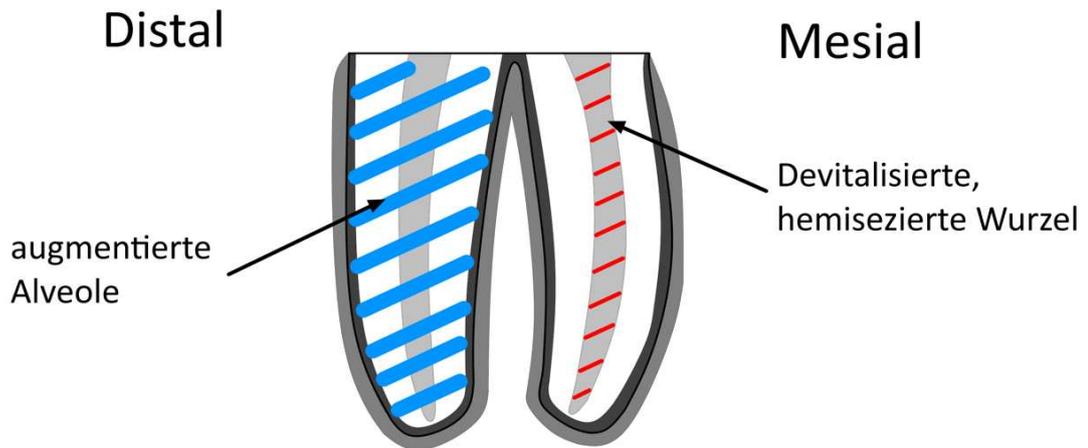


Abbildung 6: Schematische Übersicht über die Injektion des Knochenersatzmaterials sowie der Devitalisierung des Prämolaren im Sinne einer Hemisektion

Quelle: Eigene Darstellung

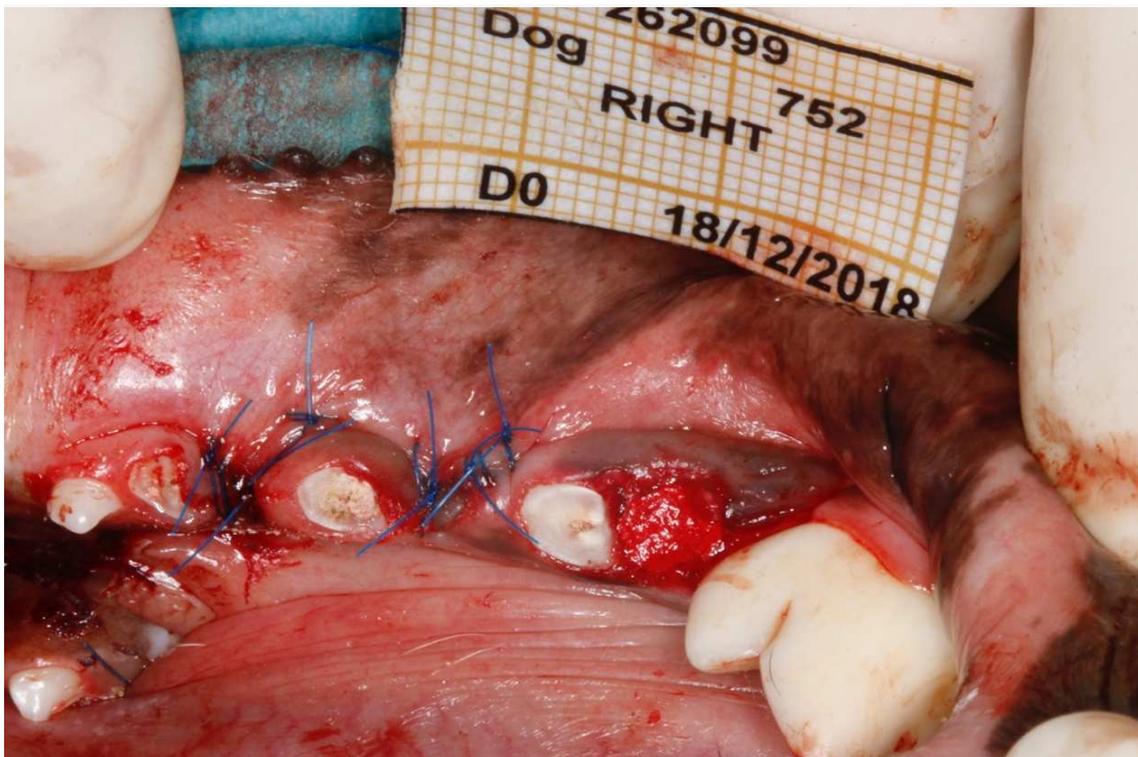


Abbildung 7: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T1: Bio Flow M2L (gemischt mit Eigenblut) 752_R_P4

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

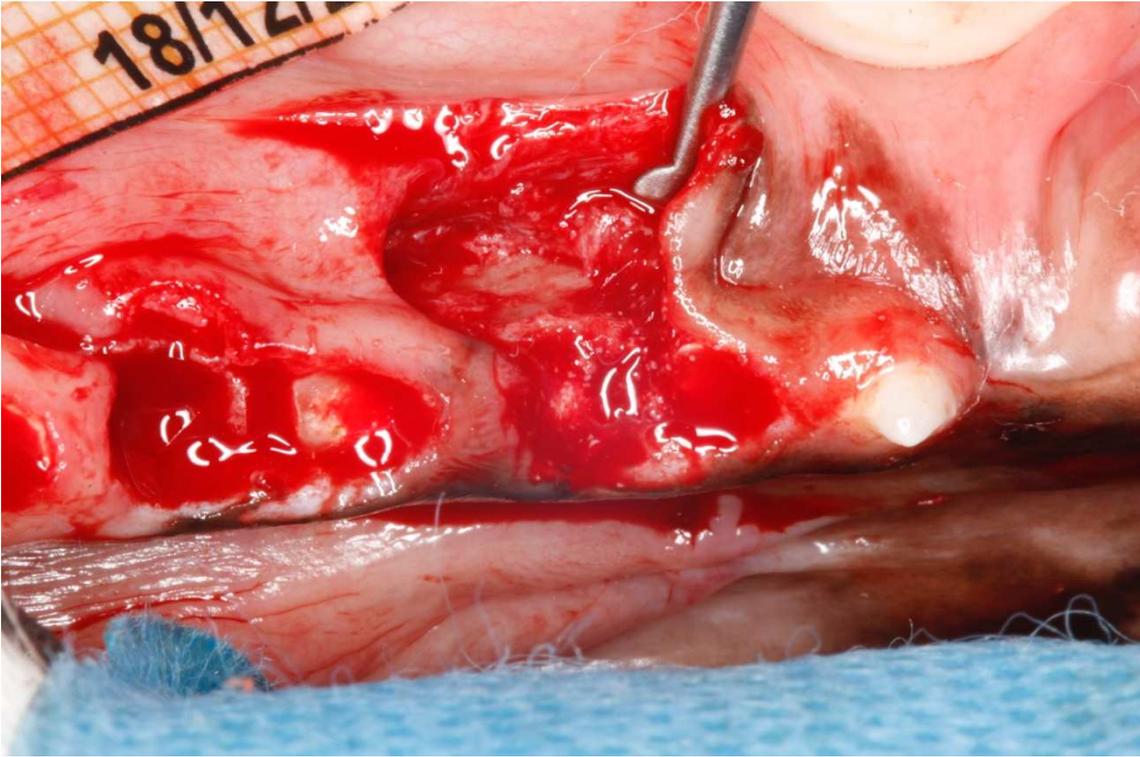


Abbildung 8: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T2 Bio Flow M2L (gemischt mit Eigenspeichel)
617_L_P2

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

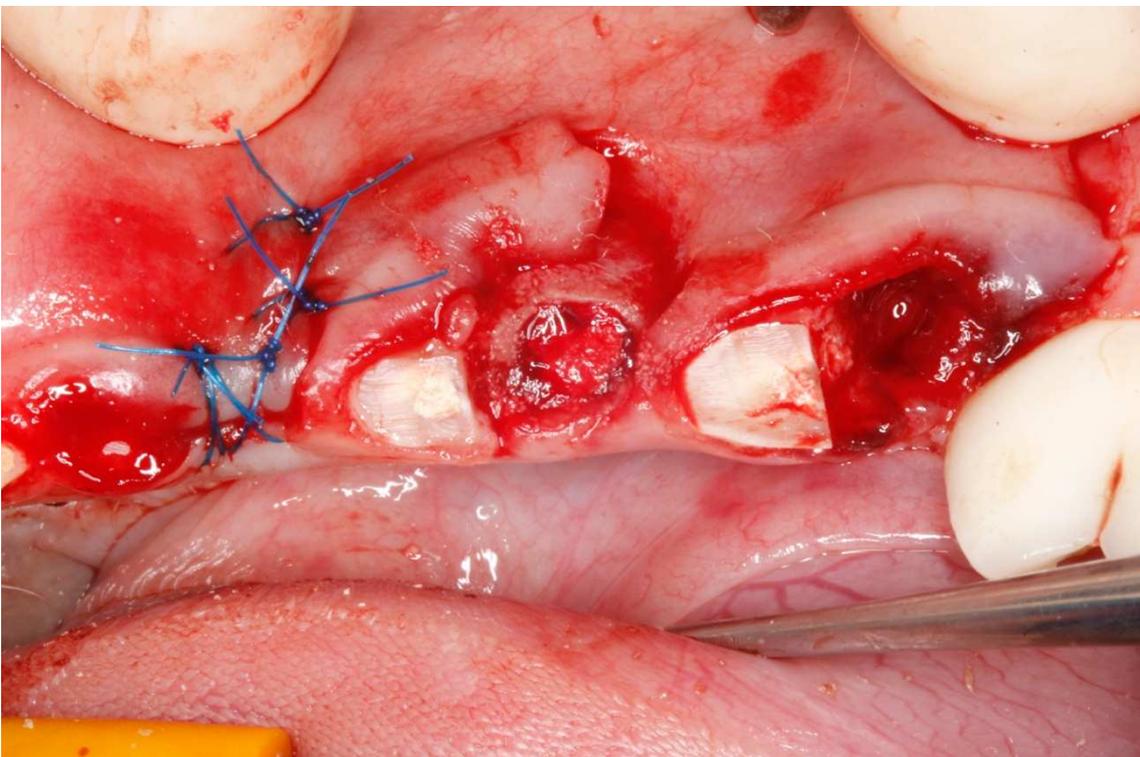


Abbildung 9: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T3 ready-to-use Bio Flow M2rtu (T3)

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

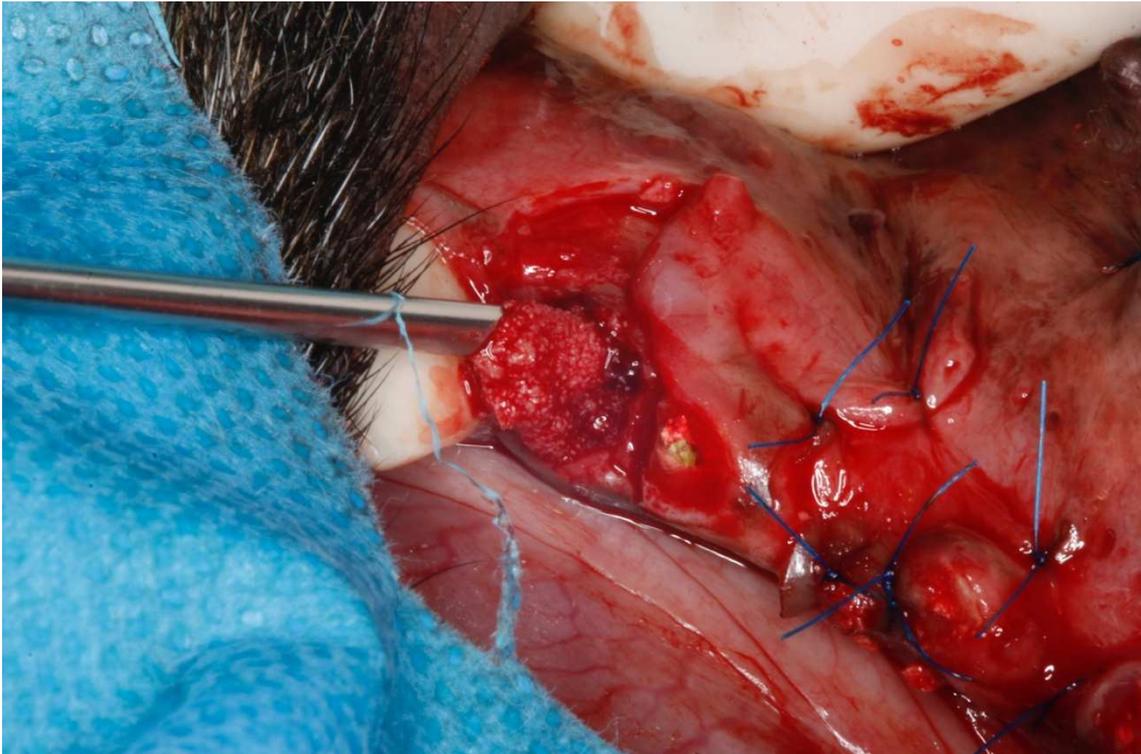


Abbildung 10: Klinisches Foto nach Augmentation des Defekts mit T4 Bio Flow M4L (gemischt mit Eigenspeichel)
324_L_P4

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

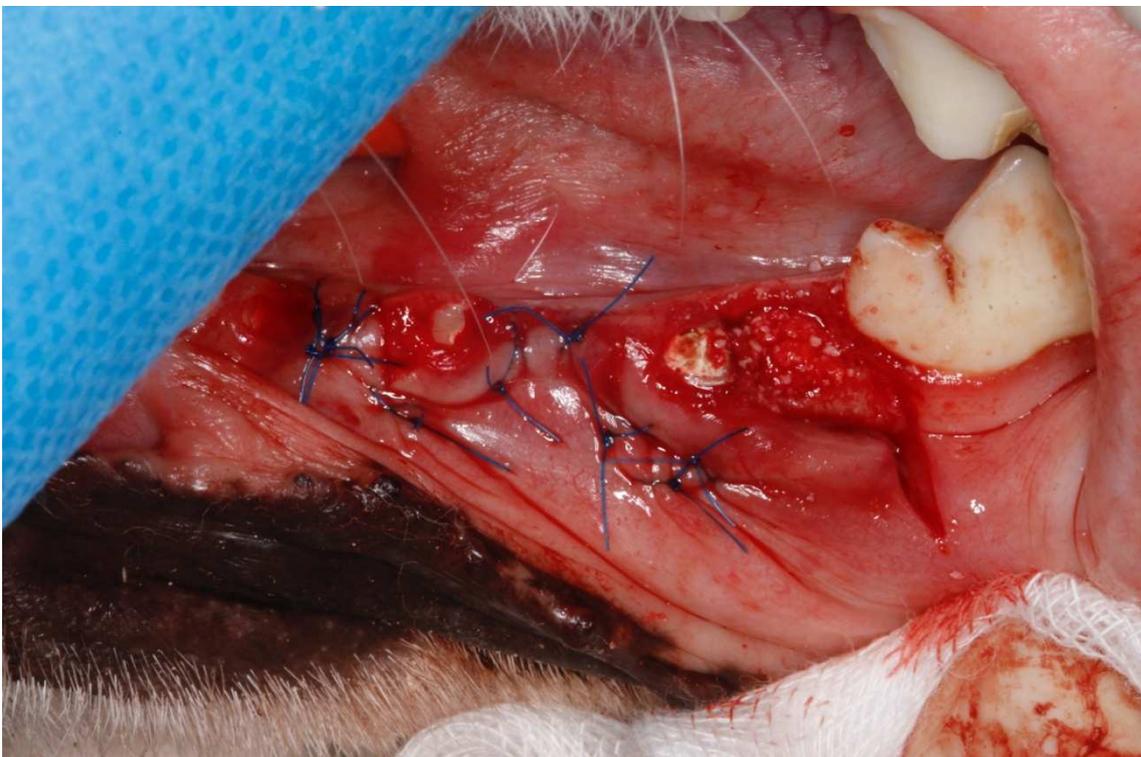


Abbildung 11: xenogenes Knochenersatzmaterial (BioOss®) (C)

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Geistlich Biomaterials

Bei Testgruppe 2 wurde zusätzlich zu dem gleichen Nano-Knochenersatzmaterial eigener Speichel hinzugegeben, eine Zugabe von Eigenblut erfolgte hingegen nicht. Testgruppe 3 beinhaltete lediglich das Nano-Knochenersatzmaterial ohne Zusätze und für die Testgruppe 4 wurde das Nano-Knochenersatzmaterial in einer höheren Konzentration zusammen mit Speichel injiziert. Die Kontrollgruppe wurde mit einem xenogenen Knochenersatzmaterial (BioOss®) versorgt und zuletzt eine Alveole leer belassen (N) Sham-Gruppe. Alle Wundränder wurden über nicht-resorbierbare Nähte adaptiert und mit einer Chlorhexidinlösung benetzt.

2.2.3 Nachsorge

Die Tiere wurden nach der Operation täglich nach dem Allgemeinzustand kontrolliert und überprüft, ob Todesfälle oder Erkrankungen vorgefallen waren. Die Wunden wurden täglich bis zum Ende der Wundheilung und zweimal wöchentlich bis zum Ende der klinischen Beobachtungsphase der Hunde geprüft. Entzündungszeichen wie Schwellung und Rötung, Dehiszenzen und Anzeichen von Infektionen wurden schriftlich festgehalten. Das Körpergewicht der Tiere wurde alle zwei Wochen auf 0,1 kg genau gemessen. Auch die Medikation nach der Operation wurde erfasst. So wurde die antimikrobielle Prophylaxe weitere 14 Tage nach dem Eingriff per os verabreicht (Spiramycin und Metronidazol). Als Entzündungshemmer gab man den Hunden täglich Carprofen (Carprodyl®, Ceva) weitere 6 Tage nach dem Eingriff ebenfalls per os. Zur Schmerzstillung wurde den Tieren am Ende des Eingriffs, sowie postoperativ über zwei Tage hinweg Buprenorphin (Buprecare®, Axience) verabreicht. Zuletzt wurde die Wunden bis zum Ende der Wundheilung mit Chlorhexidin gespült. Nach der etwa zweiwöchigen Wundheilungsphase wurden die Nähte entfernt. Im Anschluss an die 12- wöchige Einheilungsphase wurden die Tiere nochmal unter Vollnarkose untersucht und Fotos vom augmentierten Bereich erstellt. Veränderungen des Gewebes wurden unter Berücksichtigung folgender Parameter festgehalten; in ihrer Größe, Form, Farbe, Konsistenz und Verteilung. Zuletzt wurden die Hunde getötet und für die histomorphometrischen Analysen vorbereitet.

2.2.4 Entnahme und Aufbereitung der Biopsien

Jedes Tier wurde durch eine intramuskuläre Injektion von Tiletamin Zolazepam (Zoletil®, Virbac) betäubt und erhielt eine subkutane Injektion von Buprenorphin (Buprecare®, Axience). Nach der Intubation wurden sie mechanisch beatmet und mit Isofluran-Inhalationsmittel (IsoFlo®, Zoetis) versorgt. Anschließend wurden Katheter in die Halsschlagadern eingeführt. Alle Tiere wurden heparinisiert (300 IE/kg, intravaskulär) (Heparin Choay, Sanofi-Aventis, Paris, France). Anschließend wurden die Hunde durch die Injektion einer tödlichen Dosis von Pentobarbital (Dolethal®, Vetequinal) eingeschlafert. Die seziierten Blöcke wurden in 10% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert, mit aufsteigenden Alkoholkonzentrationen entwässert, in Xylol geklärt und für die nicht entkalkte Schnitterstellung im Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet. Anschließend wurden Mikro-CT Scans (siehe Folgeabschnitt) von jeder Unterkieferhälfte erstellt. Zusätzlich wurden zwei entwässerte Lymphknoten pro Tier untersucht und für eventuelle histopathologische Analysen in 10%igem Formalin eingebettet.

2.3 Mikro-Computertomographie-Scans

Vor dem Anfertigen der histologischen Schnitte wurden die 46 Proben mithilfe eines Mikro-CT (μ CT 40, Medical AG, Switzerland) gescannt. Dafür wurden die Proben in zylinderförmige Halter gelegt, um Tomographien in bucco-lingualer Ausrichtung zu erhalten.

2.4 Dreidimensionale Analyse der Datensätze

Die Mikro-CT-Datensätze wurden mithilfe der Software „ μ CT Evaluation Software Program V6.5“ (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) bearbeitet und ausgewertet. Die Mikro-CT Scans wurden nach erfolgter Rekonstruktion zunächst mit einem Gauß-Filter gefiltert und ausgerichtet. Im Anschluss erfolgte Definition der VOIs und eine schwellwertbasierte Segmentierung der Hartgewebe (Becker, Jandik et al. 2019). Schließlich erfolgte die Ermittlung der morphometrischen Parameter Knochenfraktion (BV/TV), Trabekeldicke (Tb. Th.), Trabekelzahl (Tb. N.) und intertrabekulärer Abstand (Tb. Sp.).

Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden näher erläutert:

2.4.1 Ausrichtung der Datensätze entlang der Zahnachse (Z-Achse)

Nachdem die Z-Achse der im Knochen verbliebenen mesialen Zahnwurzeln errechnet wurden, wurden alle Proben entlang der Achse dieser residuellen Zahnwurzel (mesiale Wurzel) ausgerichtet. Mittels Transformationsmatrizen musste der Datensatz dazu so rotiert und angepasst werden, dass die berechnete Wurzelachse genau auf der Z-Achse lag. Als Referenzpunkte P1, P2 und P3 wurden folgende Punkte im Mikro-CT ausgewählt (siehe Abb.4);

P1=Apex der mesialen Wurzel

P2= Mittelpunkt der mesialen Zahnwurzel auf Höhe des krestalen Levels

P3= Bukkaler Referenzpunkt

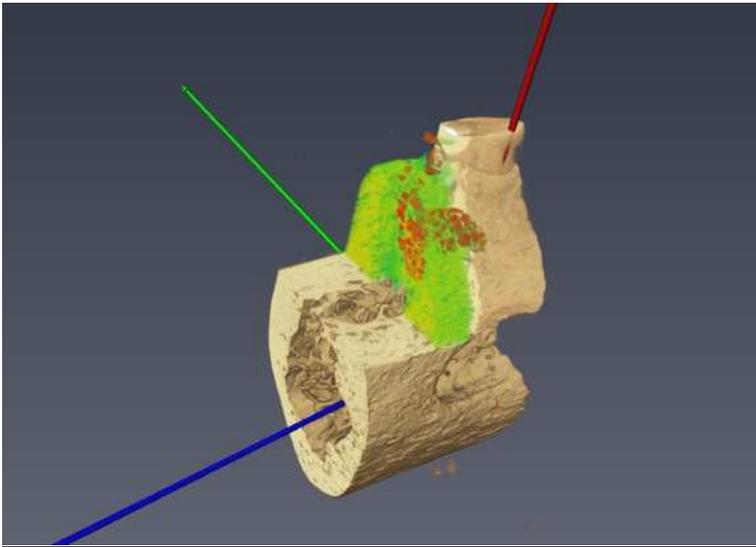


Abbildung 12: Datensatz nach Ausrichtung der Achsen rot: Z-Achse, blau: X-Achse, grün: Y-Achse, grüner Bereich: Bereich der Augmentierten Alveole und Volume of Interest (VOI), roter Bereich: Augmentationsgranulat

Quelle: Screenshot Amira

Diese Referenzpunkte wurden interaktiv in den Datensätzen schichtweise in korono-apikaler Richtung aufgesucht und entsprechende Koordinaten notiert. Durch das Align-in-Z-and-Reimport-Skript von Scanco Medical wurden jene Orientierungspunkte (P1, P2 und P3) übertragen und die Transformationsmatrix berechnet. Durch das Skript wurden die Datensätze anschließend so rotiert, sodass die Zahnachse in der XY-Ebene lag und die Z-Achse der mesio-bukkalen Dimension entsprach. Als Ergebnis wurden neue (Image Sequence) ISQ-Dateien erzeugt, die nun in einer standardisierten Ausrichtung vorlagen. Je

nach Fragestellung wurde einer der beiden ausgerichteten Datensätze für die folgenden Messungen herangezogen. Als letzten Schritt der Ausrichtung folgte die visuelle Überprüfung.

2.4.2 Bestimmung des Volumes of Interest

Als nächster Schritt erfolgte die Definition eines standardisierten *Volume of Interest* (VOI). Da das Knochenersatzmaterial etwa 1 mm oberhalb des ursprünglichen Apex injiziert wurde, sollte in dieser Region die noch sichtbare apikale Ausdehnung des Knochenersatzmaterials identifiziert und als apikale Begrenzung festgelegt werden. Eine standardisierte ROI mit einer Größe von Breite mal Tiefe (100x200 px) wurde an der bukkalen Kante der mesialen Wurzel platziert. Anschließend wurde ein rechteckiges VOI erzeugt, dessen Höhe analog zur Granulatausdehnung festgelegt wurde. Als koronare Ausdehnung wurde dabei die krestale Knochenkante definiert. In diesem standardisierten augmentierten Areal, bestehend aus kortikalem, trabekulärem Knochen und Augmentationsgranulat, wurde die Knochenmikrostruktur analysiert.

Bei einigen Proben bestand das Problem, dass das VOI größer war als der Kieferknochen im entsprechenden Bereich. Hier musste das VOI nachträglich angepasst werden. Dies wurde so vorgenommen, dass alle 10 bis 15 Schichten in vertikaler Richtung geprüft wurde, ob das Rechteck (ROI) vollständig im Knochen lag. Falls dies nicht der Fall war, wurde es so verschoben, bis dies erfüllt war. Auf diesem Wege konnte zudem der Krümmung der distalen Wurzel Rechnung getragen werden. Die so erzeugten ROIs wurden dann verbunden.

2.4.3 Filterung und Schwellwertbestimmung (Segmentierung)

Vor Segmentierung fand der Gauß-Filter zur Rauschreduktion und Kantenschärfung Anwendung. Ferner wurde zur bestmöglichen Repräsentation des Knochengewebes ein geeigneter Schwellwert identifiziert, um mineralisierte Bereiche von nicht-mineralisierten Bereichen abzugrenzen. Der globale Schwellwert wurde in diesem Fall auf 220 festgelegt (22% des maximalen Grauwertes). Der absolute Grauwert von 220 stellte in unserer Studie eine ausreichende Einstellung dar, um mineralisierte Bereiche von nicht-mineralisierten abzugrenzen. Durch visuelle Kontrolle der einzelnen Proben konnten keine Fremdkörper im Sinne von Artefakten identifiziert werden.

2.4.4 Lineare Messungen

Zum ersten Schritt des Auswertungsablaufs gehörte die Bestimmung des Apex der Zahnwurzel und die Notation der Koordinaten. Danach wurde die Ausdehnung des Granulats auf der Z-Achse gemessen. Dazu wurden erneut die Koordinaten auf der Z-Achse am apikalsten und koronalsten Punkt aufgezeichnet, wo noch eine Knochenremodellierung (oder Granulat) erkennbar war (Abb. 13).

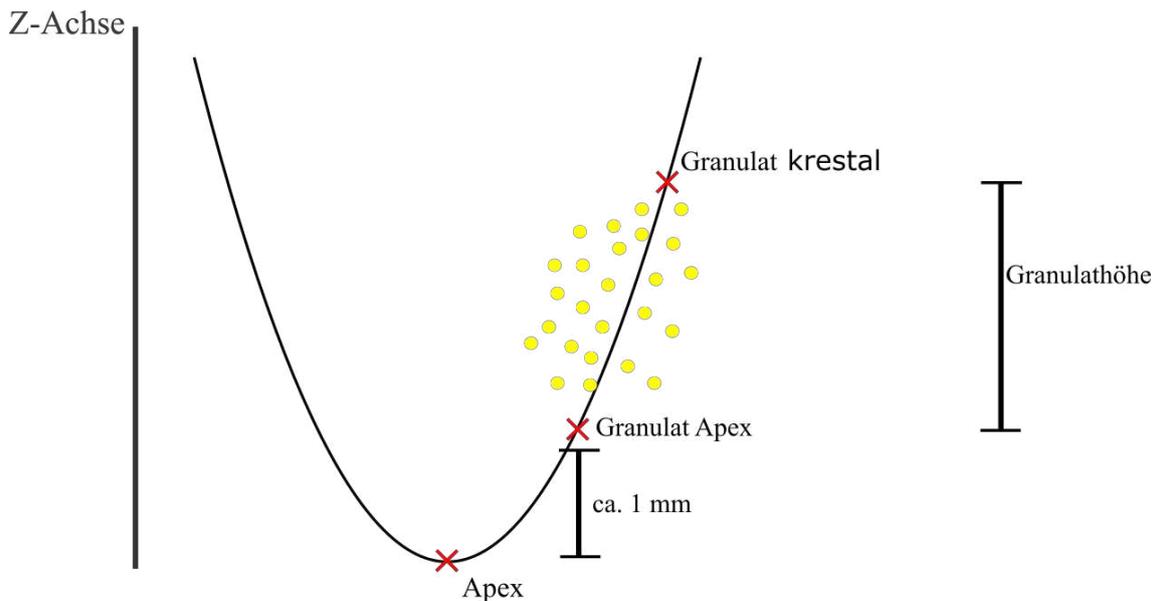


Abbildung 13: Schema-Zeichnung zur Berechnung der horizontalen Ausdehnung des Granulats auf 50 % der Defekthöhe (entspricht der im Mikro-CT-Scan erkennbaren Granulathöhe). In der Sham-Gruppe wurde (da kein Granulat vorhanden war) der Bereich im Scan noch erkennbarer Knochenremodellierung erfasst und analog die 50%-ige Defekthöhe bestimmt.
Quelle: Eigene Darstellung

Die nachfolgende mathematische Gleichung diente zur Berechnung der „50p“-Höhe (50 % Defekthöhe), auf welcher die horizontale Koritkalisdicke bestimmt wurde;

$$50p = Apex + \frac{1}{2} * (krestal - Apex)$$

Die kortikale Dicke wurde bukkal und oral in bukko-lingualer Richtung auf 50% der Höhe der errechneten Mitte zwischen Oberkante des Granulats und Wurzelapex und somit leicht unterhalb der angenommenen mittleren Höhe des noch erkennbaren KEMs durchgeführt. Durch das Längenmessungstool wurde die bukkale Knochendicke von der bukkalen Begrenzung bis zum mit augmentierten Defektbeginn gemessen (Abb. 14), eine entsprechende Vermessung der oralen Kompaktadicke wurde ebenfalls durchgeführt (Abb. 15).

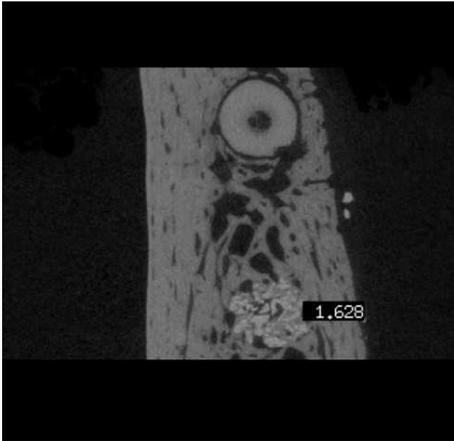


Abbildung 14: Messung der kortikalen Dicke bukkal auf 50% der Defekthöhe

Quelle: Screenshot UCT Evaluation



Abbildung 15: Messung der kortikalen Dicke oral auf 50% der Defekthöhe

Quelle: Screenshot UCT Evaluation

Zur Bestimmung der Knochenhöhe wurden auf der Z-Achse (Zahnachse) die Höhe des Wurzelapex auf der XY Ebene sowie die Höhe des tiefsten koronalen Punktes im Defekt (TP) bestimmt. Die Höhendifferenz zwischen TP und Apex ergab nach Multiplikation der Voxelzahl mit der Auflösung die vertikale Knochenhöhe (in mm). Je geringer die Knochenhöhe ausfiel, desto größer war der vermutete vertikale Knochenverlust.

2.4.5 Knochenmikromorphometrie im Volume of Interest

Die trabekuläre Knochenmikrostruktur in dem vorher gewählten VOI wurde mithilfe des Scanco Evaluation Tools unter Nutzung von in-house Skripten analysiert, welche von Prof. Dr. Kathrin Becker zusammengestellt und zur Verfügung gestellt wurden. Die morphometrischen Analysen wurden nach den Empfehlungen der ASBMR durchgeführt.

Das in 2.4.2 gewählte VOI wurde knochenmorphometrisch analysiert. Dafür wurden Start- und Endpunkte der Schichten in der Z-Achse wie bereits zuvor beschrieben gewählt.

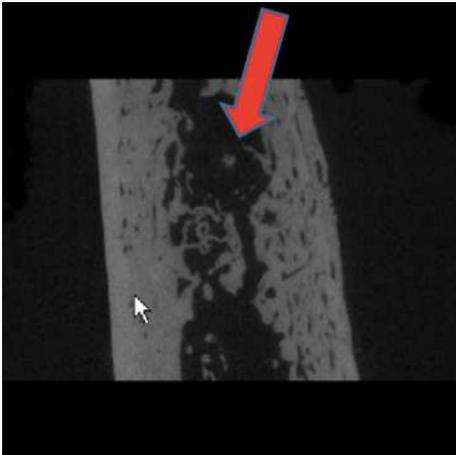


Abbildung 16: Roter Pfeil zeigt auf Apexbeginn auf der Z-Achse

Quelle: Screenshot UCT Evaluation

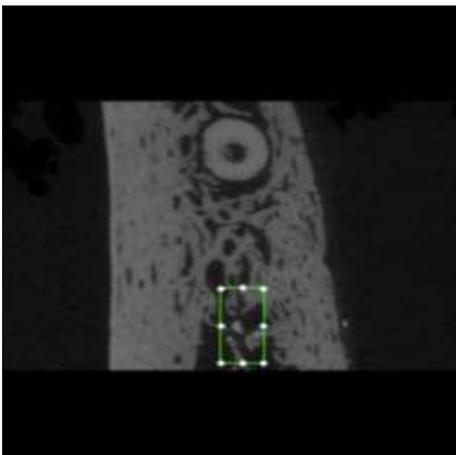


Abbildung 17: Granulat am apikalsten Punkt des Augmentationsbereichs

Quelle: Screenshot UCT Evaluation

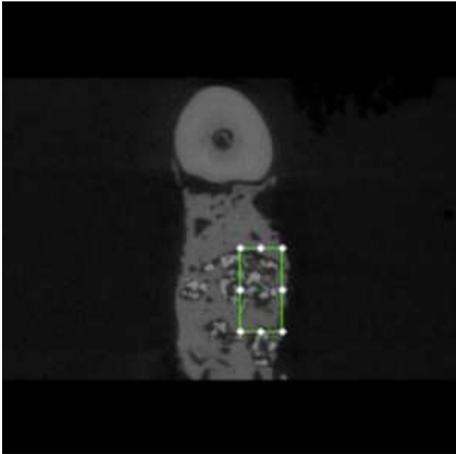


Abbildung 18: Granulat am koronalen Punkt des Augmentationsbereichs

Quelle: Screenshot UCT Evaluation

Um die Knochenfraktion (BV/TV) im VOI zu ermitteln, setzte die Software das Knochenvolumen (BV , bone volume) in Relation zum Gesamtvolumen (TV , total volume). Das mineralisierte Volumen des Gesamtvolumens im VOI wurde zuvor durch Voxelzählung ermittelt. Auch die durchschnittliche Trabekeldicke ($Tb. Th.$, trabecular thickness), das durchschnittliche Volumen des intertrabekulären Raumes ($Tb. Sp.$, trabecular separation) sowie die zugehörigen Standardabweichungen ($Tb.Th.Sd.$, $Tb.Sp.Sd.$) wurden errechnet. Für die Berechnung von $Tb. Th.$, $Tb. Sp.$ fanden die die Distanz-Transformation und Sphere-Fitting-Methode Anwendung. Die spezifische Knochenoberfläche (BS/BV) konnte durch Division des Knochenvolumens abgeleitet werden.

2.4.6 Anwesenheit von Granulatresten außerhalb des augmentierten Bereiches

Weiterhin wurde bestimmt, in welchen Proben und Gruppen sich Granulat außerhalb des Kieferknochens befand. Nach Untersuchung der Mikro-CT Scans, ob sich Granulat extern vom Knochenblock befindet, wurde eine „0“ für nein in die Excel Tabelle eingetragen und eine „1“, sobald sich Granulatreste außerhalb des Augmentationsbereiches befanden. Als genaueren Anhaltspunkt wurde die Lokalisation „bukkal“ oder „zentral“ beschrieben, um Rückschlüsse auf eventuelle Augmentationsschwierigkeiten im Zusammenhang mit der Beschaffenheit des Augmentationsmaterials zu geben.

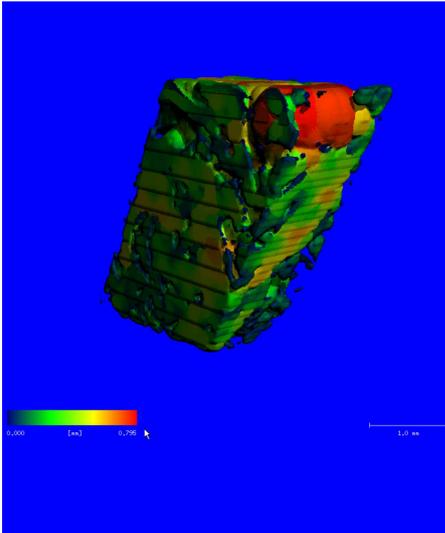


Abbildung 19: 3D Auswertung der Probe; „0“ und „zentral“

Quelle: Screenshot UCT Evaluation

2.4.7 Volumetrische Messung des bukkalen Knochendefektes

Als nächstes wurde eine Messung des bukkalen Knochendefektes in mm^3 vorgenommen. Dafür wurden die im Mikro-CT erkennbaren Defekte interaktiv auf jede 10. Schicht eingezeichnet und anschließend auf die restlichen Slices übertragen. Anschließend wurde die Defektgröße in mm^3 ermittelt.

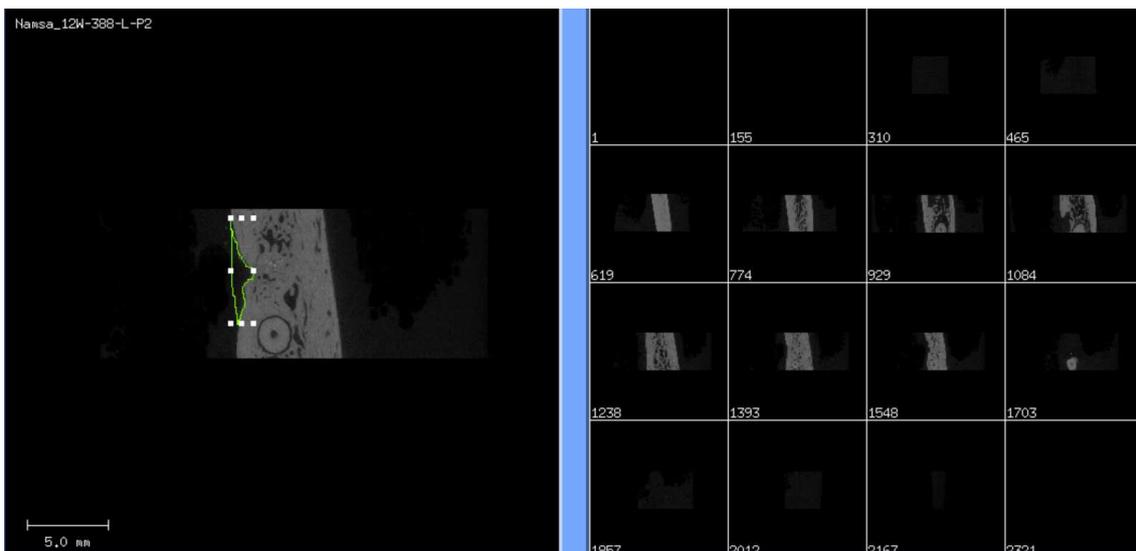


Abbildung 20: Darstellung der Defekteinzeichnung

Quelle: Screenshot UCT Evaluation

2.5 Statistische Analyse

Die Statistik wurde mit dem Softwareprogramm R (R Development Core Team, 2016) durchgeführt. Die 46 Datensätze unterteilten sich in Kontrollgruppe (7 Versuchstiere), Sham-Gruppe (6 Versuchstiere), T1-Gruppe (8 Versuchstiere), T2-Gruppe (8 Versuchstiere), T3-Gruppe (9 Versuchstiere) und T4-Gruppe (8 Versuchstiere). Für jede Behandlungsgruppe wurden Lineare Messungen sowie die morphometrischen Parameter (TV, BV/TV, Tb. Th., Tb. Sp. und BS/BV) erfasst. Die Werte wurden je Tier gemittelt und anschließend vergleichend analysiert. Anschließend wurden Boxplots zur deskriptiven Analyse erstellt. Außerdem wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet, um die verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander zu vergleichen. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

Die Tiere blieben bis zu ihrer Tötung allgemein anamnestisch, in ihrem Verhalten und ihrer Nahrungsaufnahme unauffällig. Zusätzlich gab es während der gesamten Heilungsperiode lokal keine Anzeichen auf allergische Reaktionen, Wundinfektionen, Schwellungen oder Abszedierungen. Die Einheilung des Nano-Knochenfüllmaterials wurde in den unterschiedlichen Proben untersucht.

3.1 Mikro-Computertomographie-Analyse

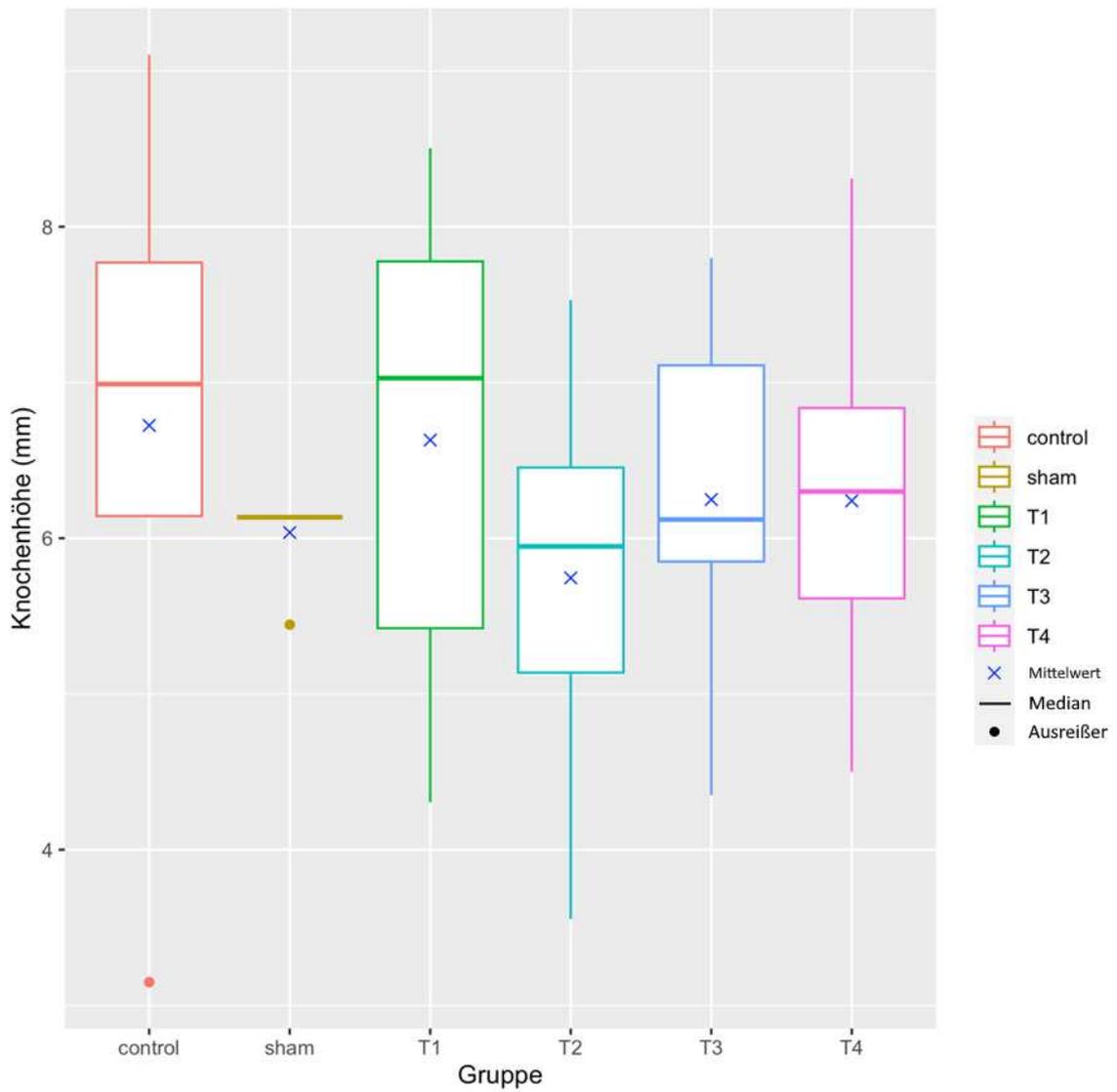
Die Ergebnisse der morphometrischen Analysen wurden zu deskriptiven Zwecken per Boxplots (Abb. 21- 26) und mittels Tabellen (Tab. 1-9) zusammengefasst. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

3.2 Lineare Messungen

3.2.1 Vergleich der Knochenhöhe

Zur Bestimmung der Knochenhöhe wurden auf der Z-Achse (Zahnachse) die Höhe des Wurzelapex auf der XY-Ebene sowie die Höhe des tiefsten Punktes im Defekt bestimmt. Die Differenz ergab die vertikale Knochenhöhe ab Apex. In Tabelle 1 wird die vertikale Knochenhöhe ab Apex bis zur krestalen Grenze in Millimetern der Gruppen T1, T2, T3 und T4, sowie der Kontrollgruppe und der Negativkontrolle (Sham-Gruppe) aufgezeigt. Da bei drei Proben die Granulatgesamthöhe sehr niedrig war (Distanz zwischen Wurzelapex und mittlerer Granulathöhe < 1,5 mm), wurden diese als Ausreißer klassifiziert und aus der Analyse ausgeschlossen. Es handelte sich um Proben der Gruppen T4 (eine Probe) und Sham-Gruppe (2 Proben). Die Boxplots zeigen die Knochenhöhe in den verschiedenen Test- sowie der Kontrollgruppe. Der Mittelwert wurde als ‚x‘ dargestellt und der Median jeweils als ‚-‘ im Boxplot. Die Ausreißer wurden entsprechend in Form von Punkten visualisiert.

Der Kruskal Wallis Test, welcher die unterschiedlichen Gruppen verglich, war nicht signifikant ($p=0,317$). Jedoch zeigte sich tendenziell, dass die Knochenhöhe in der Kontrollgruppe sowie in der T1 Gruppe tendenziell knapp einen mm höher ausfielen als in den verbleibenden Gruppen (Abb. 20).



x

Abbildung 21: Knochenhöhe (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

Knochenhöhe					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	6,72	6,99	3,15	9,11	
Shamgruppe	6,00	6,14	5,45	6,14	
T1	6,63	7,03	4,31	8,51	2
T2	5,39	5,88	3,29	7,53	
T3	6,25	6,12	4,35	7,80	
T4	6,30	6,53	4,50	8,31	

Tabelle 1: Knochenhöhe (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.2 Wundheilung (Höhe)

Die Auswertung der Wundheilung beschreibt das vertikale Ausmaß des Bereiches, in welchem Remodellierung erkennbar war. In T1 war die Höhe des Bereiches, in der noch Wundheilung erkennbar war, am ausgeprägtesten, gefolgt von der T3 Gruppe. Auch für diese Analyse wurden die drei Proben, die als Ausreißer klassifiziert worden waren, ausgeschlossen. Die Ausreißer sind erneut als Punkte gekennzeichnet. Die Mittelwerte sind als ‚x‘ in den Boxplots markiert. Die niedrigsten Werte ließen sich in der Sham-Gruppe ($MW_{sham} 5,38\text{mm}$) beobachten (Abb. 21). Die Knochenremodellierung war in der Kontrollgruppe ($Median_{Kontrolle} 4,26\text{ mm}$) und in den Gruppen T2 und T4 ($Median_{T2} 3,47\text{ mm}$; $Median_{T4} 4,65\text{ mm}$) ziemlich ausgeglichen. Der Kruskal-Wallis-Test war mit einem Wert von $p=0,122$ nicht signifikant.

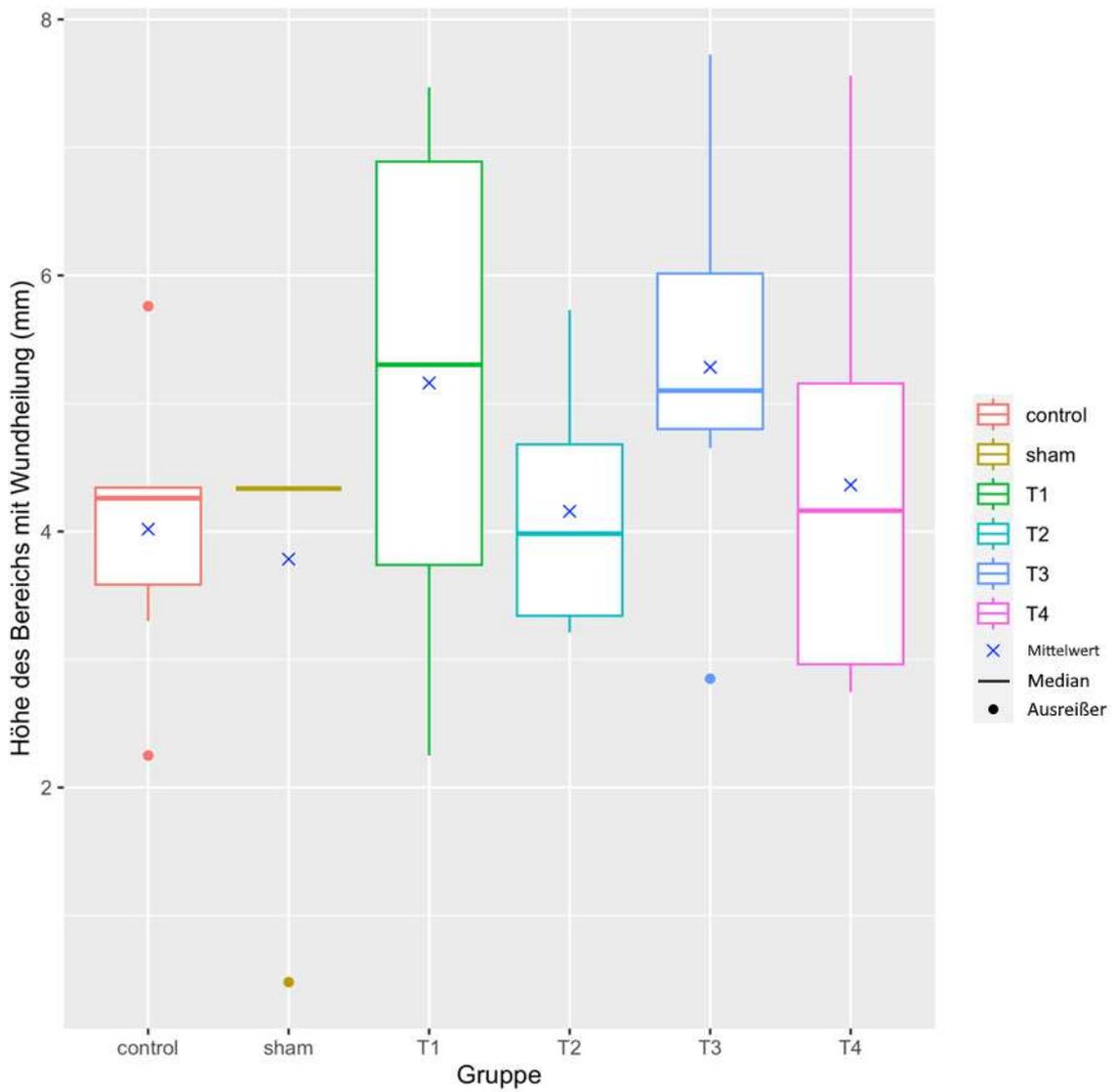


Abbildung 22: Höhe des Bereichs mit Wundheilung (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

Höhe des Bereichs mit Wundheilung (mm)					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	4,02	4,26	2,25	5,76	
Shamgruppe	3,56	4,34	0,48	4,34	
T1	4,38	3,89	0,75	7,47	
T2	4,00	3,47	3,06	5,73	
T3	5,28	5,10	2,85	7,73	
T4	4,56	4,65	2,75	7,56	

Tabelle 2: Höhe des Bereichs mit Wundheilung (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.3 Vergleich der kortikalen Dicke bukkal

Die kortikale Dicke der augmentierten Bereiche wurde auf 50% der Knochenhöhe bestimmt. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der kortikalen Dicke der analysierten Gruppen in Millimetern angegeben. Die kortikale Dicke (bukkal) zeigt die höchsten Werte in Gruppe T1 mit Werten zwischen 1,14 (Min_{T1}) und 3,06 mm (Max_{T1}). Die tendenziell niedrigste kortikale Dicke an der bukkalen Knochenkontur zeigte neben der Negativkontrolle mit einem Wert von 1,24 mm (MW_{sham}) die Kontrollgruppe ($K_{Kontrolle}$) mit 1,31 mm ($MW_{Kontrolle}$). Die angewandte statistische Analyse vermochte die Signifikanz der dargelegten Differenzen nicht zu bestätigen (Kruskal Wallis- Test, $p = 0,54$).

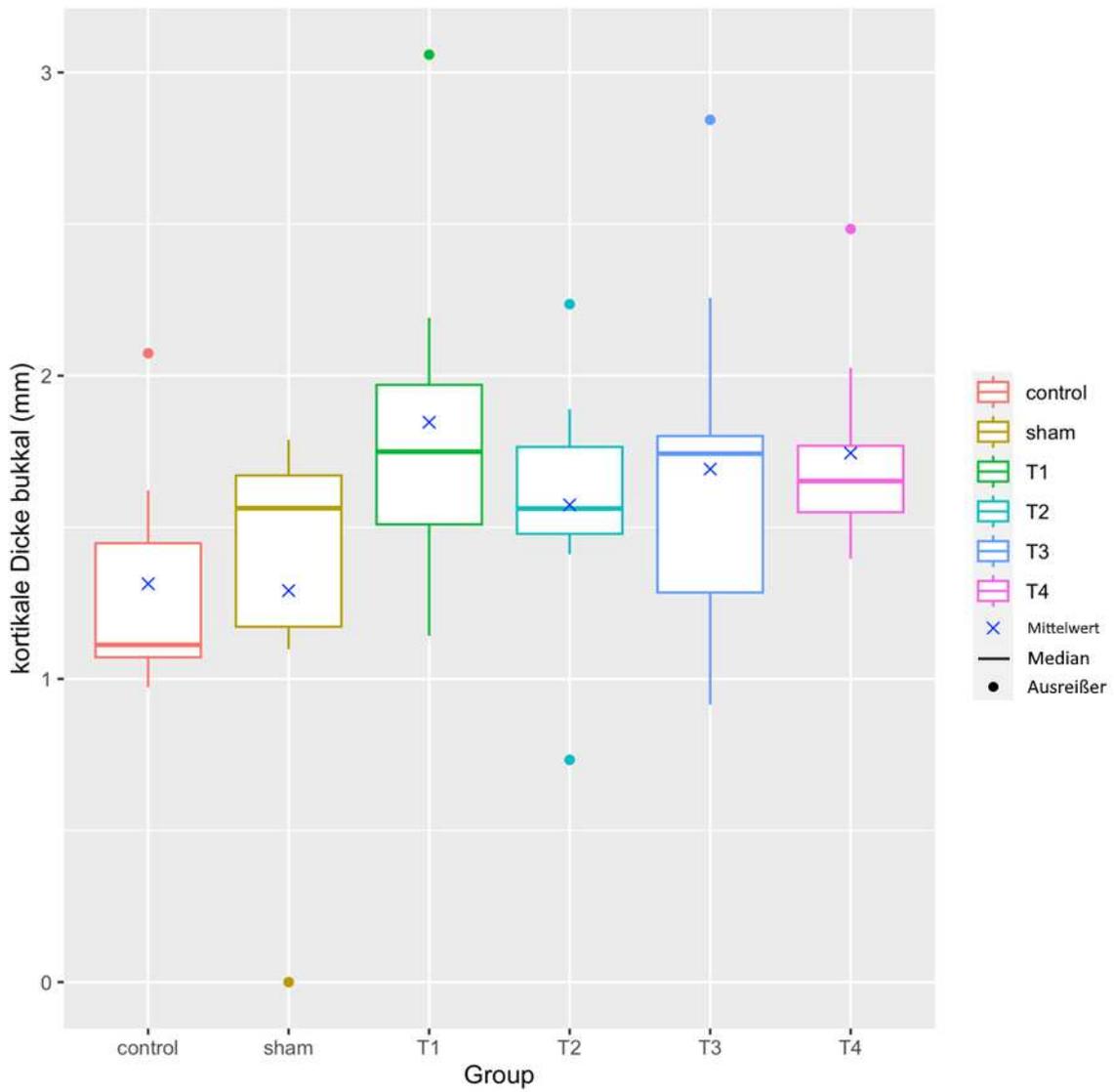


Abbildung 23:Kortikale Dicke bukkal (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

Kortikale Dicke bukkal					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	1,31	1,11	0,97	2,07	
Shamgruppe	1,24	1,56	0,00	1,79	
T1	1,85	1,75	1,14	3,06	
T2	1,57	1,56	0,73	2,24	
T3	1,69	1,74	0,92	2,84	
T4	1,64	1,62	1,40	2,03	

Tabelle 3: Kortikale Dicke bukkal (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.4 Vergleich der kortikalen Dicke oral

Im oralen Bereich der Kortikalis waren Mittelwerte von 2,38 mm (MW_{sham}) bis 3,26 (MW_{T1}) festzustellen (Tabelle 3). Die kortikale Dicke oral war mit dem Wert 3,26 mm (MW_{T1}) in Gruppe T1 am höchsten und den niedrigsten Wert konnte neben der Negativgruppe (MW_{sham}) mit 2,38 mm bei der Gruppe T2 mit 2,59 mm (MW_{T2}) aufgezeichnet werden. Die höchste Streuung war in Gruppe T1 (MinT1;2,22 mm; MaxT1:5,59 mm) sichtbar. Der Kruskal Wallis Test war hier mit einem Wert von $p=0,54$ nicht signifikant. Die drei Ausreißer wurden auch bei der Analyse dieses Parameters herausgenommen. Die Ergebnisse für die kortikale Dicke oral unterschieden sich jedoch mit und ohne Ausreißer nicht relevant.

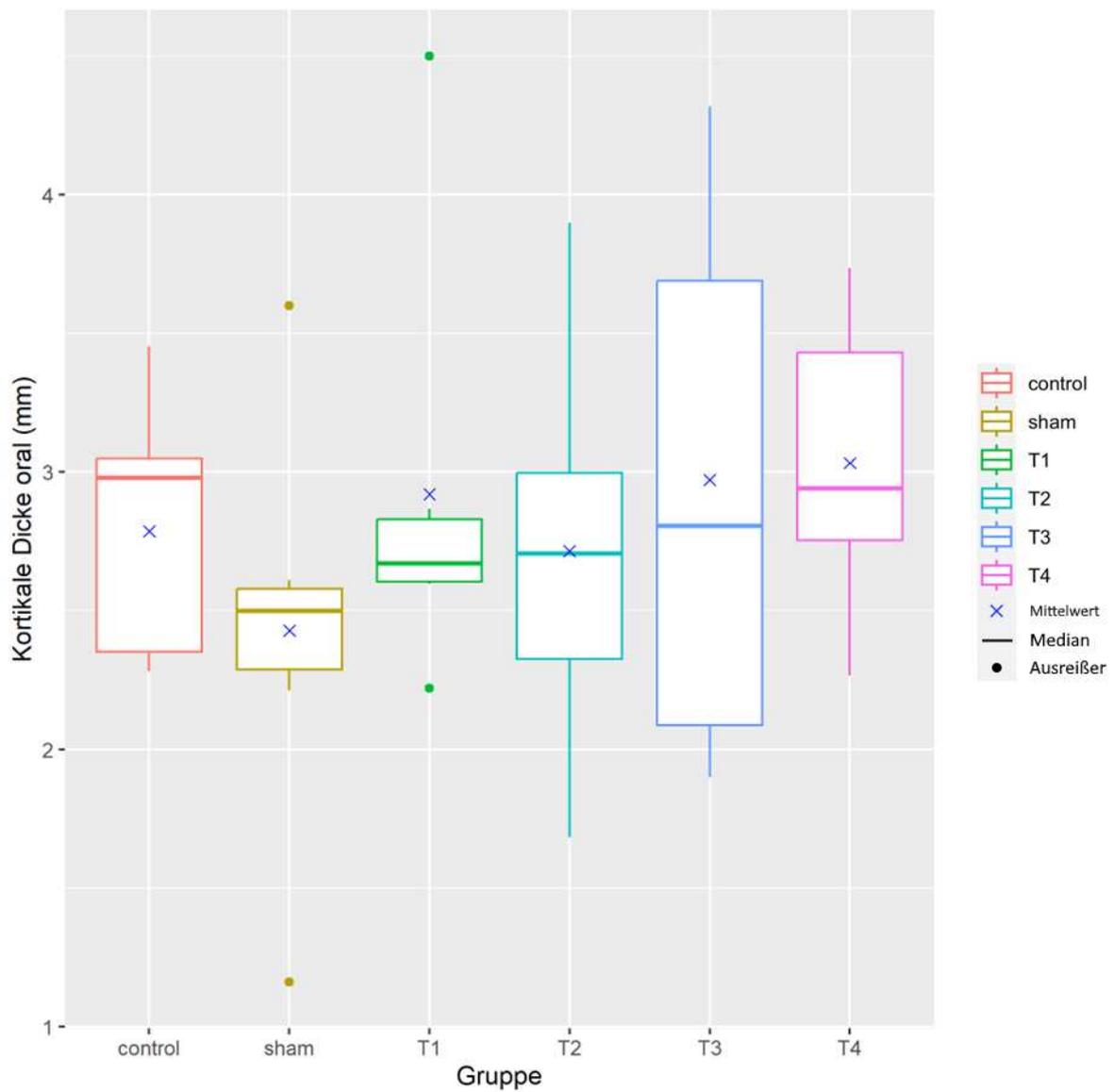


Abbildung 24: Kortikale dicke oral (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

Kortikale Dicke oral					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	2,79	2,98	2,28	3,45	
Shamgruppe	2,38	2,37	1,16	3,60	
T1	3,26	2,79	2,22	5,59	
T2	2,59	2,52	1,68	3,90	
T3	2,97	2,81	1,90	4,32	
T4	2,98	2,79	2,27	3,74	

Tabelle 4: Kortikale Dicke oral (mm)

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.5 Granulatlokalisation

Die Messung der Granulatlokalisation umfasst den Augmentationsbereich in und um die Extraktionsalveole im gesamten VOI. Auch für diese Analyse wurden die drei Ausreißer nicht berücksichtigt. In einer weiteren deskriptiven Analyse wurde erfasst, ob und falls ja wo sich das applizierte Knochenersatzmaterial befand (Tabelle 4). Nicht im Knochen stehendes Granulat wurden am seltensten in der Gruppe T1 (12,5%) und in der Gruppe T4 (12,5%) beobachtet. Dies bedeutete, dass die Granulate frei im VOI des Mikro-CT Scan vorlagen und nicht direkt in der Extraktionsalveole lagen. Sofern die Granulatreste sich innerhalb der Alveole befanden, wurde auch dies festgehalten. Weiter wurde die Position der Granulatrückstände erfasst, so wurden Granulate sowohl bukkal, als auch zentral auf dem Kieferkamm beobachtet. Am häufigsten konnte Granulatreste außerhalb des Knochens bei den Proben der T3 Gruppe mit einem Wert von 33,3 % festgestellt werden. Im Vergleich zu den Gruppen T1, T2, und T4 zeigen die Gruppen T3 sowie die Kontrollgruppe somit den höchsten Anteil an Granulat außerhalb der Alveole (Abbildung 20). Auch hier war der Kruskal Wallis Test mit einem Wert von $p=0,54$ nicht signifikant.

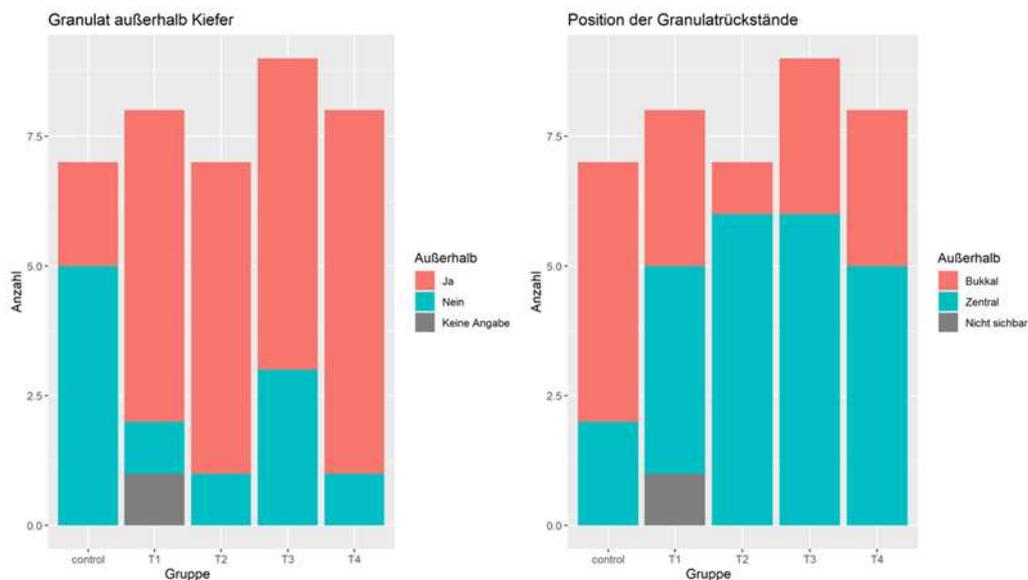


Abbildung 25: Granulatlokalisation

Quelle: Eigene Darstellung

Granulat außen					
Gruppe	Ja	Nein	Ja, in %	Nein, in %	n
Kontrolle	5	2	71,4	28,6	7
Shamgruppe	0	5	0,00	100,00	5
T1	1	7	12,5	87,5	8
T2	1	6	14,3	85,7	7
T3	3	6	33,3	66,7	9
T4	1	6	14,3	85,7	7

Tabelle 5: Granulatlokalisation

Quelle: Eigene Darstellung

3.3 Volumetrische Mikromorphometrische Analysen

3.3.1 Anteil des horizontalen Knochendefektvolumens (mm³)

Der höchste Anteil nicht-mineralisierten Defektvolumens wurde bei der Testgruppe T4 (MW_{T4}: 21,73 mm³) gemessen (Abb. 25). Darauf folgte die Gruppe T1 mit einem Mittelwert von 20,08 mm³ (MW_{T1}: 20,08 mm³). Für die Negativkontrolle sowie die Gruppe T2 ließen sich in etwa ähnlich große horizontale Knochendefekte beobachten (MW_{sham}: 18,82 mm³

und MW_{T2} : $16,03 \text{ mm}^3$). Besonders auffällig war hier die Testgruppe T3 mit einem Mittelwert von $11,68 \text{ mm}^3$ (MW_{T3} : $11,68 \text{ mm}^3$). Hier war verglichen zu den anderen Testgruppen eine besonders niedrige Streuung zu vermerken (Min_{T3} : $0,16 \text{ mm}^3$; Max_{T3} : $20,76 \text{ mm}^3$). Der Kruskal Wallis Test war nicht signifikant ($p=0,472$).

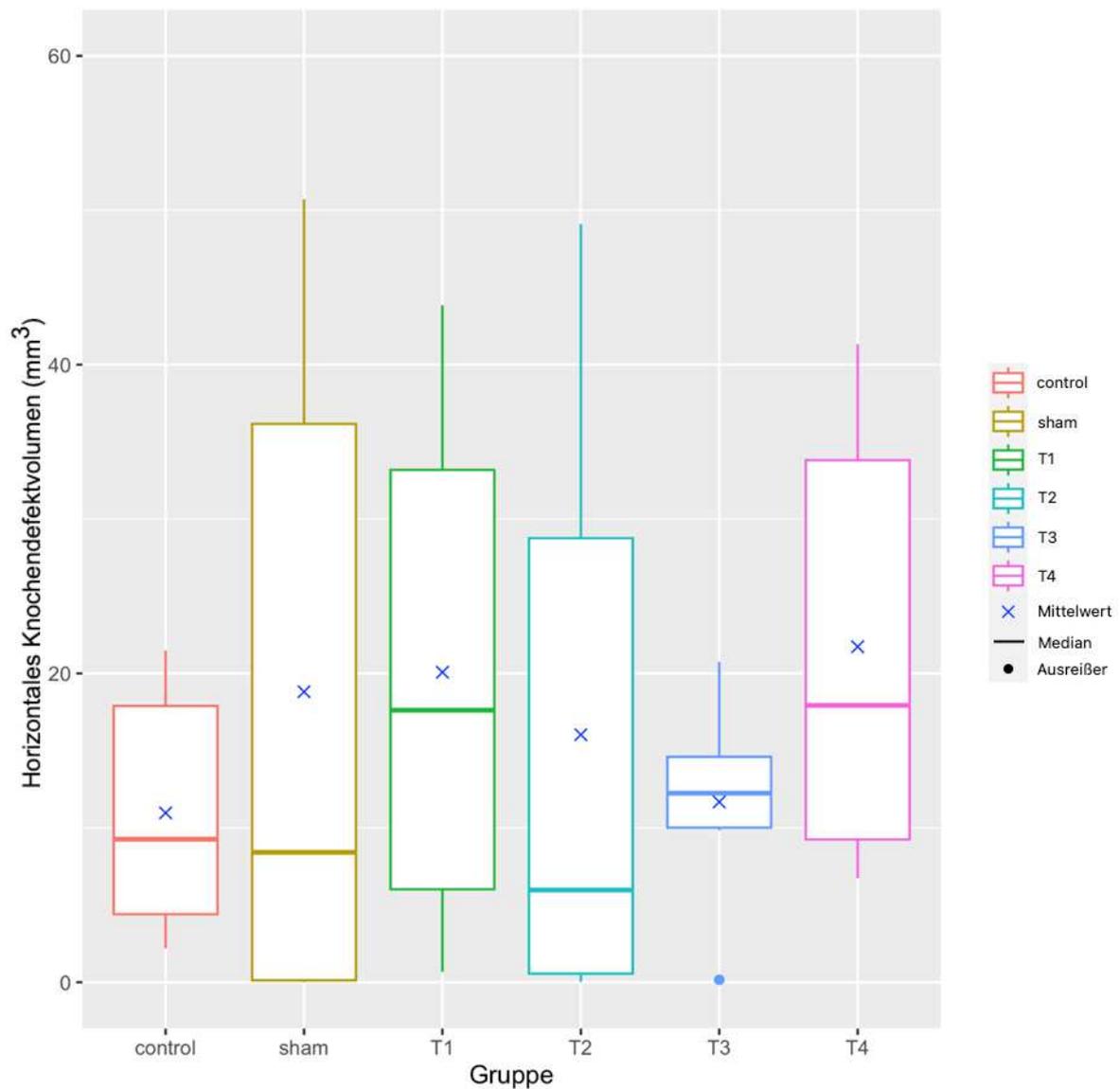


Abbildung 26: Ergebnisse der Messung der residuellen Gesamtdefekte zusammengefasst im Boxplot (in Voxeln)

Quelle: Eigene Darstellung

Anteil des horizontalen Knochendefektvolumens					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	10,97	9,27	2,20	21,50	1
Sham	18,82	8,42	0,00	50,72	
T1	20,08	17,62	0,67	43,85	
T2	16,03	5,97	0,03	49,12	
T3	11,68	12,24	0,16	20,76	1
T4	21,73	17,93	6,74	41,32	1

Tabelle 6: Ergebnisse der Messung der residuellen Gesamtdefekte (in Voxel)

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.2 Knochenfraktion (BV/TV)

Die niedrigste Knochenfraktion konnte in der Gruppe T1 beobachtet werden (MW_{T1} : 64,6 %). Die Mittelwerte erstreckten sich von MW_{T1} : 64,6 % bis MW_{T2} : 79,8 %. In der Sham-Gruppe konnte der höchste Median mit 79,7 % ermittelt werden (Median_{T3}: 79,7%). Danach waren die höchsten Mittelwerte in der Kontrollgruppe ($MW_{\text{Kontrolle}}$: 76,5%) zu beobachten. Die Testgruppen T2, T3 und T4 hatten mit Mittelwerten von (MW_{T1} : 64,6 %; MW_{T3} : 69,0% und MW_{T4} : 66,5 %) eine vergleichbare Knochenfraktion. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte für die Knochenfraktion keine Signifikanz ($p= 0,469$).

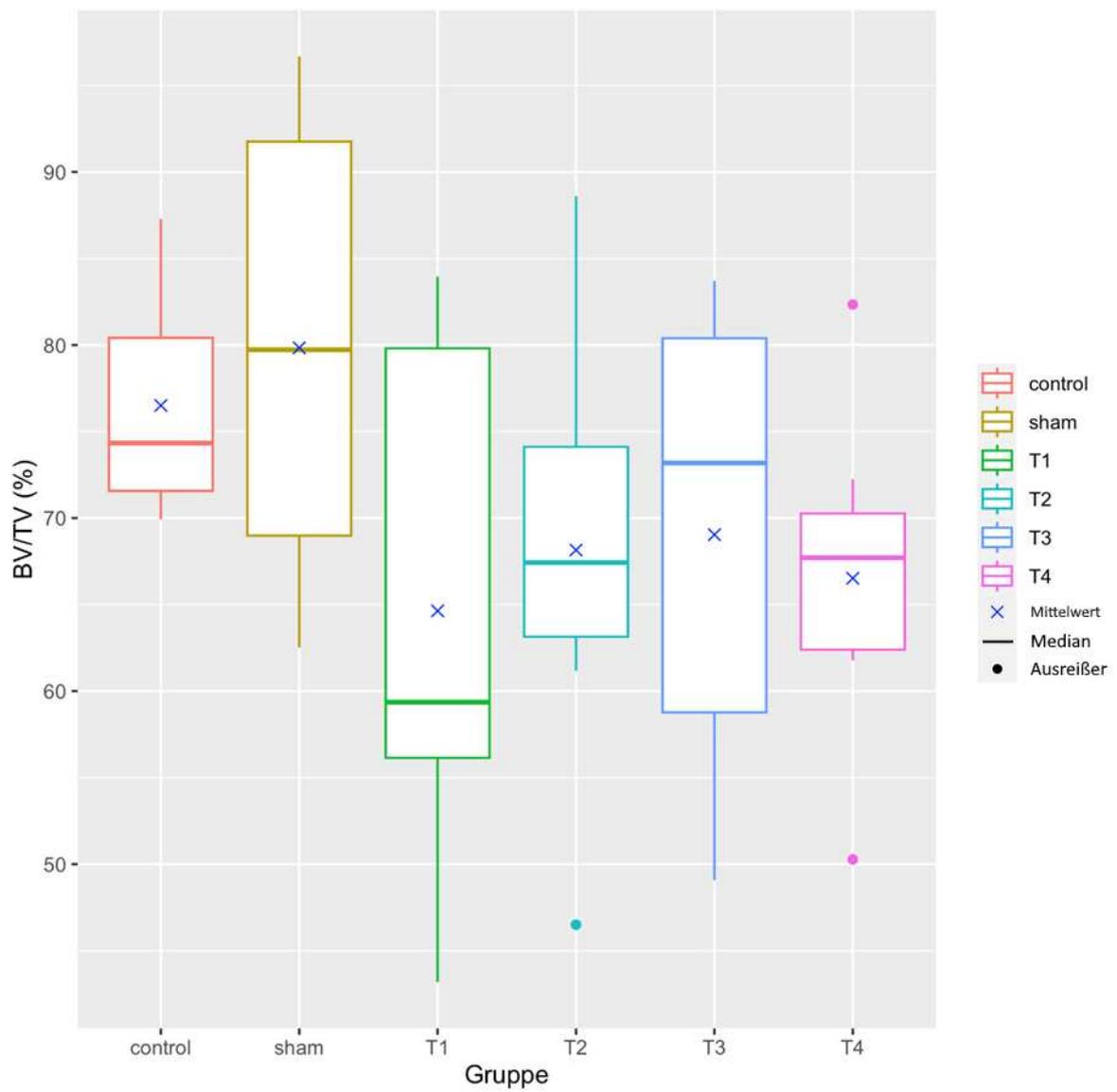


Abbildung 27: Ergebnisse der Messung der Knochenfraktion (BV/TV) im VOI

Quelle: Eigene Darstellung

VOX-BV/TV					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	76,5	74,3	69,9	87,3	
Sham	79,8	79,7	62,5	96,7	
T1	64,6	59,4	43,2	84,0	
T2	68,2	67,4	46,5	88,6	
T3	69,0	73,2	49,1	83,7	
T4	66,5	67,7	50,3	82,3	

Tabelle 7: Ergebnisse der Messung der Knochenfraktion (in %)

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.3 Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb. Th.)

Die durchschnittliche Trabekeldicke wurde in Tabelle 8 zusammengefasst. Besonders auffällig sind die Werte der Sham-Gruppe mit Werten von 0,30 mm ($\text{Min}_{\text{sham}}: 0,30 \text{ mm}$) bis 0,74 mm ($\text{Max}_{\text{sham}}: 0,74 \text{ mm}$). Darauf folgen die Testgruppen sowie die Kontrollgruppe mit sehr homogenen Mittelwerten von 0,39 mm ($\text{MW}_{\text{Kontrolle}}: 0,39 \text{ mm}$) bis 0,42 mm ($\text{MW}_{\text{T3}}: 0,42 \text{ mm}$). Der Kruskal-Wallis-Test war mit einem Wert von $p= 0,472$ nicht signifikant.

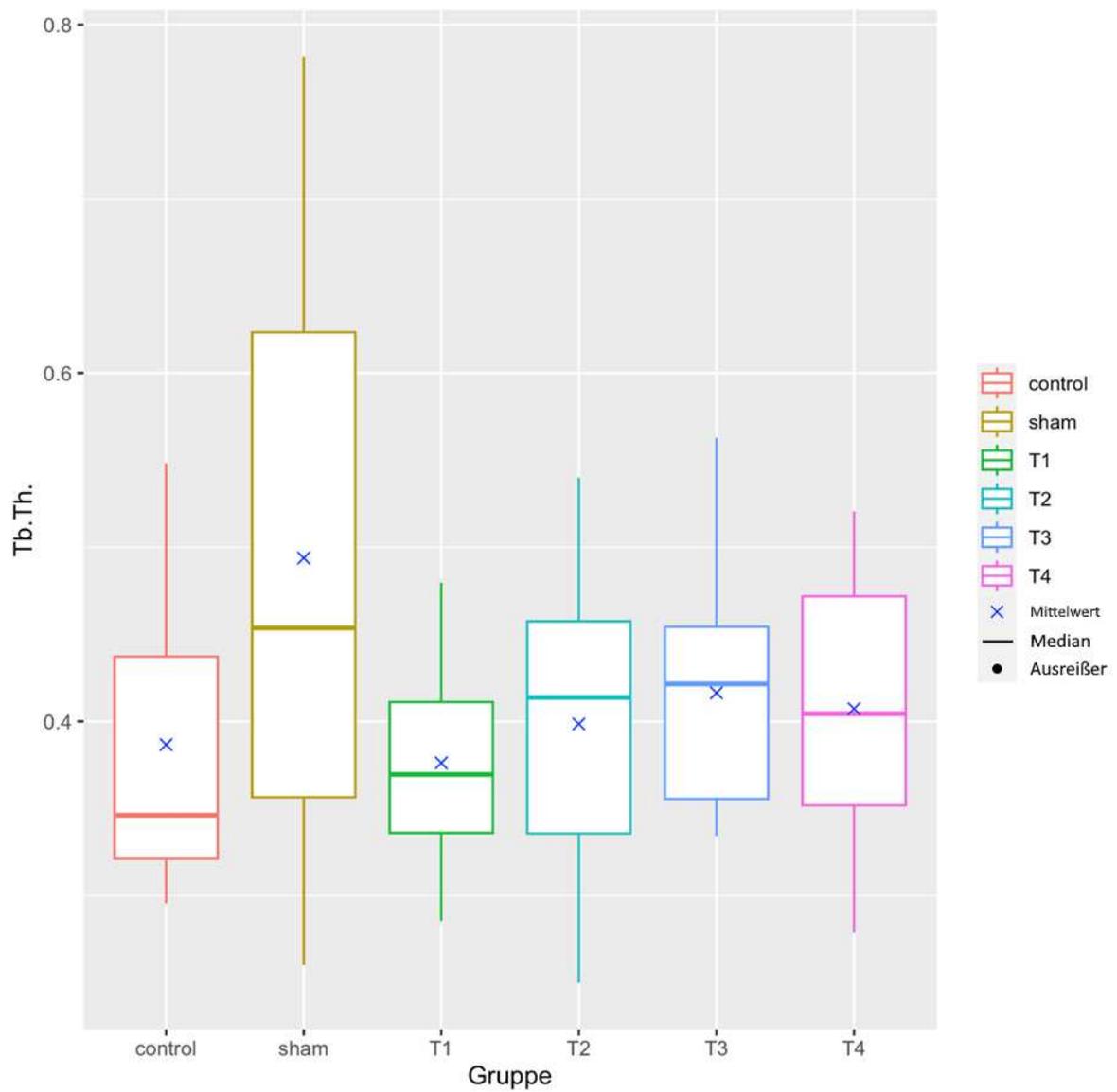


Abbildung 28: Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th. in mm)

Quelle: Eigene Darstellung

Trabekeldicke (mm)					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	0,39	0,35	0,30	0,55	
Sham	0,46	0,38	0,30	0,74	
T1	0,38	0,37	0,29	0,48	
T2	0,40	0,41	0,25	0,54	
T3	0,42	0,42	0,33	0,56	
T4	0,41	0,41	0,28	0,52	

Tabelle 8: Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb. Th. in mm)

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.4 Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand (Tb. Sp.)

Zuletzt wurde der durchschnittliche intertrabekuläre Abstand in mm gemessen und in Tabelle 9 zusammengefasst. Besonders auffällig ist hier die Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 0,21 mm ($MW_{\text{Kontrolle}}: 0,21$ mm). Größere durchschnittliche intertrabekuläre Abstände waren in den Testgruppen mit Mittelwerten von 0,35 mm ($MW_{\text{T2}}: 0,35$ mm) bis 0,41 mm ($MW_{\text{T1}}: 0,41$ mm; $MW_{\text{T4}}: 0,41$ mm) zu beobachten. Es lag keine breite Streuung innerhalb der Testgruppen vor. Besonders überraschend hat sich hier erneut die Sham-Gruppe verhalten. Der Mittelwert zeigt hier mit einem Wert von 0,29 mm ($MW_{\text{sham}}: 0,29$ mm) eine Annäherung zu der Kontrollgruppe. Der Kruskal-Wallis-Test war mit einem Wert von $p=0,472$ nicht signifikant.

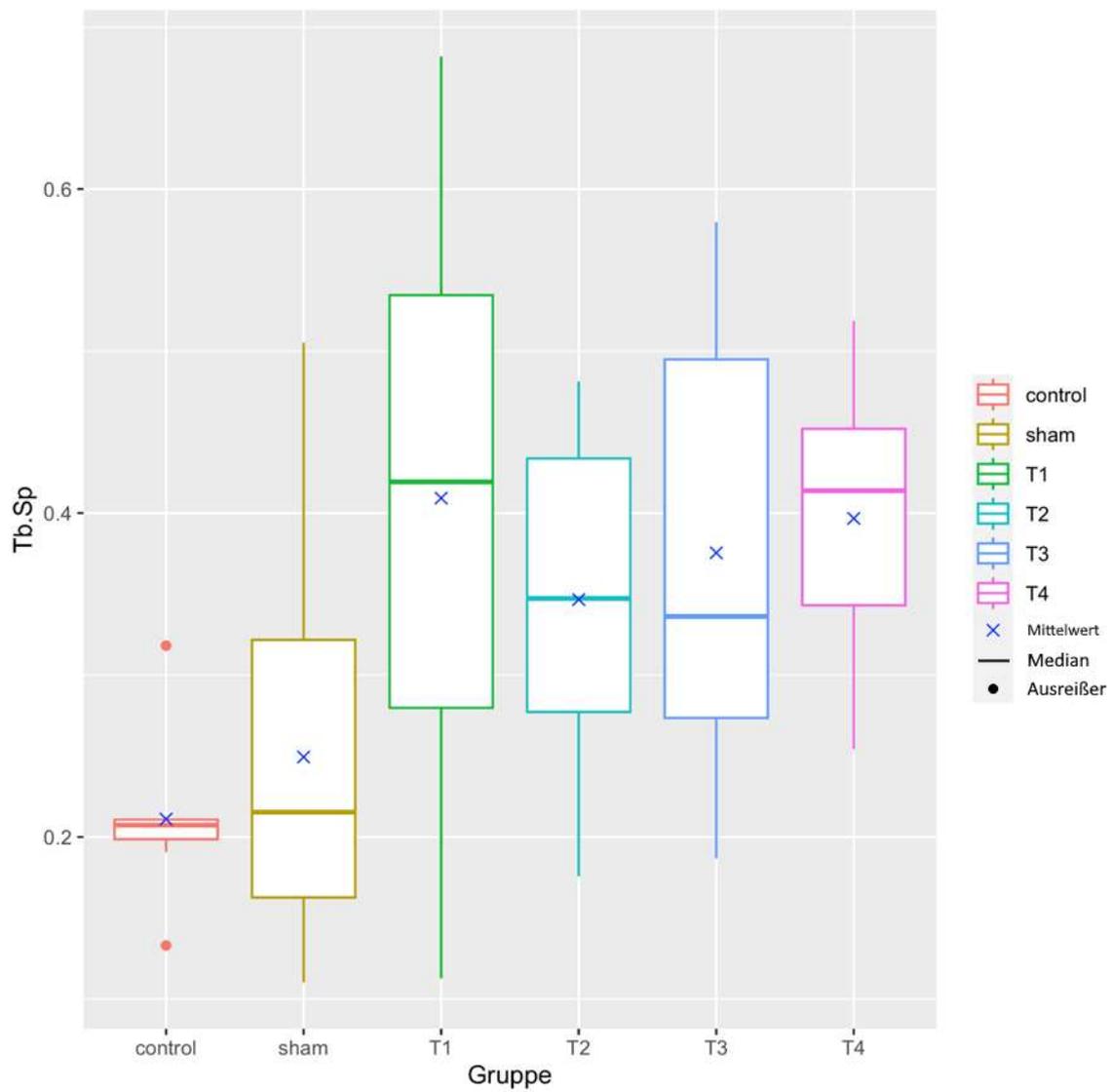


Abbildung 29: Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand (Tb.Sp. in mm)

Quelle: Eigene Darstellung

Intertrabekulärer Abstand					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	0,21	0,21	0,13	0,32	
Shamgruppe	0,29	0,32	0,11	0,51	
T1	0,41	0,42	0,11	0,68	
T2	0,35	0,35	0,18	0,48	
T3	0,38	0,34	0,19	0,58	
T4	0,41	0,42	0,25	0,52	

Tabelle 9: Durchschnittlicher intertrabekulärer Abstand (Tb. Sp. in mm)

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.5 Spezifische Knochenoberfläche (BS/BV)

Die spezifische Knochenoberfläche zeigt in der Kontrollgruppe ($MW_{\text{Kontrolle}}: 6,70 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$) und in den Testgruppen T1-T4 sehr ähnliche Mittelwerte ($MW_{\text{T3}}: 6,20 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ – $MW_{\text{T1}}: 6,63 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$). Die Negativkontrolle ist mit einem Mittelwert von $5,38 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ etwas maturierter ($MW_{\text{sham}}: 5,38 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$). Der Kruskal Wallis Test zeigt keine Signifikanz ($p= 0,472$).

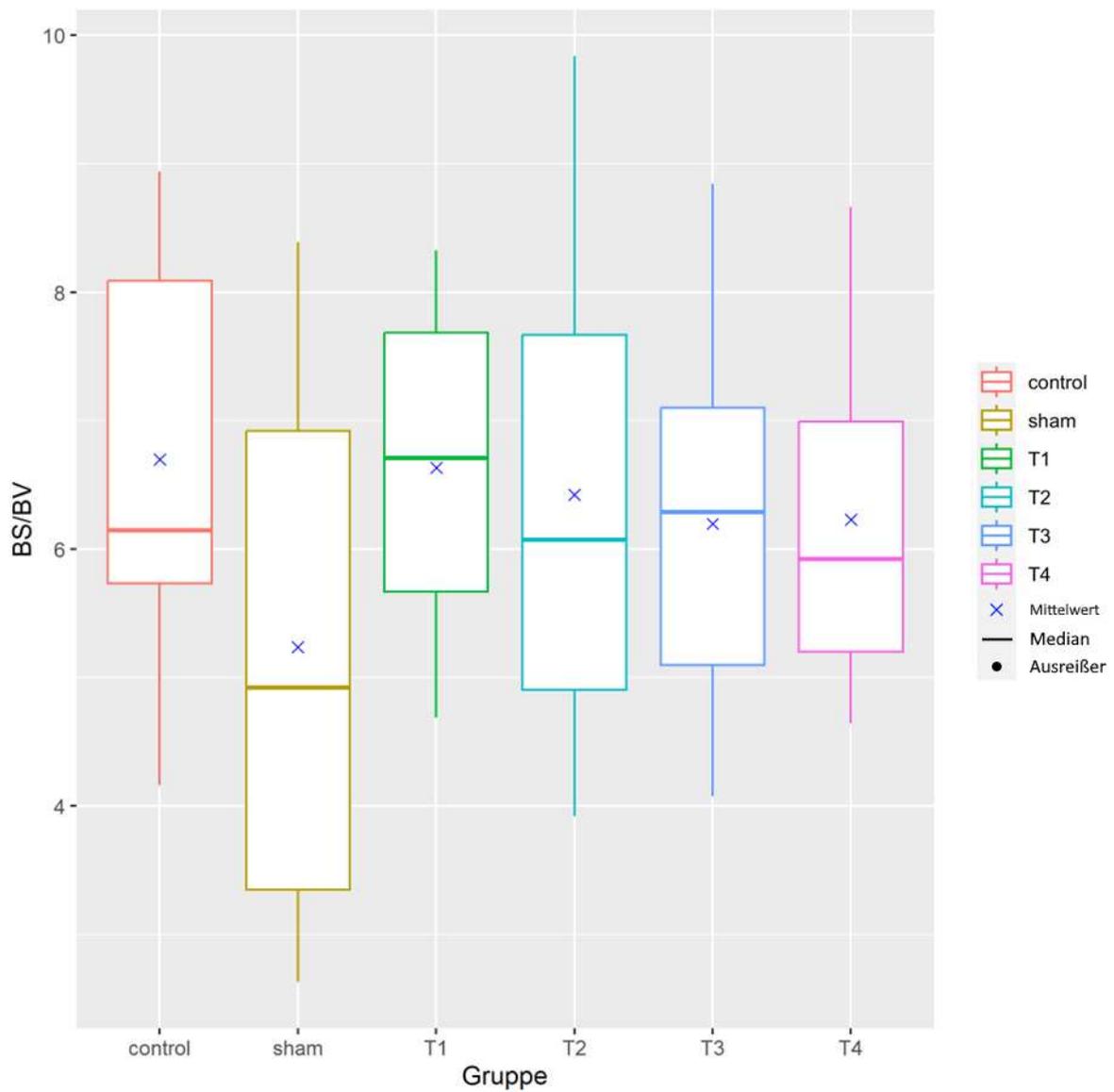


Abbildung 30: Spezifische Knochenoberfläche (mm^2/mm^3)

Quelle: Eigene Darstellung

TRI-BS/BV					
Gruppe	Mittelwert	Median	Min	Max	Ausreißer
Kontrolle	6,70	6,14	4,16	8,94	
Shamgruppe	5,38	5,98	2,63	8,30	
T1	6,63	6,71	4,69	8,32	
T2	6,42	6,07	3,92	9,84	
T3	6,20	6,29	4,07	8,84	
T4	6,28	5,94	4,64	8,66	

Tabelle 10: Spezifische Knochenoberfläche (mm²/mm³)

Quelle: Eigene Darstellung

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine volumetrische mikrocomputertomographische Analyse der Heilungsmuster von Extraktionsalveolen nach Zugabe verschiedener Knochenersatzmaterialien vorgenommen. Im Fokus stand vor allem ein synthetisches injizierbares Knochenersatzmaterial in verschiedenen Zubereitungsformen (Hinzugabe von Blut, Speichel oder Kochsalzlösung) in Gegenüberstellung zu einem bewährtem xenogenen Knochenersatzmaterial. Überdies sollte die Fragestellung, ob synthetische Knochenersatzmaterialien als ebenbürtige Alternative zu etablierten xenogenen Knochenersatzmaterialien mithalten können, beantwortet werden. Weiterhin sollte die Methodik der morphometrischen Analyse von Mikrocomputertomographie-Bildern kritisch betrachtet werden.

Ob alloplastischer Knochenersatz in der Zahnmedizin angemessen ist, wurde bereits in mehreren früheren Studien dargelegt (Bae, 2010). In deren Untersuchungsfokus standen etwa die entstandenen HLA Antikörper und mögliche Fremdkörperreaktionen oder histologische Untersuchungsansätze, welche lediglich auf zwei Dimensionen limitiert waren. Das strukturelle Verhalten alloplastischer Materialien im Zusammenhang mit dem Aufbau vertikaler Kieferdefekte wurde bislang eher selten in Studien publiziert. Da die Einheilung von Knochenersatzmaterial in den Knochen jedoch ein dreidimensionaler Prozess ist, konzentriert sich die vorliegende Studie auf die Knochenmikrostruktur untersucht an Mikro-CT-Aufnahmen (Becker et al., 2017).

4.1 Diskussion der Methodik mittels Mikro-CT

Insgesamt wurden für diese Arbeit 46 Datensätze zur Verfügung gestellt. Die zugrundeliegende Vorgehensweise zur Auswertung dieser Datensätze erfolgte in vier grundsätzlichen Arbeitsschritten: Zunächst wurden die Scans entlang der Zahnachse (z-Achse) ausgerichtet (1), daraufhin ein passendes VOI definiert (2) und abschließend die Segmentierung durchgeführt (3). Zuletzt wurde die Methodik durch die morphometrischen Analysen sowie linearen Messungen finalisiert (4). Diese Schritte wurden mit dem zum vivaCT80 gehörenden „uCT Evaluation Software Program V6.5“ realisiert.

Die Regionen wurden 12 Wochen vor Tötung der Tiere und Anfertigung der Scans mit den zu untersuchenden Materialien augmentiert. In die Extraktionsalveole der ersten Testgruppe

wurde das zu untersuchende Nano-Knochenfüllmaterial in Kombination mit 350 μ L autologem Blut injiziert. Bei der Testgruppe 2 wurde zusätzlich zu dem gleichen Nano-Knochenersatzmaterial eigener Speichel hinzugegeben. Testgruppe 3 beinhaltete lediglich das Nano-Knochenersatzmaterial ohne Zusätze und für die Testgruppe 4 wurde das Nano-Knochenersatzmaterial in einer höheren Konzentration zusammen mit Speichel injiziert. Die Kontrollgruppe wurde mit einem xenogenen Knochenersatzmaterial (BioOss®) versorgt und zuletzt eine Alveole im Sinne einer Negativkontrolle leer belassen (N) Sham-Operation. Anschließend wurden sowohl volumetrische als auch lineare Messungen für die Analyse der Knochenmikrostruktur sowie zur Knochenhöhenbestimmung und Dicke der Kortikalis vorgenommen. Mithilfe des der μ CT Evaluation Software (Scanco Medical AG) wurde die Zahnachse (entlang der mesialen Wurzel) bestimmt, wodurch im weiteren Schritt die Ausrichtung der Datensätze entlang dieser Achse erfolgen konnte. Bei allen 46 Proben konnten die Referenzpunkte bestimmt werden und die Ausrichtung gelang nahezu ohne Komplikationen. Lediglich in 3 von 46 Datensätzen wurden die benötigten Koordinaten nicht auf Anhieb gefunden. Durch Wiederholung und anschließende visuelle Überprüfung der ausgerichteten Datensätze konnte jedoch die gewünschte Ausrichtung erreicht werden. Obwohl die genutzten Zahnwurzeln leicht unterschiedliche Krümmungen aufwiesen, war die Ausrichtung der Proben vergleichbar. Es blieben dennoch drei Ausreißer, die bei den linearen Messungen sowie der Fragestellung Granulat außerhalb Knochen ausgeschlossen wurden.

Ein für die Knochenmikrostrukturauswertung entscheidender Prozess war die passende Definition sowie Positionierung des Volumen of Interest (VOI). Die Definition erfolgte durch ein einheitliches Rechteck mit den Maßen Breite x Tiefe 200x100 (Pixel), das auf die bukkalste Knochenkante der mesialen Wurzel positioniert wurde und anschließend automatisch auf die restlichen Schnitte übertragen wurde. Somit unterschieden sich die ROIs nur durch ihre Höhe, nicht jedoch auch in der bukko-lingualen Dimension. Im Rahmen einer visuellen Nachkontrolle mussten die ROIs bei einigen Datensätzen in bukko-lingualer Richtung adaptiert werden. Als Limitierung ist jedoch festzuhalten, dass durch die standardisierte ROI-Größe nicht das gesamte augmentierte Volumen analysiert werden konnte, der Vorteil der Methode hingegen war die vergleichbare ROI-Ausdehnung.

Der letzte Schritt der Bildbearbeitung (Image Processing) stellte die Segmentierung der Proben dar, welcher als kritischer Schritt für die morphometrische Analyse gilt (Bouxsein et al., 2010). Um eine möglichst genaue Auswertung der Scans zu ermöglichen, wurde in unserer Studie ein einheitlicher, globaler Schwellwert von 220 bestimmt. So konnten durch den einheitlichen Wert nicht nur eine gute Vergleichbarkeit innerhalb der Proben bewerkstelligt werden, auch ist lediglich die Einstellung eines einzelnen Parameters notwendig, um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Scans zu ermöglichen. Ein geeigneter Schwellwert wurde aus den erzeugten Histogrammen abgeleitet. An dieser Stelle ist zu beachten, dass bereits leichte Änderungen des Schwellwerts einen relevanten Einfluss auf die Parameter Tb.Th und der Tb.N haben können. Würden unterschiedliche Schwellwerte in den verschiedenen Proben verwendet werden, hätte dies zur Folge, dass die Knochendicke und die Größe der Markräume bei identischen Konfigurationen unterschiedlich beurteilt würden. Ebenfalls würde sich die Knochenfraktion entsprechend ändern (Ruegsegger, 1995).

Dennoch ist festzuhalten, dass in den einzelnen Gruppen unterschiedlich aufbereitete sowie verschiedene KEM (injizierbare kollagenbasierte KEM und ein xenogenes KEM) eingesetzt worden sind. Gerade neugebildeter Knochen zeigte zudem eine sehr geringe Materialdichte. In der vorliegenden Studie wurde davon ausgegangen, dass nach einer Heilungsdauer von 12 Wochen eine hinreichende Mineralisierung vorhanden war, der globale Schwellwert als vorteilhaft beachtet wurde (Müller et al., 1998; Bouxsein et al., 2010; Salem et al., 2010).

Der absolute Grauwert von 220 stellte eine ausreichende Einstellung dar, um mineralisierte Bereiche von nicht-mineralisierten abzugrenzen. Durch visuelle Kontrolle der einzelnen Proben konnten zudem keine artifiziellen Fremdkörper im Sinne von Artefakten identifiziert werden, welche zu Abweichungen der Ergebnisse führen könnten (Schouten et al., 2009).

Im Hinblick auf eine umfassende und genaue Auswertung war es notwendig, ausreichend morphometrische Parameter zu bestimmen und vor allem aufgrund der komplexen Zusammenstellung der Knochenmikrostruktur die richtigen Parameter auszuwählen. Gemäß den Vorgaben der ASBMR (Bouxsein et al., 2010) wählte die vorliegende Studie die Indizes BV/TV, Tb. Sp und Tb. Th aus. Eine richtige Auswahl der Scanauflösung ist für eine scharfe Abbildung der Mikrostrukturen unabdinglich (Christiansen, 2016). Durch Auswahl möglichst vieler morphologischer Parameter konnte eine optimale Analyse der trabekulären Mikroarchitektur bewerkstelligt werden. Die gewählten Parameter ließen sich durch

automatisierte Algorithmen errechnen. Für die Berechnung der Knochenfraktion (BV/TV), diente die Voxelzählung und mithilfe der *Distance-Transformation*-Methode konnte die trabekuläre Dicke, die trabekuläre Separation und zuletzt die Trabekelzahl kalkuliert werden (Scanco Medical AG, 2014a; Hildebrand et al., 1999). Die gewählte Voxelgröße von 15 μm war angemessen, dies konnten die sehr hochauflösenden, gut erkennbaren Trabekelstrukturen belegen. Ähnliche oder leicht höhere Auflösungen wurden bereits in anderen Studien am Hundemodell angewendet und haben zu aussagekräftigen Ergebnissen geführt (Fang et al., 2014; Becker et al., 2017).

Die hier aufgeführte Methode zur Ermittlung von Ergebnissen bezüglich Knochenmikrostruktur bietet in vielerlei Hinsicht Vorteile gegenüber der Histomorphometrie, da eine nicht-destruktive 3D-Auswertung möglich war. Als Limitation ist jedoch anzumerken, dass die histologischen Schnitte nicht in den 3D-Datensatz gematcht worden sind, um zu überprüfen, ob bei dem gewählten Schwellwert tatsächlich auch neugebildeter Knochen korrekt als solcher segmentiert wurde. Sofern sich die Maturation der Heilung zwischen den Proben unterschied, wäre dies zukünftig noch ein interessanter Ansatzpunkt, um die Auswertungsmethode weiter zu verbessern. Darüber hinaus wurde nicht das gesamte augmentierte Volumen vermessen, um in bucco-lingualer Dimension eine vergleichbare VOI-Größe zu erzielen. Retrospektiv wäre es interessant gewesen, ein entsprechendes VOI ebenfalls zu erzeugen und die morphometrischen Parameter der beiden Methoden zu vergleichen.

4.2 Einfluss des Augmentationsmaterials auf die Knochenmikrostruktur der Defektbereiche

Es wurden zwischen den Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Strukturindizes Trabekeldicke (Tb.Th), intertrabekulärer Trabekelabstand (Tb.Sp), Knochenfraktion (BV/TV), spezifische Knochenoberfläche (BS/BV) und Defektgröße festgestellt. Auch sind durch die linearen Messungen wie die Knochenhöhe und die kortikale Dicke keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen festgestellt worden.

Die Knochenhöhe wurde in dem Bereich der Extraktionsalveole gemessen, in der das Augmentat eingebracht wurde. So sollte die Messung in diesem Bereich Rückschlüsse auf die Knochenwundheilung geben. Die Studienergebnisse deuteten darauf hin, dass die

Knochenhöhe in der Kontroll- sowie der Testgruppe T1 höher ausfiel im Vergleich zu den anderen Gruppen. Diese Beobachtung haben auch Rothamel et. al gemacht, so führte auch in deren Studie die Anwendung des nanokristallinen Hydroxylapatits (NHA) interessanterweise nicht zu einer Verringerung der Knochenhöhe (Rothamel et al., 2008). Ursachen hierfür könnten auf zellulärer Ebene liegen. So wurden kleine Teile der Kollagenfüller aktiv von mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen, aber auch von Knochengewebe umschlossen, was zu einem Erhalt der vertikalen Dimension führen konnte (Rothamel et al., 2008). Danach folgten die Testgruppen T3 und T4 mit niedrigeren Knochenhöhen als die Kontrolle und die Gruppe T1. Die negative Kontrollgruppe (Sham) zeigte eine niedrige Knochenhöhe mit insgesamt horizontalem Knochenverlust, wodurch die Knochenfraktion wiederum erhöht war. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen hinsichtlich der Höhe der Wundheilung und der spezifischen Knochenoberfläche überein. Im Hinblick auf die Knochenremodellierung ist besonders hervorzuheben, dass für die Testgruppe T1 die Höhe des Bereichs mit Wundheilung am ausgeprägtesten war, gefolgt von der Testgruppe T3, während in der negativen Kontrollgruppe (Sham) die geringste Knochenremodellierung beobachtet wurde.

Die kortikale Dicke, welche auf 50% der Knochenhöhe gemessen wurde, war in allen Gruppen vergleichbar, wobei jedoch die höchsten medianen Werte in Gruppe T1 zu verzeichnen waren. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen waren jedoch nicht signifikant. Ähnliche Kortikalisdicken könnten auf eine ähnliche Geschwindigkeit der Knochenneubildung zwischen synthetischen und xenogenen KEM zurückzuführen sein (Zhao et al., 2021).

In der vorliegenden Studie wurde als zusätzliche lineare Metrik die Verteilung des Augmentationsgranulats innerhalb des Eingriffsgebiets analysiert. In der Testgruppe T3 und der Kontrollgruppe waren am häufigsten Granulate außerhalb des Knochens lokalisiert. Im Gegensatz dazu wurden in den Gruppen T1 und T4 die geringsten Granulatpartikel außerhalb des Knochens beobachtet.

Weiterhin zeigte sich, dass das größte Volumen des nicht-mineralisierten Defekts in der Gruppe T4 zu finden war, dicht gefolgt von der Gruppe T1. Die Gruppe T3 wies interessanterweise eine geringe Variabilität auf. Diese Beobachtung deckt sich mit der erhöhten Knochenremodellierung in der Testgruppe T3.

Für die Knochenfraktion ließ sich ein hoher Medianwert für die Sham-Gruppe beobachten. Der höchste Mittelwert war in der Kontrollgruppe ersichtlich, dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Knochenhöhen insgesamt in der Sham-Gruppe niedriger waren, es also insgesamt einen horizontalen Knochenverlust in der Sham-Gruppe gab.

Als weiteren Parameter zur Messung der Knochenreife wurde die durchschnittliche Dicke der Knochen trabekel hinzugenommen. Dahingehend konnten ebenfalls vergleichbare Trabekeldicken im Mittelwert verzeichnet werden. Diese waren tendenziell in der negativen Kontrollgruppe (Sham) erhöht, was andeuten könnte, dass die Knochenersatzmaterialien die Wundheilung verzögerten. Der höchste mediane Wert für die Knochenfraktion war zudem bei der negativen Kontrollgruppe (Sham) zu beobachten, gefolgt von der positiven Kontrollgruppe (BioOss®). Interessanterweise lagen insbesondere in den Gruppen T1, T2 und T4 die medianen Werte niedriger. Dies deutet ebenfalls an, dass die injizierten Kollagene tendenziell eher zu einer Verzögerung der Knochenheilung geführt haben könnten. Die knochenpreservierende Wirkung von BioOss® ist hingegen in der Literatur vielfältig dokumentiert (Zitzmann et al., 2001; Araujo & Lindhe, 2009).

Der intertrabekuläre Abstand war in den Testgruppen größer, was bedeutet, dass größere Markräume zu erkennen waren. Innerhalb der Testgruppen waren keine merklichen Unterschiede zu verzeichnen, was auf eine vergleichbare, eher verzögerte Wundheilung durch den Kollagenfüller schließen lässt. Die Kontrollgruppe zeigte die geringsten intertrabekulären Abstände, dicht gefolgt von der negativen Kontrolle, was eine stärkere knöcherne Integration der Defekte in diesen Gruppen impliziert. Die beobachtete Näherung der Werte zwischen der Sham- und Kontrollgruppe sowie die generell niedrigeren Werte in diesen beiden Gruppen deuten auf eine reduzierte Präsenz nicht mineralisierter Markräume hin, was auf eine effektivere Knochenheilung in diesen Gruppen hindeutet. Auch diese Metrik bestärkt die Beobachtung, dass die injizierbaren Knochenersatzpräparate eher zu einer Verzögerung der Wundheilung beigetragen haben.

Interessanterweise zeigte auch die spezifische Knochenoberfläche, die Rückschlüsse auf die Maturation des Knochens gibt, tendenziell niedrigere Werte für die negative Kontrollgruppe. Dies bedeutet, dass hier weniger Knochenoberfläche je Volumen vorhanden war, was für einen maturierteren Knochen spricht. Die positive Kontrollgruppe, aber auch die Testgruppen T1-T4, in denen injizierbare Kollagene eingearbeitet wurden, zeigten hingegen vergleichbare und gegenüber der Sham-Gruppe erhöhte Mediane. Auch diese Metrik deutet

somit an, dass in den Testgruppen eher zu einer Verzögerung der Wundheilung erfolgt ist. Ähnliche Beobachtungen wurden in der Literatur auch für kreuzverlinkte Kollagenmembranen beobachtet. Hier kam es im Rattenmodell zu einer Verzögerung der Biodegradation, einer reduzierten Integration und Vaskularisation sowie zu Fremdkörperreaktionen (Rothamel et al., 2005).

Aus den obig erläuterten Metriken ist besonders hervorzuheben, dass die Knochendichten in der Sham- sowie in der Kontrollgruppe erhöht waren. Es war insgesamt wenig neugebildeter Knochen in den Testgruppen T1-T4 nachweisbar. Mögliche Ursachen für eine niedrige Knochendichte in den Testgruppen T1-T4 könnte theoretisch auch sein, dass sich der Knochen nicht mehr in der Wundheilungsphase befand und bereits maturierter war. Auf eine fortgeschrittene Wundheilung würden jedoch auch dickere Trabekel hinweisen, welche hier jedoch nicht vorzufinden waren. Die Trabekel waren sowohl in der Kontroll-, als auch in den Testgruppen T1-T4 dünner. Die Markräume waren in den Testgruppen T1-T4 ebenfalls vergrößert. Diese Beobachtung ließ sich aus den intertrabekulären Abständen ableiten, was insgesamt auf eine verzögerte Wundheilung schließen lässt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Rothamel et. al (2008) zu sehen. So konnten Rothamel et. al zeigen, dass der Einsatz von injizierbaren Kollagenen die Wundheilung des Knochens potenziell verzögern kann. Die Analysen zeigten Resorptionsvorgänge der alveolären Wand sowie eine unvorhersehbare Materialresorption. Die in unserer Studie vergrößerten Markräume, insbesondere in den Testgruppen T1-T4 könnten auf eine solche Resorption hinweisen.

Der injizierbare Kollagenfüller könnten möglicherweise durch besondere Inhaltsstoffe wie Bindemittel die Wundheilung innerhalb der Knochenstrukturen behindern, welche in der Produktdeklaration aufgeführt sind (Geistlich Pharma AG, 2022).

Weitere experimentelle Daten von Laschke et al. legten nahe, dass NHA die Bedingungen für die Knochenneubildung optimieren kann, indem das NHA es eine geführte Vaskularisation während der Biodegradation unterstützte (Laschke, 2007). Diese Beobachtung muss weiterhin kritisch überprüft werden, da die Untersuchungen extraoral von Goldhamster durchgeführt wurden und somit nicht die realen Bedingungen in der Mundhöhle widerspiegeln (Laschke, 2007).

4.3 Limitationen

Verschiedene Limitationen waren mit der Durchführung der Studie verbunden. So war mit initial 46 Stichproben von nur 9 Tieren, welche sich auf sechs Untergruppen aufteilten, ein möglicherweise zu geringer Probenumfang vorhanden. Die statistische Auswertung ist demnach möglicherweise von Ausreißern beeinflusst. Vor allem in den Subgruppen C und N lagen mit $n=7$ (Kontrollgruppe) und $n=6$ (Shamgruppe) die wenigsten Proben vor. T1, T2 und T4 hatten $n=8$ und T3=9 Datensätze. In Gegenüberstellung zur Validität liegt im Sinne des von der DFG der ethische Grundgedanke möglichst wenige Tiere zu opfern. Dies wurde durch das 3R-Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement) der DFG wurde der Zusammenhang von Tierschutzmaßnahmen in der Forschung beleuchtet.

Auch die Probeanzahlen der Studiengruppen ist kritisch zu betrachten. Bei einem kleinen n zwischen 3 bis 5 Proben pro Gruppe ist es schwer, die Ergebnisse zu vergleichen. Ferner war ein statistischer Vergleich der Gruppen untereinander aufgrund der geringen Probenzahl nicht möglich, weshalb nur eine deskriptive Analyse durchgeführt werden konnte.

Zusätzlich sind vor allem die Aufnahmebedingungen und die Segmentationsmethode wesentliche Faktoren, welche sich stark auf die Ergebnisse auswirken. In erster Linie kann es zu einer Einschränkung der Vergleichbarkeit der Mikro-CT- basierten Datensätze kommen. So können die Scanauflösung und auch das Schwellwertlevel die morphometrischen Ergebnisse erheblich beeinflussen. Die Bandbreite an verschiedenen Analysesoftwaren können die Vergleichbarkeit der Scans ebenso negativ beeinflussen (Bouxein et al., 2010).

Zu beachten ist auch, dass die vorliegende Arbeit nur Mikro-CT Datensätze auswertete, während in der Histologie auch Analysen auf Zell-Ebene möglich sind. Somit liefen Mikrocomputertomographie und Histologie unterschiedliche und komplementäre Informationen, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht diskutiert werden können.

Durch das Fehlen der Information über die initiale Wurzellänge beziehungsweise der Defekthöhe innerhalb aller Testgruppen, sowie in den Kontrollgruppen war nur eine einheitliche Auswertung möglich, während die initiale Defektausdehnung nicht berücksichtigt werden konnte. Hierzu wäre zu Beginn der Studie ein postoperatives 3D-Röntgenbild sinnvoll gewesen, wodurch eine Vermessung des hätte Knochenverlusts stattfinden können. Alternativ hätte intraoperativ ein Marker platziert werden können.

4.4 Fazit

Nach ausführlicher Erörterung der Methodik und Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Forschung und Literatur und unter Berücksichtigung der Limitationen lässt sich zusammenfassen, dass die Integrität der bukkalen und lingualen Kompakta nach Einsetzen des injizierbaren Knochenersatzmaterials insgesamt erhalten blieb.

Die Analyse des Knochenersatzmaterials durch Mikrocomputertomographie erwies sich insgesamt als geeignet, zukünftig sollte jedoch das initiale Defektausmaß intraoperativ markiert werden, um diese Metrik in die Auswertung einbeziehen zu können.

In der vorliegenden Studie deuteten die erhobenen Parameter an, dass die injizierbaren KEM zu einer Verzögerung der Wundheilung geführt haben könnten (dünnere Trabekel (Tb. Th), größere Markräume (Tb. Sp) und größere spezifische Knochenoberfläche (BS/BV). Besonders in der Testgruppe T3 kam es zu Exfoliationen im Bereich der residuellen Wurzel. Zu beachten ist, dass weitere Studien nötig sind, um insbesondere die Rolle der Inhaltsstoffe und Bindemittel und deren Einfluss auf die Wundheilung zu eruieren, da auch diese den verzögernden Effekt begründen könnten.

Literaturverzeichnis

- Araújo, M., Linder, E. & Lindhe, J. (2009). Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: An experimental study in dog. *Clinical Oral Implants Research*, 20(1), 1-6.
- Araújo, M. G. & Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction: An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(2), 212-218.
- Araújo, M. G. & Lindhe, J. (2009). Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 20(5), 433-440.
- Artzi, Z., Kozlovsky, A., Nemcovsky, C. E. & Weinreb, M. (2005). The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(2), 193-199.
- Atwood, D. A. (1971). Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges. Harvard School of Dental Medicine, Boston, Mass.
- Bae, J. H., Kim, Y., Kim, S. G., Yun, P. Y. & Kim, J. S. (2010). Sinus bone graft using new alloplastic bone graft material (Osteon)-II: Clinical evaluation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 109(3), e14-20.
- Becker, K., Jandik, K., Stauber, M., Mihatovic, I., Drescher, D. & Schwarz, F. (2019). Microstructural volumetric analysis of lateral ridge augmentation using differently conditioned tooth roots. *Clinical Oral Investigations*, 23(7), 3063-3071.
- Becker, K., Klitzsch, I., Stauber, M. & Schwarz, F. (2017). Three-dimensional assessment of crestal bone levels at titanium implants with different abutment microstructures and insertion depths using micro-computed tomography. *Clinical Oral Implants Research*, 28(6), 671-676.
- Becker, K., Stauber, M., Schwarz, F. & Beissbarth, T. (2015). Automated 3D-2D registration of X-ray microcomputed tomography with histological sections for dental implants in bone using chamfer matching and simulated annealing. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 44, 62-68.
- Bernhardt, R., Scharnweber, D., Müller, B., Thurner, P., Schliephake, H., Wyss, P., Beckmann, F., Goebbels, J. & Worch, H. (2004). Comparison of microfocus- and

- synchrotron X-ray tomography for the analysis of osteointegration around Ti6Al4V implants. *European Cells & Materials*, 7, 42-51.
- Bhatt, R. A. & Rozental, T. D. (2012). Bone graft substitutes. *Hand Clinics*, 28(4), 457-468.
- Borgefors, G. (1986). Distance transformations in digital images. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 34(3), 344–371.
- Bouxsein, M. L., Christiansen, B. A., Guldborg, R. E., Jepsen, K. J. & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), 1468-1486.
- Branemark, P. I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 50(3), 399-410.
- Buser, D., Mericske-Stern, R., Bernard, J.-P., Behneke, A., Behneke, N., Hirt, H. P., Belser, U. C. & Lang, N. P. (1997). Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. *Clinical Oral Implants Research*, 8, 161-172.
- Cardaropoli, G. & Lindhe, J. (2003). Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites: An experimental study in dogs.
- Cawood, H. R. (1988). A classification of the edentulous jaws.
- Cheung, L. K., Hariri, F. & Chua, H. D. (2011). Alveolar distraction osteogenesis for oral rehabilitation in reconstructed jaws. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 19(4), 312-316.
- Christiansen, B. A. (2016). Effect of micro-computed tomography voxel size and segmentation method on trabecular bone microstructure measures in mice. *Bone Reports*, 5, 136-140.
- Danielsson, P. E. (1980). Euclidean distance mapping. *Computer Graphics and Image Processing*, 14(3), 227-248.
- Daubert, T. E., Weinstein, B. F., Bordin, S., Leroux, B. G. & Flemming, T. F. (2015). Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: A cross-sectional analysis. *Journal of Periodontology*, 86(3), 337-347.
- Dias, D. R., Leles, C. R., Batista, A. C., Lindh, C. & Ribeiro-Rotta, R. F. (2015). Agreement between Histomorphometry and Microcomputed Tomography to Assess Bone

- Microarchitecture of Dental Implant Sites. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 17(4), 732-741.
- Donath, K. & Büsing, C. M. (1982). A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues: The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology*, 11(4), 318-326.
- Du Plessis, A., Broeckhoven, C., Guelpa, A. & le Roux, S. G. (2017). Laboratory x-ray micro-computed tomography: A user guideline for biological samples. *Gigascience*, 6(6), 1-11.
- Fang, L., Ding, X., Wang, H. M. & Zhu, X. H. (2014). Chronological changes in the microstructure of bone during peri-implant healing: A microcomputed tomographic evaluation. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 52(9), 816-821.
- Feldkamp, L. A., Parfitt, A. M., Jesion, G. & Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(1), 3-11.
- Feldkamp, L. A., Parfitt, A. M., Jesion, G. & Kleerekoper, M. (2009). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(1), 3-11. doi:10.1002/jbmr.5650040103
- Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W. & Huerzeler, M. (2008). Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: A volumetric study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(4), 356-363.
- Geistlich Pharma AG. (2022). Bioflow. In: Herausgeber <https://www.trademarkia.com/bio-flow-88445657>
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(Suppl 3), S20-27.
- Goldschlager, T., Kerr, J., Boundy, I. & Jenkin, G. (2010). Undecalcified bone preparation for histology, histomorphometry, and fluorochrome analysis. *Journal of Visualized Experiments*, (35), 1707.
- Grillenberger, F. E. (2007). Computertomographie: „Kontrast“. Computertomographie, Einführung in ein modernes bildgebendes Verfahren. 1. Aufl. Wien: *Facultas-Verlag*. S. 97. ISBN: 9783850767712.

- Grillenberger, F. E. (2012). „Bildqualität“. Computertomographie, Einführung in ein modernes bildgebendes Verfahren. 2. Aufl. Wien: *Facultas-Verlag*. S. 96-111. ISBN: 9783708908199.
- Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F. & Perale, G. (2019). Bone grafts: Which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*, 46(Suppl 21), 92-102.
- Hildebrand, T., Laib, A., Müller, R., Dequeker, J. & Ruegsegger, P. (1999). Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: Microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), 1167-1174.
- Hsu, J. T., Shen, Y. W., Kuo, C. W., Wang, R. T., Fuh, L. J. & Huang, H. L. (2017). Impacts of 3D bone-to-implant contact and implant diameter on primary stability of dental implant. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(8), 582-590.
- Huang, H. L., Tsai, M. T., Su, K. C., Li, Y. F., Hsu, J. T., Chang, C. H., Fuh, L. J. & Wu, A. Y. (2013). Relation between initial implant stability quotient and bone-implant contact percentage: An in vitro model study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 116(5), e356-361.
- Irie, M. S., Spin-Neto, R., Dechichi, P., Borges, J. S. & Soares, P. B. F. (2018). Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. *Brazilian Dental Journal*, 29(3), 227-238.
- Janssen, N. G., de Ruitter, A. P., Sylvester-Jensen, H.-C., Blindheim, G., Meijer, G. J., Koole, R. & Vindenes, H. (2019). Microstructured beta-tricalcium phosphate for alveolar cleft repair: A two-centre study. *Oral and Maxillofacial Surgery*.
- Jensen, T. & Terheyden, H. (2009). Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 24(Suppl), 218-236.
- Kampschulte, M., Langheinrich, A. C., Sender, J., Litzlbauer, H. D., Althöhn, U., Schwab, J. D., Alexandre-Lafont, E., Martels, G. & Krombach, G. A. (2016). Nano-computed tomography: Technique and applications. *Rofo*, 188(2), 146-154.

- Kao, R. T. & Scott, C. J. (2007). A review of bone substitutes. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 19(4), 513-521.
- Kattimani, V. S., Kondaka, S. & Lingamaneni, K. P. (2016). Hydroxyapatite—Past, present, and future in bone regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7.
- Khan, A. A., Morrison, A., Hanley, D. A., Felsenberg, D., McCauley, L. K., O’Ryan, F., Reid, I. R., Ruggiero, S. L., Taguchi, A., Tetradis, S., Watts, N. B., Brandi, M. L., Peters, E., Guise, T., Eastell, R., Cheung, A. M., Morin, S. N., Masri, B., Cooper, C., Morgan, S. L., Obermayer-Pietsch, B., Langdahl, B. L., Al Dabagh, R., Davison, K. S., Kendler, D. L., Sándor, G. K., Josse, R. G., Bhandari, M., El Rabbany, M., Pierroz, D. D., Sulimani, R., Saunders, D. P., Brown, J. P. & Compston, J. (2015). Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: A systematic review and international consensus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(1), 3-23.
- Khoury, F. & Hanser (2009). „5.4.4. Laterale Knochenblocktransplantation“. In: Khoury, F. (Hrsg.) *Augmentative Verfahren in der Implantologie*. Berlin: *Quintessenz Verlag*. S. 265-6.
- Kopp, S., Warkentin, M., Ori, F., Ottl, P., Kundt, G. & Frerich, B. (2012). Section plane selection influences the results of histomorphometric studies: The example of dental implants. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 57(5), 365-370.
- Kurz, M., Garfin, S. R. & Booth, R. E. (1989). Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. *Spine Journal*.
- Lambrecht, J. T., Filippi, A., Künzel, A. R. & Schiel, H. J. (2003). Long-term evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: A 10-year life table analysis of 468 implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 18(6), 826-834.
- Laschke, M. W., Witt, K., Pohlemann, T. & Menger, M. D. (2007). Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 82, 494–505.
- Linde, A., Alberius, P., Dahlin, C., Bjurstam, K. & Sundin, Y. (1993). Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *Journal of Periodontology*, 64(11, Suppl), 1116-1128.

- Lindquist, L. W., Carlsson, G. E. & Jemt, T. (1996). A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants: Clinical results and marginal bone loss.
- McAllister, B. S. & Haghghat, K. (2007). Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*, 78(3), 377-396.
- McCaul, L. K., Jenkins, W. M. M. & Kay, E. J. (2001). The reasons for extraction of permanent teeth in Scotland: A 15-year follow-up study. *British Dental Journal*, 190(12), 658-662.
- Misch, C. M. (2010). Autogenous bone: Is it still the gold standard? *Implant Dentistry*, 19(5), 361.
- Mollen, E. A. (2014). Alveolenstabilisierung nach Zahnentfernung Vor- und Nachteile.
- Müller, H. V. C., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J. & Rügsegger, P. (1998). Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography.
- Nkenke, E. & Neukam, F. W. (2014). Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: Morbidity, resorption, and implant survival. *European Journal of Oral Implantology*, 7(Suppl 2), S203-S217.
- Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Radespiel-Tröger, M., Kloss, F. & Neukam, F. W. (2001). Morbidity of harvesting of chin grafts: A prospective study. *Clinical Oral Implants Research*, 12(5), 495-502.
- Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M. & Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Bone Mineral Research*, 2(6), 595-610.
- Percie du Sert, N., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., Pearl, E. J., Petersen, O. H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E. S., Silberberg, S. D., Steckler, T. & Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *British Journal of Pharmacology*, 177(16), 3617-3624.

- Pietrokovski, J. M. (1967). Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 17(1), 21-27.
- Pikos, M. A. (2000). Block autografts for localized ridge augmentation. *Implant Dentistry*, 9(1), 67–75.
- Ritman, E. L. (2004). Micro-computed tomography-current status and developments. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6, 185-208.
- Ritman, E. L. (2011). Current status of developments and applications of micro-CT. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13, 531-552.
- Roberts, T. T. & Rosenbaum, A. J. (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*, 8(4), 114-124.
- Rothamel, D., Schwarz, F., Hertel, M., Engelhardt, E., Donath, K., Kuehn, P. & Becker, J. (2008). Dimensional ridge alterations following socket preservation using a nanocrystalline hydroxyapatite paste: A histomorphometrical study in dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(8), 741-747.
- Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Hertel, M., Sculean, A. & Becker, J. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: An experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, 16(3), 369-378.
- Rothamel, D., Schwarz, F. (2012). Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: Results of in vitro and in vivo examinations. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 27(1), 146-154.
- Ruegsegger, P. & Müller, R. (1995). A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture.
- Salem, N. V. Kalyankar & K. S. D. (2010). Image segmentation by using threshold techniques. *arXiv pre-print server*.
- Schouten, C., Meijer, G. J., van den Beucken, J. J., Spauwen, P. H. & Jansen, J. A. (2009). The quantitative assessment of peri-implant bone responses using histomorphometry and micro-computed tomography. *Biomaterials*, 30(27), 4539-4549.

- Schroeder, A., Passi, O. & Sutter, F. (1976). Gewebereaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche. *Schweizer Monatsschrift für Zahnheilkunde*, 86, 713–727.
- Schropp, L., Wenzel, A., Kostopoulos, L. & Karring, T. (2003). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 23(4), 313-323.
- Stauber, M. & Müller, R. (2008). Micro-computed tomography: A method for the non-destructive evaluation of the three-dimensional structure of biological specimens.
- Stavropoulos, A., Windisch, P., Szendroi-Kiss, D., Peter, R., Gera, I. & Sculean, A. (2010). Clinical and histologic evaluation of granular Beta-tricalcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects: A report on five cases. *Journal of Periodontology*, 81(2), 325-334.
- Stock, S. R. (2008). *MicroComputed Tomography: Methodology and Applications*. CRC Press.
- Tan, W. L., Wong, T. L., Wong, M. C. & Lang, N. P. (2012). A systematic review of post-extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 23(Suppl 5), 1-21.
- Von Arx, T., Hermann, J. S., Schenk, R. K. & Buser, D. (2001). Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application.
- Wang, H., Leeuwenburgh, S. C., Li, Y. & Jansen, J. A. (2012). The use of micro- and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(1), 24-39.
- Wang, W. & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224-247.
- Welsch, U. (2006a): Begriffe und Methodik. Lehrbuch Histologie, 2. Aufl.: Elsevier Health Sciences Germany. S. 1-18. ISBN: 9783437593819.
- Zerbo, I. R., Bronckers, A. L., de Lange, G. & Burger, E. H. (2005). Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials*, 26(12), 1445-1451.

Zhao, R., Yang, R., Cooper, P. R., Khurshid, Z., Shavandi, A. & Ratnayake, J. (2021). Bone grafts and substitutes in dentistry: A review of current trends and developments. *Molecules*, 26(10).

Zitzmann, N. U., Marinello, C. P., Schüpbach, P. & Berglundh, T. (2001). Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: A histologic study in humans. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 21(3), 288-295.

Danksagung

Ich möchte meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber allen Personen zum Ausdruck bringen, die mich während der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein spezieller Dank geht an meine Doktormutter, Frau Prof. Dr. Kathrin Becker, M.Sc., für ihre kontinuierliche Unterstützung, ihre fachkundige und wissenschaftliche Begleitung sowie ihre unermüdliche Hilfe während meiner Promotionszeit. Ihr Dank gilt auch für die Einführung in die Software Amira, die Gelegenheit zur Teilnahme an den regelmäßigen wissenschaftlichen Zusammenkünften ihrer Forschungsgruppe, die Bereitstellung von Skripten und die Unterstützung bei statistischen Berechnungen. Ihre wertvolle und wohlwollende Förderung ist mir eine große Hilfe gewesen.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Frank Schwarz für seine hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit meiner Promotion meinen tiefen Dank aussprechen.

Außerdem möchte ich Dr. Puria Parvini, Dr. Karina Obreja und Dr. Jonas Lorenz meinen Dank aussprechen. Sie unterstützten Prof. Dr. Frank Schwarz bei der Durchführung der Tierexperimente für diese Studie und beantworteten stets meine offenen Fragen zur Studie.

Ich danke Herrn Dr. Jürg Zumbrunn von Geistlich Biomaterials für die Bereitstellung der klinischen Fotos.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, die mich stets mit Liebe unterstützt hat, meinen herzlichsten Dank aussprechen. Insbesondere meinen Brüdern Resul und Tahir Akpinar gebührt mein besonderer Dank für ihre Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen und Diagramme. Meinem Partner möchte ich ganz besonders für seinen Rückhalt, seine Motivation und seine Geduld bedanken.