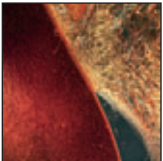


Neuartige Regeneration von Bindegewebe und Zement: Eine histologische Untersuchung nach der Verwendung von Schmelzmatrix-Derivat in Dehiszenzdefekten. Ein Hundemodell



Khalid Alhezaimi, BDS, MSc, FRCD(C)¹/Thakib Al-Shalan, BDS, MS, PhD¹
 Rory O'Neill, DMD, MS²/Tanazi Shapurian, DMD, MS³
 Jafar Naghshbandi, DDS, MS⁴/Paul Levi Jr, DMD⁵
 Terrence Griffin, DMD^{5,6}

In dieser Untersuchung wurde der Heilungsprozess bei Dehiszenzdefekten, die mit Schmelzmatrix-Derivat (EMD) behandelt worden waren, histologisch und histometrisch ausgewertet. Es wurden ausgewachsene weibliche Beagles verwendet. An den oberen Eckzähnen und den zweiten und vierten Prämolaren wurden bukkale knöcherne Dehiszenzen chirurgisch erzeugt. Nach dem Zufallsprinzip wurden 30 Defektbereiche entweder der Test- oder der Kontrollgruppe (je 15 Defekte) zugeteilt. Die Testgruppe erhielt eine Behandlung mit EMD, die Kontrollgruppe nicht. Nach vier Monaten Heilung wurden die Hunde eingeschläfert und Gewebeblöcke präpariert. Anhand der histometrischen Parameter wurde das Parodontalgewebe, das sich in den Defekten gebildet hatte, untersucht. In allen künstlichen Dehiszenzdefekten in den Testbereichen (EMD) hatten sich funktionelle Bindegewebsfasern gebildet, die in den regenerierten zellulären Zement inserierten. Apikokoronar hatte sich durchschnittlich $3,74 \pm 0,43$ mm neuer Zement gebildet. In den Kontrollbereichen hingegen hatte sich in den Dehiszenzdefekten kein Zement gebildet ($P < 0,000$). Es wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Test- und den Kontrollbereichen beobachtet. Innerhalb der Grenzen dieser Studie kann gefolgert werden, dass die Behandlung mit EMD allein effektiv zur Bildung von neuem Zement und von funktionell ausgerichtetem Bindegewebe führte. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2009;29:401–409.)

¹ Assistenzprofessor, College of Dentistry, King Saud University, Riad, Saudi-Arabien.

² Klinischer Privatdozent, School of Dental Medicine, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA.

³ Klinischer Assistenzprofessor, School of Dental Medicine, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA.

⁴ Privatpraxis, Phoenix, Arizona, USA.

⁵ Privatdozent, School of Dental Medicine, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA.

⁶ Leiter und Direktor, Periodontology Department, School of Dental Medicine, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA.

Korrespondenz an: Khalid Al-Hezaimi, PO Box 103851, Riyadh 11616, Saudi-Arabien; E-Mail: Alhezaimi@usc.edu

Eine vollständige Parodontalheilung, die durch Regeneration erfolgt, wird als Wiederaufbau eines neuen Parodonts bezeichnet. Dazu gehört die Bildung von Alveolarknochen, neuem Bindegewebsattachement und neuem Zement¹. Als Reparatur hingegen wird die Heilung bezeichnet, die als Ersatz Epithel, Bindegewebe oder beides hervorbringt, wodurch verschiedene nicht funktionelle Arten von Narbengewebe entstehen, die auch als neues Attachment bezeichnet werden¹. Histologisch umfassen die Reparaturmuster ein langes Saumepithel, die Adhäsion von neuem Bindegewebe und die Ankylose². Bei der gesteuerten Geweberegeneration (GTR) wird eine Barrieremembran verwendet. Sie ermöglicht die selektive Besiedlung des behandelten Bereichs durch Zellen des parodontalen Ligaments. Außerdem dient sie als Platzhalter, stabilisiert die Wunde und schützt das Blutkoagulum^{3–6}.

In einer Serie von experimentellen Studien an Hunden wurde bereits das Parodontalgewebe, das sich nach der GTR bildete, charakterisiert und mit dem ursprünglichen (unbehandelten) Parodontalgewebe an den unteren Prämolaren verglichen. Der neue Zement war auf der Testseite anders als auf der

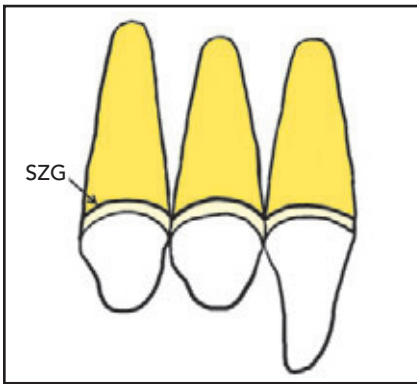
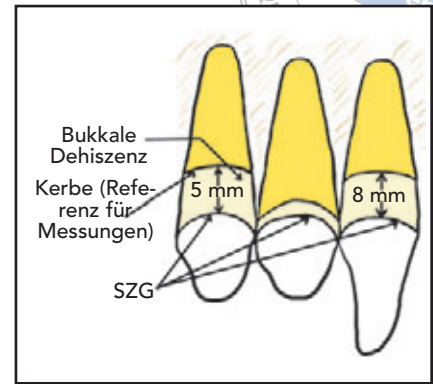


Abb. 1a (links) Normale Anatomie des Oberkiefers beim Hund.

Abb. 1b (rechts) Es wurden Dehiszenzdefekte erzeugt. Koronal zur Schmelz-Zement-Grenze (SZG) wurden Referenzkerben angebracht: am Eckzahn in 8 mm und am zweiten Prämolare (P2) in 5 mm Abstand.



unbehandelten Seite. Nun wurde vermutet, dass die Heilungsergebnisse nach der GTR eher die charakteristischen Eigenschaften einer Reparatur als einer Regeneration aufweisen⁷⁻⁹. In einer weiteren Studie wurde an Affen die Parodontalheilung nach einer GTR-Therapie von Dehiszenzdefekten untersucht. Der Heilungsverlauf in dieser Studie deutete darauf hin, dass das Parodontalgewebe dem des ursprünglichen Gewebes ähnelte¹⁰.

In der jüngeren Vergangenheit wird den biologischen Mediatoren beträchtliche Aufmerksamkeit geschenkt. Es gibt verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die lokal auf erkrankte Parodontalbereiche aufgebracht werden, um die Regeneration zu fördern¹¹⁻¹³. Unter anderem wurde die Wirksamkeit von Schmelzmatrix-Protein (EMD) als zusätzliches Hilfsmittel in der Parodontaltherapie in verschiedenen Studien in vitro und in vivo nachgewiesen¹⁴⁻¹⁷. Das Auftragen eines sauren Extrakts aus porciner Schmelzmatrix auf pathologisch freiliegende Wurzeloberflächen führte nachweislich in Tier- und klinischen Versuchen zur Bildung von

parodontalem Bindegewebsattachement¹⁸. In einer humanhistologischen Studie wurde gezeigt, dass Emdogain (Biora), ein EMD, das Potenzial besitzt, die Bildung von neuem Bindegewebsattachement in humanen intraossären Defekten zu stimulieren¹⁹.

In der vorliegenden Studie wurde die Art des Parodontalgewebes untersucht, das sich nach der Anwendung von EMD in Dehiszenzdefekten beim Hundemodell gebildet hatte.

Material und Methode

Es wurden fünf ausgewachsene weibliche Beagles (Durchschnittsgewicht 13,4 kg, Durchschnittsalter 15 Monate) verwendet. Das Institutskomitee für Tierforschung an der King Saud University, Riad, Saudi-Arabien, genehmigte die Studie. Die nicht chirurgischen und chirurgischen Verfahren erfolgten in Vollnarkose (Ketalar, 10 mg/kg Körpergewicht; Pfizer Inc) und unter örtlicher Betäubung: Xylocain (Astra) mit Epinephrin 5 mg/ml.

Parodontalchirurgie

Das supragingivale Scaling erfolgte vor dem Eingriff drei Wochen lang zweimal wöchentlich mit einem Ultraschallgerät. Es wurden bukkale Mukoperiostlappen voller Dicke gelöst. Das gesamte Weichgewebe an den Zähnen und am Alveolarknochen wurde entfernt. Unter Spülung mit steriler Salzlösung wurden der bukkale Alveolarknochen, das freiliegende parodontale Ligament und der Zement des Eckzahns, des zweiten (P2) und des vierten Prämolars (P4) mit einem runden Karbidbohrer Nr. 6 entfernt. Die Abstände zwischen der Schmelz-Zement-Grenze und dem apikalen Ende des Defekts wurden standardmäßig auf 8 mm für den Eckzahn und 5 mm für die Prämolare festgelegt (Abb. 1).

Die bukkale Hälfte der interradikulären Teile des Alveolarknochens wurde entfernt, damit keine Möglichkeit einer beschleunigten Heilung vom benachbarten Knochen her bestand. An der Wurzeloberfläche wurde eine Kerbe angebracht, die als Referenz für die späteren Messungen der histologischen

Schnitte dienen sollte. Sie befand sich auf apikaler Höhe des chirurgisch entfernten Knochens. Es wurden auf jeder Seite drei Zähne verwendet. Für jede Behandlungsvariable standen also 15 Zähne zur Verfügung.

Entsprechend dem Split-Mouth-Design der Studie wurden die 30 Zähne nach dem Zufallsprinzip den beiden Gruppen zugeteilt: Der Kontrollgruppe, die kein EMD erhielt ($n = 15$ Bereiche), und der Testgruppe, in der die Bereiche zunächst zwei Minuten mit 24 % Ethylendiamintetraessigsäure getätzt wurden, worauf EMD (Emdogain) aufgetragen wurde ($n = 15$). Die Lappen wurden zurückverlegt und mit Vicryl 5-0 (Ethicon) spannungsfrei vernäht.

Alle Tiere erhielten intramuskulär Medicyclin-vet (drei Tage lang dreimal täglich 5 mg/kg Körpergewicht; Norbrook Lab Ltd). Nach zwei Wochen wurden die Fäden entfernt. In den ersten vier Monaten nach dem Eingriff erfolgte zweimal wöchentlich die Plaquebeseitigung, unter anderem mit lokaler Anwendung einer 0,2 % Chlorhexidindigluconatlösung.

Histologische Präparation und Analyse

Nach vier Monaten wurden die Hunde mit einer Überdosis Natriumpentobarbital 3 % eingeschläfert. Die Segmente der Kiefer, die die Zähne mit der bukkalen Dehiszenz enthielten, wurden zusammen mit den Nachbarzähnen und dem Alveolarknochen en bloc entnommen. Die Blöcke wurden eine Woche in 10 % neutraler Formalinlösung fixiert. Dann wurden sie 10 Wochen in einer Lösung aus gleichen Teilen 50 % Ameisensäure und 20 % Natriumcitrat dekalzifiziert. Die

dekalzifizierten Biopsate wurden unter fließendem Wasser gewaschen, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom mit Diamantklinge wurden bukkolinguale Schnitte von 7 μm angefertigt und mit Retic und Masson-Trichrom eingefärbt.

Histomorphometrische Analyse

Für die Messungen wurde ein Lichtmikroskop verwendet, das an eine Videokamera und einen Computer mit der entsprechenden Software (Buehler) angeschlossen war. Die deskriptive Analyse der einzelnen histomorphometrischen Parameter für jeden Hund erfolgte durch einen einzelnen Untersucher. Er wertete die Art der Heilung nach der Anwendung von EMD aus und inwieweit sich parodontales Ligament (PDL), Zement und Knochen gebildet hatten.

Das Gewebe, das sich in den Bereichen der Kontroll- und Testdefekte gebildet hatte, wurde miteinander verglichen. Die Analysen wurden auf die folgenden Punkte beschränkt:

- Position 1: Das Niveau des krestalen Knochens auf der unbehandelten Seite wurde in der Test- und Kontrollgruppe mit dem entsprechenden Bereich der Testseite verglichen.
- Position 2: Die Basis der Kerbe auf der Testseite wurde in der Test- und Kontrollgruppe mit dem entsprechenden Bereich der unbehandelten Seite verglichen.

Datenanalyse

Für die Analyse der Ergebnisse wurde der standardisierte paarige t-Test verwendet.

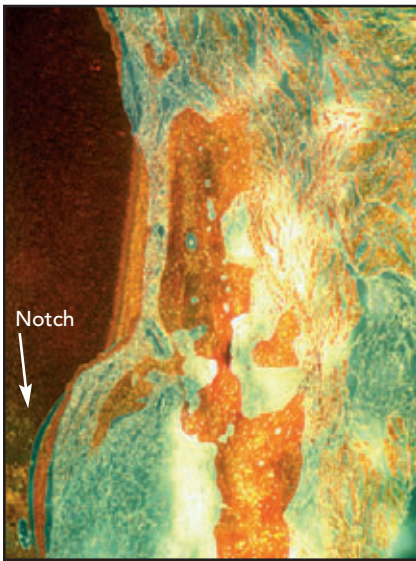


Abb. 2 Testbereich mit 1,9 mm regeneriertem Knochen koronal zu der Kerbe (Notch) nach EMD-Anwendung. Im Zusammenhang mit dem neuen Knochen finden sich neuer Zement und funktionell ausgerichtete Fasern (modifiziertes Masson-Trichrom; x 20).

Ergebnisse

Testdefekte

An drei der 15 mit EMD behandelten Zähne hatte sich Bindegewebe mit neuem Zement, PDL und Knochen gebildet. Die durchschnittliche Höhe des neuen Knochens ab der Basis der Kerbe betrug 1,9 mm (Abb. 2). Die Knochenhöhe an den übrigen Zähnen der Testgruppe entsprach der Basis der Kerbe oder war apikal resorbiert ($0,4 \pm 0,5$ mm). In 13 der Testbereiche war zwar koronal zu der Kerbe kein Knochen vorhanden, aber es gab Anzeichen für ein funktionell ausgerichtetes Bindegewebsattachement im Zusammenhang mit dem neugebildeten Zement. Das Gewebe war demjeni-

gen auf der entsprechenden unbehandelten Seite ähnlich (Abb. 3 und 4). Koronal maß dieses Bindegewebe $3,74 \pm 0,43$ mm. Das entsprach $58 \% \pm 4 \%$ der Defekthöhe von der Basis der Kerbe aus.

Kontrolldefekte

Es hatte sich kein Bindegewebe gebildet. Die Knochenhöhe lag in jedem Bereich apikal zur Basis der Kerbe ($0,7 \pm 0,4$ mm) (Abb. 5). Außerdem war in keinem der Kontrollbereiche neuer Zement vorhanden. 12 Zähne hatten ein langes Saumepithelattachement (Abb. 6 und 7), und drei Zähne hatten eine Bindegewebeadhäsion.

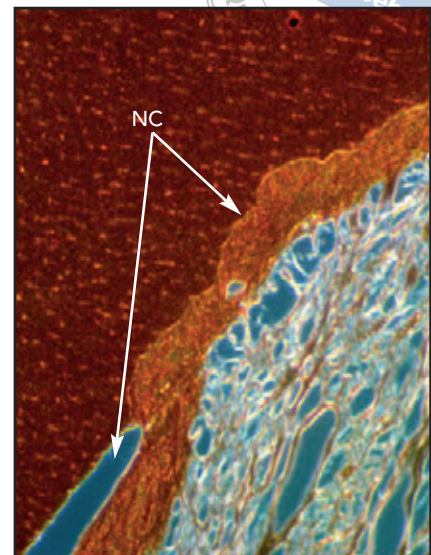
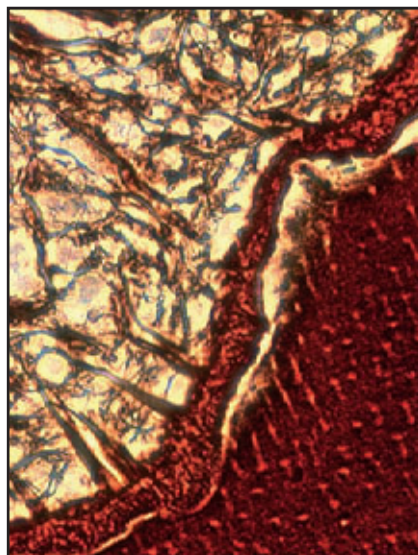
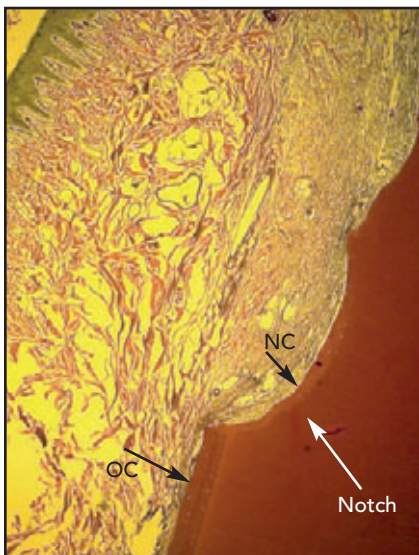


Abb. 3a (oben links) Histologischer Schnitt eines Testbereichs, der die Regeneration von Zement und PDL zeigt, der den gesamten Defekt ohne Knochen bedeckt (Retic; x 10). NC = neuegebildeter Zement; OC = alter Zement, Notch = Kerbe.

Abb. 3b (oben Mitte) und **3c** (oben rechts) Bindegewebsfasern, die senkrecht in den neuegebildeten zellulären Zement inserierten (Retic; x 60). NC = neuegebildeter Zement.

Abb. 3d (rechts) Die Kontinuität des neuegebildeten Zements (NC), der den alten Zement (OC) apikal zur Kerbe überlappt, ist zu erkennen (Retic; x 40).

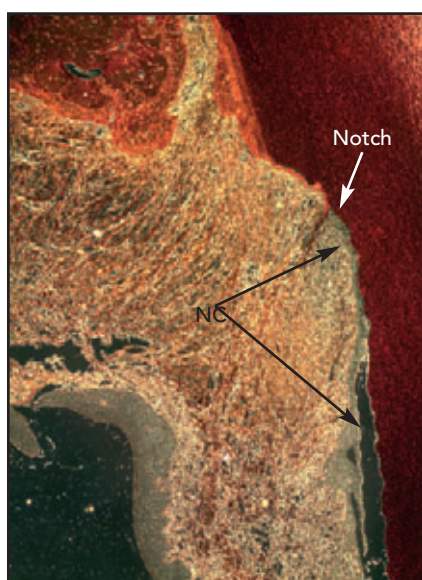
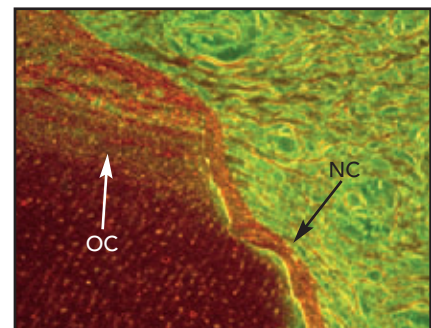
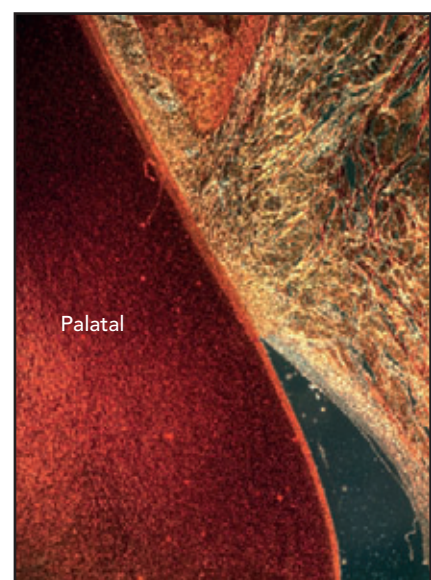


Abb. 4a (links) Der Testbereich zeigt das Bindegewebsattachment am neuegebildeten Zement (NC) und ein Zementartefakt (unterer Pfeil) (Retic; x 10). Notch = Kerbe.

Abb. 4b (rechts) Unbehandelter Bereich (palatinale [palatal] Seite) mit Knochen, Zement und PDL (Retic; x 10).



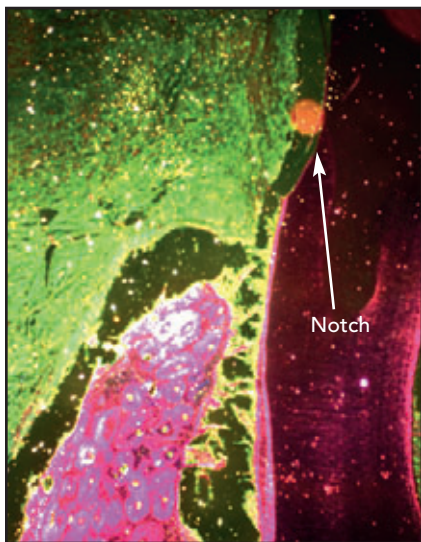


Abb. 5 Kontrollbereich mit Knochen unterhalb der Kerbe (Notch), ohne Zement (modifiziertes Masson-Trichrom; x 20).

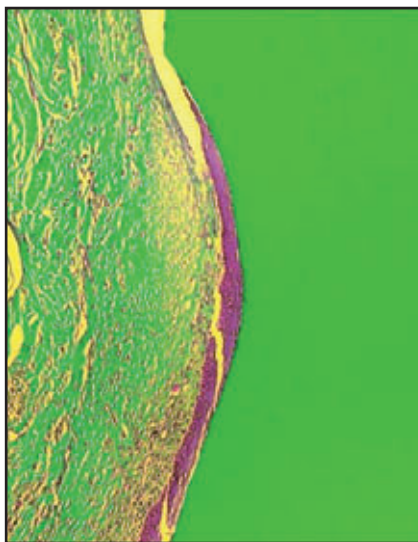


Abb. 6a Histologischer Schnitt eines Kontrollbereichs nahe der Kerbe, mit langem Saumepithel und ohne Anzeichen von Zement- oder Knochenbildung (modifiziertes Masson-Trichrom; x 20).

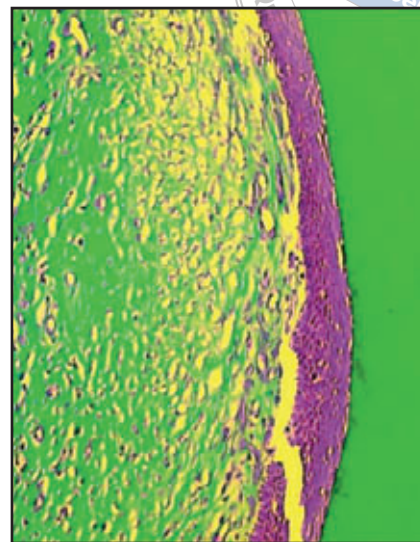


Abb. 6b Vergrößerte Ansicht (x 40).

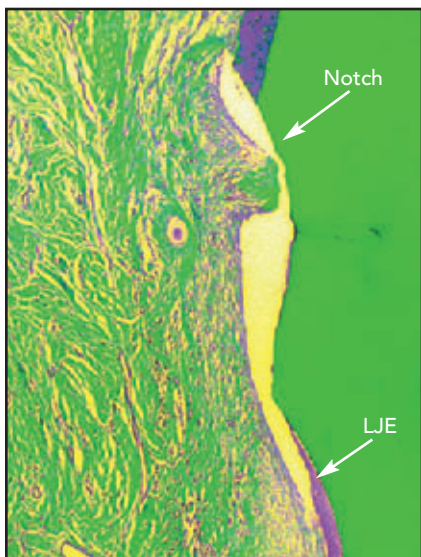
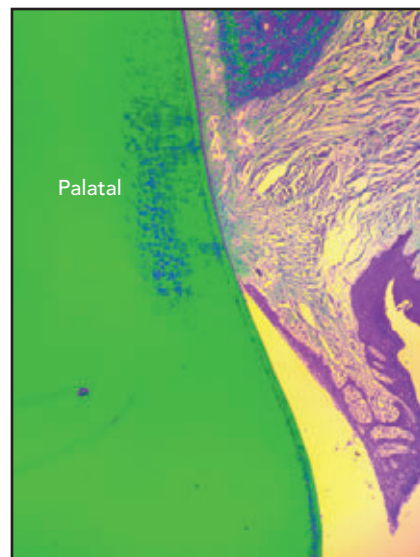


Abb. 7a (links) Der Kontrollbereich zeigt eine Epithelinvasion, die zu einem langen Saumepithel (LJE) führte (modifiziertes Masson-Trichrom; x 10). Notch = Kerbe

Abb. 7b (rechts) Unbehandelter Bereich (palatinale (palatal) Seite) mit Knochen, Zement und PDL (Retic; x 10).



Diskussion

In seinem grundlegenden Konzept vertrat Melcher die Ansicht, dass es zwei Arten der Parodontalheilung gibt: Regeneration (Knochen, PDL und Zement) und Reparatur (langes Saumepithel, Bindegewebeadhäsion und Ankylose)². Neues Attachment wird als Vereinigung von Bindegewebe oder Epithel mit einer Wurzeloberfläche definiert, die ihr ursprüngliches parodontales Attachment verloren hatte. Bei diesem Attachment kann es sich um epitheliales Attachment oder eine Bindegewebeadaptation handeln. Auch die Bildung von neuem Zement kann dazugehören². Das neue Attachment hat keine funktionellen bindegewebigen Fasern, sondern ist eher eine Adaption des Bindegewebes an das Dentin oder den Zement. In der vorliegenden Studie hatten 80 % der Kontrollbereiche ein langes Saumepithel, 20 % hatten eine Bindegewebeadhäsion. Das stimmt mit früheren Berichten überein²⁰⁻²². Deren Ergebnisse zeigten, dass nach der Ablösung der gingivalen Fasern und der Entfernung des Zements nach einem Lappeneingriff ein Großteil der Wurzel anschließend von Epithel und nicht von Zement bedeckt ist. In der vorliegenden Testgruppe wurde nach der Anwendung von EMD im größten Teil des neuen Attachments neuer Zement festgestellt. Der Zement war offensichtlich fest mit dem Wurzelentin verbunden, mit der Insertion von funktionell ausgerichteten Bindegewebsfasern, ähnlich dem Gewebemuster auf der unbehandelten Seite.

In einer experimentellen Studie am Affenmodell wurden histologische Nachweise einer parodontalen Regeneration mit Schmelzmatrix-Proteinen allein und mit Schmelzmatrix-Proteinen und einer GTR er-

bracht²³. In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass sich in Bereichen, die mit EMD (sowohl mit als auch ohne Membran) behandelt worden waren, Zement bildete. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Kürettage mit offenem Lappen in den meisten Fällen nur eine geringe oder gar keine Zementbildung²⁴. Hammerström et al. berichteten von einer Regeneration (d. h. Knochen, PDL und Zement) nach der Anwendung von EMD bei bukkalen Dehiszenzen bei Affen¹⁵. Die Autoren verwendeten allerdings keine histologische Referenz (d. h. Kerbe an der Basis des Defekts), was eine Differenzierung der Messungen ermöglicht hätte. In der vorliegenden Studie wurde ein deutliches Attachment zwischen dem Bindegewebe und dem neuen Zement ohne eine Knochenbildung beobachtet. Die Autoren nehmen an, dass es bei der Anwendung von EMD keine vollständige Regeneration gab, weil kein Platzhalter verwendet wurde – eine der wichtigsten Voraussetzungen laut Melcher.

Die Heilung des Parodontalgewebes wird in zwei Arten unterteilt. Als Regeneration wird ein biologischer Prozess bezeichnet, bei dem die Architektur und Funktion des verloren gegangenen Gewebes sich vollständig erneuern. Als Reparatur hingegen wird ein biologischer Prozess bezeichnet, bei dem der Zusammenhalt des zerstörten Gewebes durch neues Gewebe entsteht, das jedoch die Struktur und Funktion des verloren gegangenen Gewebes nicht wiederherstellt¹⁵. In der vorliegenden Studie wurde keine Knochenbildung beobachtet. Allerdings zeigte sich in den chirurgisch erzeugten Dehiszenzen die Bildung von funktionell ausgerichteten Bindegewebsfasern, die in den neugebildeten zellulären Zement inserierten. Dies wird aus zwei Gründen als



Bindegewebs-Zement-Regeneration bezeichnet: (1) Bei einer Dehiscenz, in der ursprünglich kein Knochen vorhanden und das Gewebe durch eine Parodontalerkrankung beeinträchtigt war, ist für die Regeneration die Bildung von Zement und Bindegewebe vorrangig. (2) Nach Wissen der Autoren ist dies die erste Studie, in der nachgewiesen wurde, dass funktionelles Bindegewebe in regenerierten zellulären Zement inserierte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass im Hundemodell eine neue Art der Regeneration mit Bindegewebe und neugebildetem Zement stattfinden kann, nachdem in Dehiscenzbereichen biologische Mediatoren verwendet worden waren.

Literatur

1. Ten Cate AR. Glossary of terms. *J Periodontol* 1977;48:611–612.
2. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976;47:256–260.
3. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984;11:494–503.
4. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration—Animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993;1:26–35.
5. Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araujo M. The effect of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1995;22:276–283.
6. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantén S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 1980;7:394–401.
7. Araújo M, Berglundh T, Lindhe J. The periodontal tissues in healed degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1996;23:532–541.
8. Araújo MG, Berglundh T, Lindhe J. On the dynamics of periodontal tissue formation in degree III furcation defects. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1997;24:738–746.
9. Araújo MG, Berglundh T, Lindhe J. GTR treatment of degree III furcation defects with 2 different resorbable barriers. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1998;25:253–259.
10. Graziani F, Laurell L, Tonetti M, Gottlow J, Berglundh T. Periodontal wound healing following GTR therapy of dehiscence-type defects in the monkey: Short-, medium- and long-term healing. *J Clin Periodontol* 2005;32:905–914.
11. Howell TH, Martuscelli G, Oringer J. Polypeptide growth factors for periodontal regeneration. *Curr Opin Periodontol* 1996;3:149–156.
12. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: A critical review. *J Periodontol* 2002;73:925–936.
13. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res* 2001;80:2075–2079.
14. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997;24:658–668.
15. Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997;24:669–677.
16. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol* 1997;24:693–696.
17. Slavkin HC. What is the role of the host in periodontal disease? *Periodontol Abstr* 1975;23:101–103.



18. Venezia E, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: A literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15: 382–402.
19. Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, Donos N. Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative (Emdogain). *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:374–381.
20. Levine HL, Stahl SS. Repair following periodontal flap surgery with the retention of gingival fibers. *J Periodontol* 1972;43: 99–103.
21. Listgarten MA. Electron microscopic study of the junction between surgically denuded root surfaces and regenerated periodontal tissues. *J Periodontal Res* 1972;7: 68–90.
22. Stahl SS, Slavkin HC, Yamada L, Levine S. Speculations about gingival repair. *J Periodontol* 1972;43:395–402.
23. Sculean A, Donos N, Brex M, Reich E, Karring T. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol* 2000; 27:466–472.
24. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol* 2001;72:583–589.