

Aus der Poliklinik für Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. J. Becker

Biokompatibilität, Abbau und angiogenetische Aspekte nativer und quervernetzter kollagener
Membranen für die gesteuerte Knochen- und Geweberegeneration

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. dent. Daniel Rothamel
2008

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Becker

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Christopher Poremba

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	5
1.1 Gesteuerte Knochen- und Geweberegeneration	6
1.2 Anforderungen an Membranen für GBR/GTR-Verfahren	10
1.3 Struktur und charakteristische Eigenschaften von Kollagen	12
1.4 Abbaumechanismen verfügbarer Kollagenmembranen	13
1.5 Quervernetzung und Auswirkungen auf die Biokompatibilität	14
1.6 Biodegradation und Angiogenese	15
1.7 Studiendesign und Hypothese	16
MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Untersuchungsmaterial	17
2.2 In-vitro Studie I: Biokompatibilität	19
2.2.1 Isolation der PDL-Fibroblasten	19
2.2.2 SaOs-2-Osteoblast-like-cells	20
2.2.3 Zellkultur	20
2.2.4 Quantitative Analyse	21
2.2.5 Morphologische Analyse	22
2.2.6 Statistische Analyse	22
2.3 In-vitro Studie II: Endothelzellproliferation und -invasion	22
2.3.1 Isolation der HUVEC-Zellen	22
2.3.2 Zellkultur	24
2.3.3 Histologische Analyse	24
2.3.4 Quantitative Analyse	25
2.3.5 Statistische Analyse	25
2.4 In-vivo Studie: Biodegradation und Angiogenese	25
2.4.1 Tiermodell	26
2.4.2 Vorbereitung der Implantate	26
2.4.3 Chirurgisches Prozedere	27
2.4.4 Entnahme der Proben	28
2.4.5 Histologische und histomorphometrische Auswertung	28
2.4.6 Statistische Analyse	29
2.4.7 Immunhistochemische Auswertung	29
2.4.8 Statistische Analyse	31

ERGEBNISSE.....	32
3.1 In-vitro: Biokompatibilität	32
3.1.1 SaOs-2-Osteoblasten	32
3.1.1.1 Quantitative Analyse	32
3.1.1.2 Morphologische Analyse (REM)	33
3.1.2 PDL-Fibroblasten	35
3.1.2.1 Quantitative Analyse	35
3.1.2.2 Morphologische Analyse (REM)	36
3.2 In-vitro: Endothelzellproliferation und –invasion.....	38
3.2.1 Quantitative Analyse	38
3.2.2 Histologische Beurteilung des Wachstumsmusters.....	41
3.3 In-vivo: Biodegradation	43
3.3.1 Histologien	43
3.3.1.1 BG	43
3.3.1.2 VN1	44
3.3.1.3 VN2	45
3.3.1.4 VN3	46
3.3.1.5 BM.....	47
3.3.1.6 BME	48
3.3.1.7 OS.....	49
3.3.1.8 TD.....	50
3.3.2 Histomorphometrie.....	51
3.4 In–vivo: Angiogenese	55
3.4.1 Immunhistologie.....	55
3.4.2 Histomorphometrie.....	57
DISKUSSION	62
SCHLUSSFOLGERUNG	82
LITERATURVERZEICHNIS	83
TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
ZUSAMMENFASSUNG.....	99
DANKSAGUNG.....	100
LEBENSLAUF	101
ANHANG: VERÖFFENTLICHUNGEN	102

1 EINLEITUNG

Für die Wiederherstellung der Kaufunktion nach Zahnverlust hat sich in den vergangenen Jahrzehnten neben dem rein prothetischen Ersatz mittels Kronen, Brücken und Prothesen ein weiteres therapeutisches Feld etabliert, welches auf der Insertion von direkt im Kieferknochen verankerten dentalen Implantaten basiert. Es erweitert die prothetische Rehabilitation um die Möglichkeit, Einzelzähne oder Zahngruppen ohne Miteinbeziehung der Nachbarzähne durch implantatgetragene Einzelkronen und Brückenkonstruktionen zu versorgen. Zudem sind implantatunterstützte Prothesenlösungen möglich, die im Vergleich zu rein schleimhautgetragenen Prothesen ein weitaus höheres Maß an Tragekomfort und physiologischer Mastikation gestatten (Al-Omiri et al., 2005).

Die Insertion dentaler Implantate setzt jedoch ein adäquates Knochen- und Weichgewebslager voraus, um eine hohe Einheilwahrscheinlichkeit, aber auch eine ausreichende Langzeitstabilität zu gewährleisten. Gerade der Knochenaspekt unterliegt einer hohen Variabilität und wird durch physiologische Grenzen wie den Verlauf des N. alveolaris inferior oder die Ausdehnung der Kieferhöhle beeinflusst. Zudem bewirken längere Minderbeanspruchung durch fehlende Belastungsreize, aber auch entzündliche und tumoröse Vorgänge einen Volumenverlust von Knochengewebe. So wird ein zahnloser Kiefer stets sowohl in der Höhe als auch in der Breite an Dimension verlieren, wenn die über den Zahnhalteapparat auf den Knochen übertragene Kaubelastung als funktioneller Belastungsreiz fehlt. Bei den entzündlichen Vorgängen sind vor allem marginale Parodontitiden von Zähnen für einen lokalisierten oder auch generalisierten Knochenabbau verantwortlich. Die prothetische Rehabilitation nach Tumorerkrankungen stellt ein weiteres, sehr anspruchsvolles Feld dar und wird zumeist durch autogene Transplantationen in Verbindung mit enossalen Implantaten erzielt.

Betrachtet man die in der heutigen Praxis durchgeführten Implantationen, so lässt sich ein hoher Patientenanteil ausmachen, bei denen das Knochenlager für das Einbringen eines oder auch mehrerer Implantate nicht ausreicht. Bei diesen Fällen wird eine vorherige oder auch gleichzeitige Ein- oder Auflagerung von Knochen oder Knochenersatzmaterial im Sinne einer Augmentation notwendig,

damit der enossale Anteil des eingebrachten Implantates vollständig in Knochengewebe zu liegen kommt.

Im Oberkiefer ist in vertikaler Dimension eine Anhebung des Kieferhöhlenbodens durch Präparation der Schneider'schen Membran und Einlagerung von Knochenersatzmaterial oder Eigenknochen möglich. Man bezeichnet dieses Verfahren als Sinusbodenelevation oder auch Sinuslift. Es gehört heutzutage zu den Standardtherapieverfahren für die Oberkieferimplantation und zeigt eine hohe Vorhersagbarkeit und Erfolgsaussicht (Strietzel, 2004; Al-Omiri, Hantash et al., 2005). Alternativ kann durch mehr oder weniger aufwändige Knochenblocktransplantationen eine Zunahme der Kieferkambbreite oder auch Kieferkammhöhe erzeugt werden (Zide, 2000; Sethi et al., 2001; Proussaefs et al., 2005). Die Verwendung von autogenem Knochen beinhaltet jedoch die Notwendigkeit einer Entnahme an anderer Stelle (Becken- oder aufsteigender Kieferkamm, Tuber, Kinn, Schulterblatt, Schädelkalotte) und ist verbunden mit einer entsprechend höheren Patientenmorbidity. Zudem unterliegen autogene Knochentransplantate einer hohen Resorption (Araujo et al., 2002). Gerade für kleinere Augmentationen, welche vornehmlich periimplantär durchgeführt werden, bietet sich daher die Verwendung von Knochenersatzmaterialien allein oder in Kombination mit Eigenknochen an. Knochenersatzmaterialien sind in unbegrenztem Maße verfügbar und zeigen eine geringere Resorption im Vergleich zu autologem Knochen. Sie haben vergleichbare Implantatüberlebensraten gezeigt wie rein autologe Augmentate (Hanft et al., 1995; Del Fabbro et al., 2004) und können allein periostgedeckt oder in Verbindung mit einer Membran im Sinne einer gesteuerten Geweberegeneration (GTR) verwendet werden.

1.1 Gesteuerte Knochen- und Geweberegeneration

Die gesteuerte Knochen- (GBR) und Geweberegeneration (GTR) kann heutzutage als therapeutisches Standardverfahren in der Parodontologie, Implantologie sowie Oral- und Kieferchirurgie angesehen werden. Ihr Prinzip beruht auf der Isolation potenziell regenerativer Zelltypen, wie z.B. Desmodontalfibroblasten und Osteoblasten von schnell proliferierenden Epithel- und Bindegewebszellen. Ihr Ziel ist die vorhersehbare Regeneration verloren gegangenen Gewebes (Guided tissue regeneration: GTR). Der Einsatz von mechanischen Barrieren (Abb. 1) spielt bei diesen

Prozessen eine entscheidende Rolle (Gottlow et al., 1986; Dahlin et al., 1988; Karring et al., 1993; Hämmerle et al., 1998; Hämmerle et al., 2001).

Die erste getestete Generation von Barriere-Membranen bestand aus nicht-resorbierbaren Materialien wie z.B. einem Zellulose-Ester (Milipore®-Filter) sowie aus expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) (Nyman et al., 1982; Gottlow et al., 1984; Gottlow, Nyman et al., 1986; Karring et al., 1993). In einer ersten humanhistologischen Untersuchung konnte drei Monate nach Applikation einer Milipore®-Filter-Membran (F) eine neue Zementschicht (Keil) mit inserierenden Kollagenfasern (Pfeil) auf der ehemals erkrankten Wurzeloberfläche festgestellt werden (Abb. 2 (Nyman, Lindhe et al., 1982)). Vergleichbare histologische Ergebnisse wurden auch nach dem ersten Einsatz einer ePTFE-Membran im Menschen beschrieben (Gottlow, Nyman et al., 1986). Das Ausmaß der Regeneration schien dabei von verschiedenen Faktoren wie z.B. der Restmenge von gesundem parodontalen Ligament sowie der Defektkonfiguration abhängig zu sein. Diese Ergebnisse konnten in einer Vielzahl histologischer und klinischer Untersuchungen bestätigt werden (Pontoriero et al., 1988; Pontoriero et al., 1992; Selvig et al., 1992; Cortellini et al., 1993; Karring, Nyman et al., 1993).

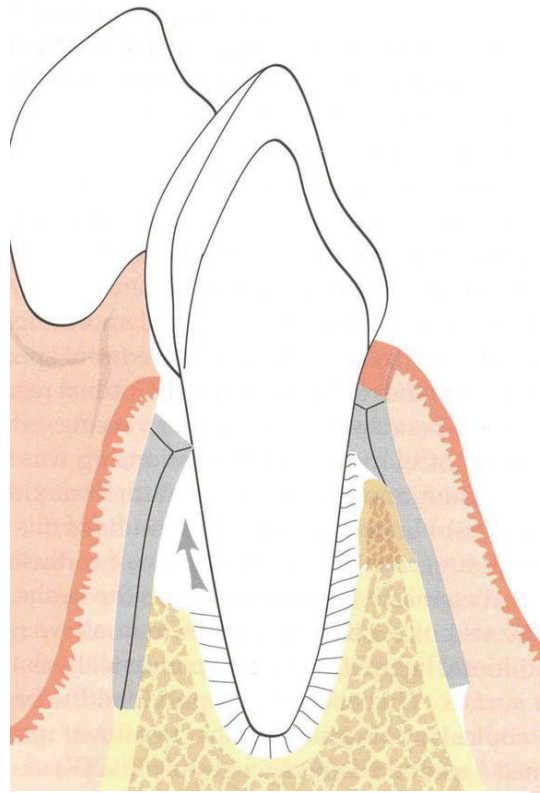


Abb. 1: Prinzip GTR/GBR

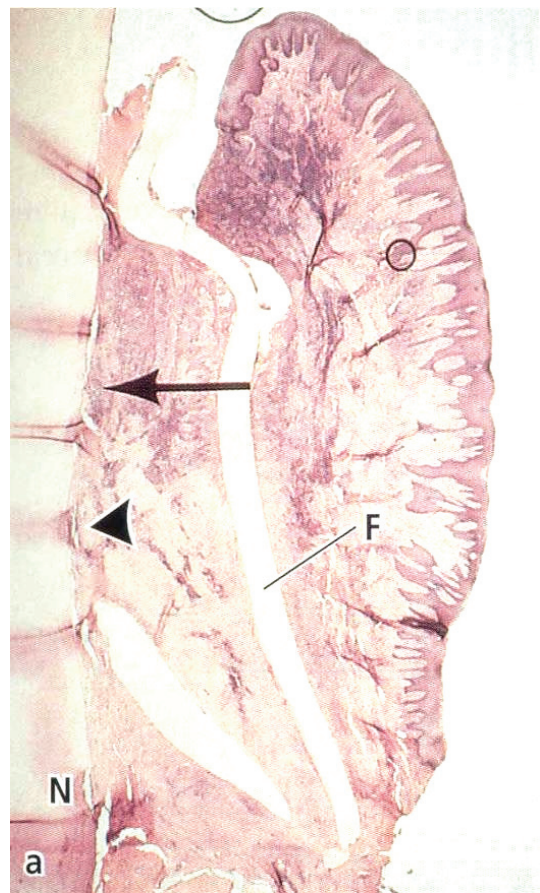
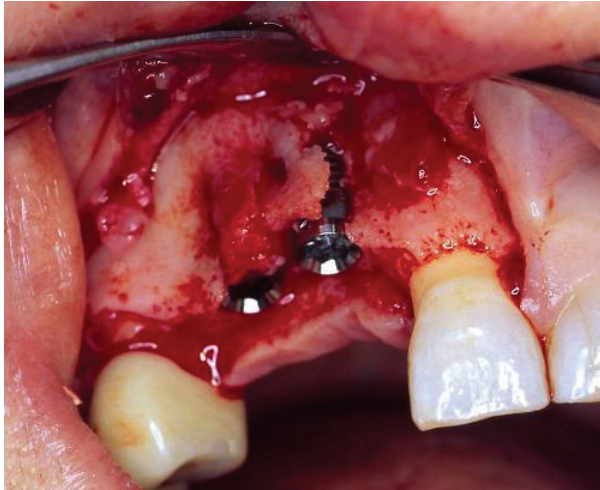


Abb. 2: Histologie einer GTR-Therapie

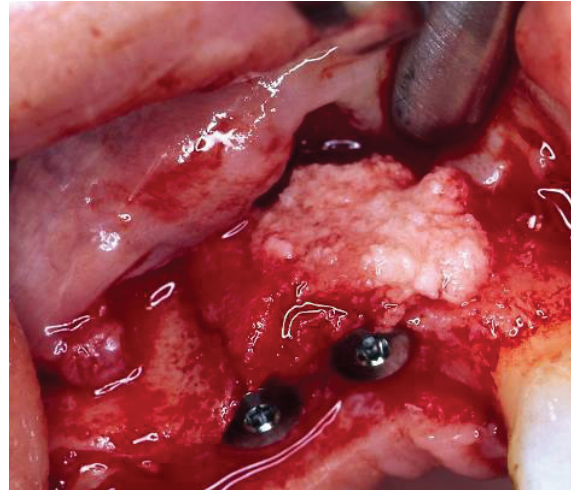
Das Prinzip der GTR konnte auch erfolgreich für die Regeneration rein knöcherner Defekte eingesetzt werden (Dahlin et al., 1988). Da keine unterschiedlichen parodontalen Gewebe, sondern ausschließlich Knochen regeneriert wird, wurde hierfür der Begriff gesteuerte Knochenregeneration (Guided bone regeneration: GBR) eingeführt. So konnten durch den Einsatz einer nicht-resorbierbaren ePTFE-Membran sowohl standardisierte mandibuläre Defekte als auch periimplantäre Dehiszenzdefekte in der Tibia von Ratten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe knöchern regeneriert werden (Dahlin et al., 1988; Dahlin et al., 1989).

Ein Nachteil der bereits angesprochenen nicht-resorbierbaren Materialien besteht in der Notwendigkeit eines zweiten chirurgischen Eingriffs, bei dem nach erfolgter Regeneration die Membran wieder entfernt wird. Hierbei kann die Periostlösung zu einer krestalen Resorption des Alveolarknochens und somit zu einer Beeinträchtigung des Behandlungsergebnisses führen (Pihlstrom et al., 1983). Weiterhin wurde im Zusammenhang mit ePTFE-Membranen häufig von Spontanperforationen der bedeckenden Schleimhaut berichtet. Dies erforderte aufgrund einer bakterielle Kontamination der Membranen deren frühzeitige Entfernung (Selvig, Kersten et al., 1992; Temprow et al., 1993; Hardwick et al., 1994). Um diese Nachteile zu umgehen, wurden während der letzten Jahre zahlreiche bioresorbierbare Membranen entweder aus natürlichen (Dura mater) oder synthetischen (Polylaktiden (PLA), Polyglykoliden (PGA) oder Polyurethan) Biomaterialien hergestellt und auf einen möglichen Einsatz für GBR/GTR-Verfahren hin untersucht (Magnusson et al., 1988; Greenstein et al., 1993; Huttmacher et al., 1996; Kohal et al., 1998). Zunehmend wird über den Einsatz von Membranen berichtet, die aus bovinem und porkinem Kollagen Typ I und III gewonnen werden (Bunyaratavej et al., 2001).

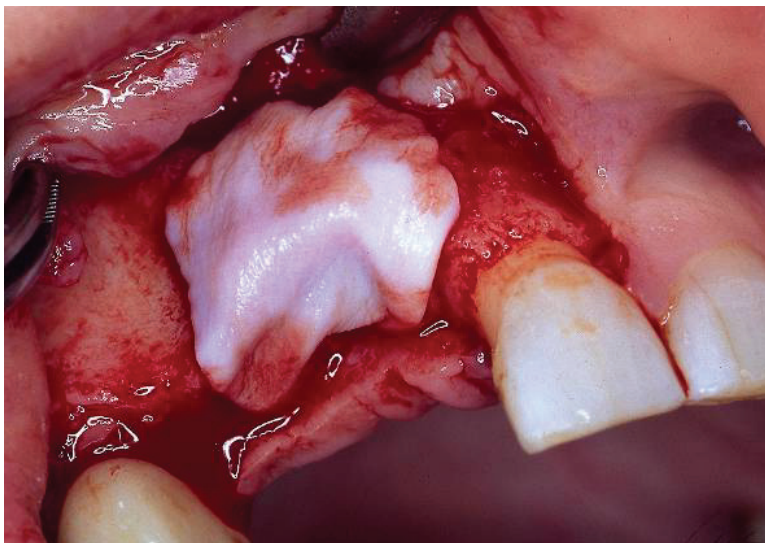
Abbildung 3 verdeutlicht das klinische Vorgehen der gesteuerten Knochenregeneration im Rahmen einer Implantatversorgung bei nicht ausreichendem Knochenangebot: Um die geplanten Implantate in regio 12/13 inserieren zu können, wird der Alveolarkamm der Länge nach chirurgisch gespalten und die Implantatschrauben unter Aufspreizung des Kieferkammes inseriert. Hierbei kommt es zu einer Fraktur der vestibulären Kortikalis, so dass das mesiale Implantat bei klinischer Primärstabilität nicht



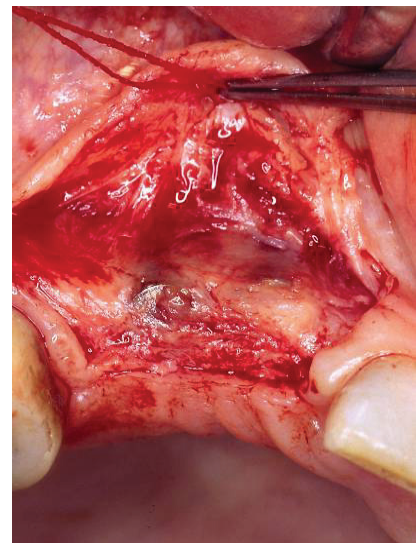
a. Implatatinserktion



b. Augmentation



c. Membranapplikation



d. Re-Entry

Abb. 3 a-d: Klinische Anwendung von Kollagenmembranen

vollständig von Knochen umgeben ist (Abb. 3a). Das während der Implantatbohrung im Knochenfilter gesammelte autologe Knochenmaterial wird auf den Defekt aufgebracht und entsprechend der gewünschten Kieferform im Überschuss anmodelliert (Abb. 3b). Anschließend erfolgt die Abdeckung des Augmentates mit einer nativen Kollagenmembran. Diese wird nach Applikation mit isotonischer Kochsalzlösung rehydriert und adaptiert sich selbstständig an das Wundgebiet (Abb. 3c). Beim Re-Entry nach 4 Monaten imponiert im Rahmen der Freilegungsoperation eine glatte Knochenoberfläche. Deutlich ist in Abb. 3d die ossäre Regeneration zu erkennen. Die Fraktur der Kortikalis ist vollständig regeneriert; es sind keine Membranreste nachweisbar. Allerdings hat das autologe Augmentat über 50 % seines Volumens verloren, da es nicht mit einem Knochenersatzmaterial stabilisiert wurde.

1.2 Anforderungen an Membranen für GBR/GTR-Verfahren

Ein Material, welches als Membran für GBR/GTR-Verfahren zum Einsatz kommen soll, muss verschiedenartigen Anforderungen (Tab. 1) genügen. Neben der bereits angesprochenen Barrierefunktion wurde auf die Wichtigkeit der Stabilisierung des Blutkoagulums im Wundbereich hingewiesen (Haney et al., 1993). In experimentellen Untersuchungen im Hundemodell wurde unter Verwendung eines supraalveolären Defektmodells (Wikesjö et al., 1994) gezeigt, dass das Ausmaß der zu erwartenden parodontalen Regeneration primär von einer stabilen Adhärenz des Blutkoagulums auf der gereinigten Wurzeloberfläche abhängig ist (Wikesjö et al., 1990; Wikesjö et al., 1991). Die Hypothese dieser Untersuchungen bestand darin, dass durch eine Konditionierung der Wurzeloberfläche mittels Heparin ein instabiler Verbund zwischen Wurzeloberfläche und Blutkoagulum entsteht. Die histologische Heilung in der Testgruppe (Heparin) war nach vier Wochen vorwiegend durch die Ausbildung eines langen Saumepithels charakterisiert. Im Vergleich hierzu konnte durch den zusätzlichen Einsatz einer ePTFE-Membran (Haney, Nilveus et al., 1993) oder der Einlage eines PLA-Implantates (Wikesjö and Nilveus, 1990) eine bindegewebige Defektheilung erzielt werden.

Die Biokompatibilität der Membranen sowie deren Abbauprodukte stellt eine weitere Grundvoraussetzung für einen komplikationslosen Heilungsverlauf dar. In ihrer einfachsten Definition ist Biokompatibilität die Reaktion eines Körpergewebes auf einen Werkstoff, der natürlicher Weise nicht im Körper vorkommt. Die Gewebereaktion ist zum einen vom Materialtyp abhängig. Sie wird aber ebenso beeinflusst vom Ort der Applikation, von der zugeordneten Funktion und der Liegezeit des Werkstoffs im Körper. Weiterhin spielen Alter, Gewohnheiten und der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten eine wichtige Rolle. Generell kann die Biokompatibilität eines Werkstoffes also als sein Verhalten in Wechselwirkung mit seiner belebten Umgebung angesehen werden. Sie hat weiterhin einen unmittelbaren Einfluss auf die Qualität der Gewebeintegration des inkorporierten Materials. Eine durch den Werkstoff oder dessen Abbauprodukte hervorgerufene Fremdkörperreaktion im angrenzenden Gewebe kann dessen Integration verhindern oder reduzieren, da die Anlagerung und Proliferation von Fibroblasten eine Grundvoraussetzung für die Kollagensynthese und nachfolgende

Tabelle 1 Anforderungen an Membranen für GBR/GTR-Verfahren

Anforderung	Bedeutung
1. Biokompatibilität	beeinflusst Zellattachment, Proliferation und Gewebeintegration reduziert/verhindert entzündliche Abbauvorgänge antigenfrei
2. Barrierefunktion	inhibiert Einwachsen schnell proliferierender Epithel- und Bindegewebszellen in den Wundbereich
3. Formstabilität	Volumenerhalt des Wundbereichs Erhalt der Geometrie und Lokalisation des Augmentats
4. Gewebeintegration	Stabilisation des Blutkoagulums verhindert bindegewebige Einkapselung
5. Semipermeabilität	ermöglicht frühzeitige transmembranöse Angiogenese
6. Handling	praktikable klinische Anwendbarkeit

Gewebeintegration darstellen (Somerman et al., 1991).

Experimentelle und klinische Untersuchungen ergaben außerdem, dass das Ausmaß der Regeneration von der Morphologie des Knochendefekts beeinflusst wird (Gottlow, Nyman et al., 1984; Karring, Nyman et al., 1993; Selvig et al., 1993). In Abhängigkeit von der Konfiguration oder Größe des Knochendefekts besteht die Gefahr, dass die Membran in das Wundgebiet kollabiert und somit den für den Regenerationsprozess benötigten Raum limitiert. Um dieser Komplikation entgegenzuwirken hat man die Formstabilität als weitere Anforderung an GBR/GTR-Membranen gestellt.

Im Zusammenhang mit GTR und GBR wird auch auf die Wichtigkeit einer frühzeitigen Angiogenese des Defektraumes hingewiesen. In einer tierexperimentellen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Blutkapillaren in einer unmittelbaren räumlichen sowie zeitlichen Korrelation zu einer extraskelletalen Knochenneubildung standen (Schmid et al., 1997). Diese Beobachtung kann mit Hilfe des Prinzips der Knochenbildung erklärt werden: Osteogene Zellen entwickeln sich aus undifferenzierten mesenchymalen Progenitorzellen, die sich entweder im Bindegewebe des Knochenmarks befinden, oder sich aus Perizyten des angrenzenden Bindegewebe kleiner Blutkapillaren entwickeln (Long et al., 1995; Rickard et al., 1996; Reilly et al., 1998). Auf Grund dieser Untersuchungen könnte man schlussfolgern, dass eine frühzeitige transmembranöse

Vaskularisation, welche eine Anastomose zwischen der Blutversorgung des angrenzenden Mukoperiostlappens und dem Wundgebiet herstellt, die Knochenneubildung positiv beeinflusst. Aus klinischer Sicht wird diese Hypothese auch durch die Tatsache unterstützt, dass einige Autoren eine Perforation des angrenzenden kortikalen Knochens während GBR/GTR-Verfahren empfehlen, um die Knochenneubildung über eine Eröffnung angrenzender Knochenmarksräume zu verbessern (Buser et al., 1990; Schmid et al., 1994). Eine solche Perforation scheint gerade im kompakten Kiefer das Aussprossen von Gefäßen zu erleichtern und die Regeneration zu verbessern (Simion et al., 1994; Jovanovic et al., 1995). So zeigten im Tierversuch perforierte, blutgefüllte Defekte nach GBR eine signifikant bessere Knochenregeneration als nicht perforierte Kontrolldefekte (Rompen et al., 1999). Bisher existieren jedoch noch keine experimentellen Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss der transmembranösen Angiogenese auf den Heilungsverlauf befassen haben.

Als weitere Anforderungen an Membranen lassen sich deren praktikables klinisches Handling, der histologische Nachweis der Regeneration sowie die erfolgreiche klinische Testung in prospektiven randomisierten klinischen Studien stellen. Weiterhin sollte vor dem Einsatz eines Biomaterials auf die Zulassung nach dem Medizinproduktegesetz geachtet werden.

1.3 Struktur und charakteristische Eigenschaften von Kollagen

Kollagenfasern sind stabile Fasern des extrazellulären Bindegewebes, die aus Kollagenfibrillen aufgebaut sind. Innerhalb einer Fibrille sind drei Peptidketten schraubenförmig zu einer Tripelhelix verdrillt. Die unverzweigten Fasern sind sehr zugfest und nur zu ca. 5 % dehnbar. Je nach Primärstruktur der Peptidketten existieren mindestens 19 unterschiedliche Kollagen-Varianten. In kochendem Wasser sind sie löslich und bilden Leim, woher sich ihr lateinischer Name ableitet (kolla = Leim). Sie quellen nach Zugabe von Säure, lösen sich in Laugen auf und lassen sich durch Pepsin rasch verdauen.

Für einen möglichen Einsatz von Kollagen als Barrieremembran spricht die Tatsache, dass Kollagen an sich bereits eine strukturelle Komponente des parodontalen Ligaments darstellt und eine aktive Rolle bei der Ausbildung eines Blutkoagulums spielt (hämostatische Eigenschaft). Hierdurch wird eine frühzeitige Stabilisation des Wundbereichs unterstützt. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass

Kollagen chemotaktisch auf desmodontale Fibroblasten wirkt (Gewebeintegration) und semipermeable Eigenschaften aufweist (transmembranöse Angiogenese) (Postlethwaite et al., 1978; Yaffe et al., 1984; Hutmacher et al., 1996; Locci et al., 1997). Ein Nachteil nativen Kollagens ist jedoch dessen geringe Stabilität aufgrund einer raschen Biodegradation durch gewebespezifische Proteasen, Kollagenasen und Makrophagen (Tatakis et al., 1999).

Die häufigsten Kollagentypen sind I, II und III, wobei das gingivale Bindegewebe zu ca. 60 % aus Typ I-Kollagen aufgebaut ist. Alle derzeit verfügbaren Kollagenmembranen für GBR/GTR-Verfahren werden überwiegend aus bovinem und porkinem Kollagen Typ I und III gewonnen. Als bovines Ursprungsgewebe des Kollagens Typ I dient zum einen die Achilles-Sehne und zum anderen das Perikard. Das Ursprungsgewebe des porkinen Kollagens Typ I und III wird von Seiten des Herstellers nicht genannt.

1.4 Abbaumechanismen verfügbarer Kollagenmembranen

Der Abbau kollagener Membranen erfolgt primär enzymatisch durch gewebespezifische Proteasen und Kollagenasen (Tatakis, Promsudthi et al., 1999). Weiterhin scheinen bei der Resorption von nativem und quervernetztem Kollagen in geringem Umfang auch polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen beteiligt zu sein (Zhao et al., 2000). In einer in-vitro Untersuchung wurde beobachtet, dass die Adhärenz der parodontopathogenen Markerkeime *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola* an native Kollagenmembranen signifikant höher war als an PTFE und ePTFE (Sela et al., 1999). In einer weiteren in-vitro Untersuchung konnte gezeigt werden, dass einige dieser Bakterien in der Lage sind, eigene Kollagenasen zu bilden (Sela et al., 2003). Durch die enzymatische Aktivität von *Porphyromonas gingivalis* wurden sowohl natives als auch glutaraldehyd-quervernetztes Kollagen aufgelöst. *Treponema denticola* war lediglich in der Lage, native Membranen enzymatisch zu spalten. Der wohl aggressivste Markerkeim *Actinobacillus actinomycetemcomitans* konnte keine wirksamen Kollagenasen gegen native und quervernetzte Membranen produzieren (Sela, Kohavi et al., 2003).

Aus klinischer Sicht scheinen bestimmte parodontopathogene Bakterien insbesondere nach Exposition an der Biodegradation kollagener Membranen beteiligt zu sein. Zur Mundflora exponierte Membranen

unterliegen einer deutlich beschleunigten Resorption. Im Falle einer enzymatisch quervernetzten Membran konnte bereits nach vier Wochen eine vollständige sekundäre Granulation über der Schleimhautdehiszenz beobachtet werden (Friedmann et al., 2001). Die Exposition der Membran schien histologisch keinen negativen Einfluss auf die Knochenregeneration zu haben (Friedmann et al., 2002).

Um einer potenziellen Kontamination des Wundbereichs grundsätzlich entgegenzuwirken, wurde eine Kombination von GBR/GTR-Membranen mit antibakteriellen Wirkstoffen vorgeschlagen. Die Ergebnisse einer in-vitro Untersuchung konnten zeigen, dass mit Chlorhexidin Digluconat (CHX) benetzte Membranen einen inhibitorischen Effekt auf *Actinobacillus actinomycetemcomitans* hatten, während in Abhängigkeit von der verwendeten CHX-Konzentration das Attachment humaner PDL-Fibroblasten nicht negativ beeinflusst wurde (Chen et al., 2003).

1.5 Quervernetzung und Auswirkungen auf die Biokompatibilität

Um die Barrierefunktion und Formstabilität kollagener Membranen zu optimieren, werden unterschiedliche Verfahren zur Quervernetzung eingesetzt. Diese reichen von physikalischen Behandlungen mittels Druck, Temperatur und UV-Licht über chemische Verfahren wie Behandlung mit Glutaraldehyd, Diphenylphosphorylazid oder Hexamethylen-diisocyanat bis hin zur enzymatischen Quervernetzung über Polysaccharide (Kodama et al., 1989; Minabe et al., 1989; Quteish et al., 1992; Brunel et al., 1996; Zahedi et al., 1998; Bunyaratavej and Wang, 2001). Die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen konnten zeigen, dass die Resorption quervernetzter Membranen signifikant langsamer verläuft als die nicht-quervernetzter Membranen (Pitaru et al., 1988; Paul et al., 1992; von Arx et al., 2005). Weiterhin lässt sich die Resorptionsdauer mit zunehmendem Vernetzungsgrad proportional steigern (Brunel, Piantoni et al., 1996). Bisher existieren nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Fragestellung der Biokompatibilitätstestung verschiedener nativer und quervernetzter Kollagenmembranen in der Zellkultur beschäftigt haben (Takata et al., 2001a; Takata et al., 2001b; Wang et al., 2002). Takata et al. (2001a) untersuchten Attachment, Proliferation und Differenzierung von PDL-Fibroblasten aus Ratten. Hierbei wurde beobachtet, dass das initiale Zellattachment nach 1,5 h auf einer mit Glutaraldehyd quervernetzten bovinen Typ I

Kollagenmembran im Vergleich zu einer nativen bovinen Typ-I-Kollagenmembran, Polylaktid/Polyglykolid- oder ePTFE-Membran signifikant reduziert war. Die Zellproliferation wurde jedoch nicht negativ beeinflusst. Wang et al. (2002) evaluierten das Attachment von Maus-Osteoblasten (MC3T3-E1-Osteoprogenitor-Zellen) auf Membranen nach 1,5 und 24 h. Eine Zellulose-Ester-Mixtur zeigte ein statistisch signifikant höheres Zellattachment als die untersuchten Membranen der Testgruppen. Hier betrug die mittlere Zellzahl pro mm² nach 1,5 h $27,5 \pm 2,1$ und nach 24 h $67,6 \pm 3,6$, wohingegen die mittlere Zellzahl pro mm² für das glutaraldehydvernetztes Kollagen nach 1,5 h $14,5 \pm 1,4$ und $15,4 \pm 0,9$ nach 24 h betrug. Demnach konnte keine Zellproliferation auf dem glutaraldehydvernetztem Kollagen festgestellt werden (Wang et al., 2002). Takata al. (2001b) beurteilten den biologischen Effekt verschiedener GBR/GTR-Membranen auf die Migration von Maus-Osteoblasten (MC3T3-E1-Osteoprogenitor Zellen). Es wurde beobachtet, dass eine glutaraldehydvernetzte Membran, eine native Typ-I-Kollagenmembran und eine Zellulose-Ester-Membran eine vergleichbare Zellmigrationsrate aufwiesen wie die positive Kontrolle (Plastikoberfläche der Zellkulturplatte). Im Gegensatz hierzu zeigte eine porcine Typ I und III Kollagenmembran nach fünf Tagen die signifikant geringste Zellmigration (Takata, Wang et al., 2001).

1.6 Biodegradation und Angiogenese

Bisher liegen nur wenige Daten aus kontrollierten tierexperimentellen Untersuchungen vor, die einen Anhaltspunkt für den Mechanismus der Biodegradation und transmembranösen Angiogenese der hier vorgestellten Kollagenmembranen geben können. Die Arbeitsgruppe von Zhao et al. beobachteten erste Resorptionen einer porcinen nativen Kollagenmembran nach subkutaner Implantation im Rattenmodell bereits nach vier Tagen. Über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen wurde eine deutliche Fremdkörperreaktion um das implantierte Kollagen beschrieben (Zhao, Pinholt et al., 2000). In einer weiteren Untersuchung wurde die Resorption dieser Membran im Hundemodell nach palatinaler Implantation über einen Beobachtungszeitraum von vier Monaten untersucht (Owens et al., 2001). Die histologische Auswertung zeigte bereits nach vier Wochen mittelstarke

Resorptionserscheinungen, jedoch ohne Anzeichen einer Fremdkörperreaktion. Nach drei Monaten war die Membran vom umliegenden Gewebe nicht mehr zu unterscheiden (Owens and Yukna, 2001).

1.7 Studiendesign und Hypothese

Es existiert eine Vielzahl im Handel erhältlicher Kollagenmembranen, die sich hinsichtlich ihres Ursprungsgewebes, aber auch ihres Herstellungsmechanismus und Quervernetzungsgrades deutlich unterscheiden. Betrachtet man die aktuelle Literatur, so wurden diese jedoch nur partiell oder in sehr unterschiedlich strukturierten Studien untersucht. Eine großzügig angelegte Vergleichsstudie, welche die verfügbaren Membranarten sowohl in-vivo als auch in-vitro miteinander vergleicht, liegt nach unserem besten Wissen bislang weder auf nationaler noch auf internationaler Publikationsebene vor. Ziel dieser Untersuchung war daher, verschiedene im Handel erhältliche Membranen auf die Aspekte morphologischer Aufbau, Biokompatibilität, Resorptionsmechanismus und -stabilität, entzündliche Reaktion, Gewebeintegration und Angiogenese in-vitro und in-vivo zu untersuchen. Hierbei wurde hypothetisch angenommen, dass jede einzelne Membran nur eine Kompromisslösung aus den vielen bereits angeführten Idealanforderungen darstellen kann.

Zudem sollte in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) eine neuartige quervernetzte Kollagenmembran entwickelt werden, welche auf der einen Seite die positiven Eigenschaften einer nativen Bilayerstruktur mit interkonnektierendem Porensystem aufweist, andererseits jedoch als Folge einer speziellen chemischen Quervernetzung einem verzögerten Resorptionsmechanismus ohne Beeinflussung der Biokompatibilität unterliegt. Das vom Hersteller streng geheim gehaltene Quervernetzungsverfahren wurde zunächst in den in-vitro Experimenten auf eine negative Beeinflussung der Biokompatibilität überprüft. In den in-vivo Untersuchungen fanden zudem Testmembranen ansteigender chemischer Vernetzung Verwendung, um speziell den Einfluss des Quervernetzungsgrades auf Biodegradation und Angiogenese zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

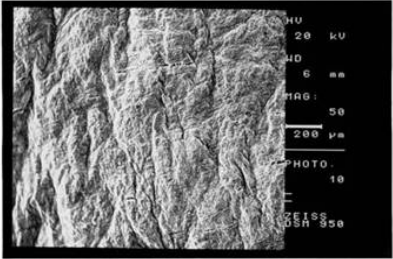
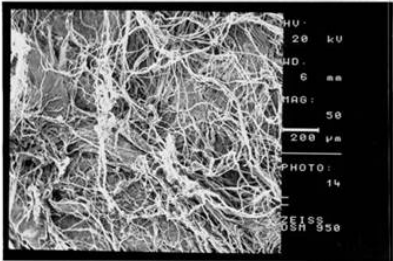
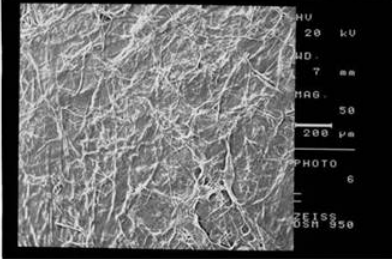
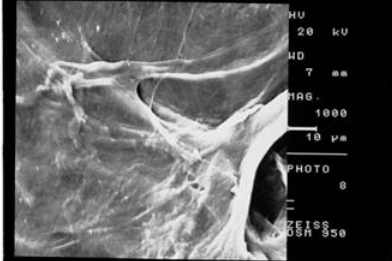
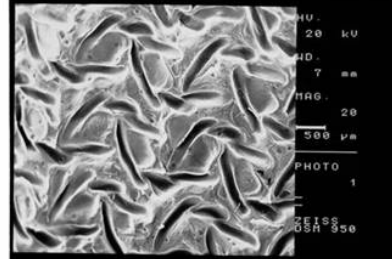
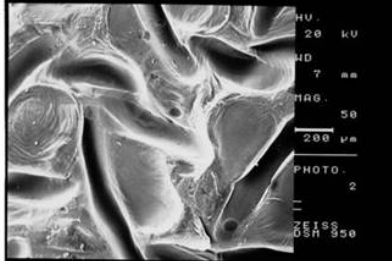
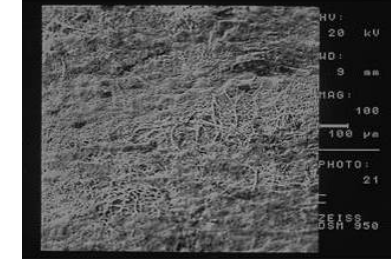
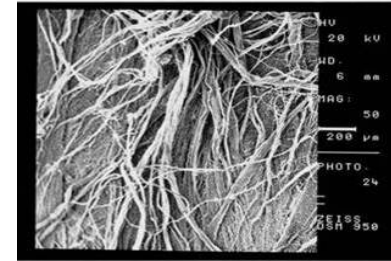
Entsprechend des unterschiedlichen Versuchsdesigns ist die vorliegende Arbeit in verschiedene Abschnitte zu gliedern. Zunächst wurden die unterschiedlichen nativen und quervernetzten Membranen in der Zellkultur auf ihre Biokompatibilität und ihren Einfluss auf die Proliferation von Fibroblasten und knochenähnlichen Zellen untersucht (In-vitro Studie I). Der Einfluss auf humane Endothelzellen wurde ebenfalls untersucht, um Aufschlüsse über angiogenetische Aspekte innerhalb der Membrankörper zu erhalten (In-vitro Studie II). Im weiteren Verlauf wurden die Membranen subkutan in Ratten implantiert und nach unterschiedlichen Zeiträumen entnommen. Hierdurch sollte der zeitliche Verlauf der Biodegradation und der Gewebeintegration sowie der zellulären Reaktion bestimmt werden (In-vivo Studie). Wie sich in der Auswertung herausstellte, unterschieden sich die Membranen hierbei besonders hinsichtlich der zu den einzelnen Zeitpunkten im Membrankörper nachweisbaren Blutgefäße. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Schritt speziell die Blutgefäße innerhalb der Membrankörper immunhistochemisch angefärbt und morphometrisch erfasst.

2.1 Untersuchungsmaterial

Gegenstand der Untersuchung waren vier im Handel erhältliche Membranen (1) BioGide® (BG) (nicht-quervernetztes porkines Typ I und III Kollagen), (2) BioMend® (BM) (Glutaraldehyd-quervernetztes bovines Typ I Kollagen), (3) Ossix® (OS) (enzymatisch quervernetztes bovines Typ I Kollagen), (4) Tutodent® (TD) (nicht-quervernetztes bovines Typ I und III Kollagen) sowie die in Verbindung mit dem Hersteller des Produktes BioGide® experimentell modifizierte BG-Membran (5) VerNetzt (VN) (vierfach chemisch quervernetztes porkines Typ I und III Kollagen). Die VN-Membran wies zum einen die ursprüngliche offenporige Makro- und Mikrostruktur von BG auf, zum anderen war sie auf chemischem Wege quervernetzt, um eine längere Barrierefunktion zu gewährleisten.

Die untersuchten Membranen unterschieden sich weiterhin hinsichtlich ihres Ursprungsgewebes und Herstellungsverfahrens, ihrer Makro- und Mikrostruktur und/oder ihres Quervernetzungsgrades (siehe Tab. 2).

Tabelle 2 Untersuchte Kollagenmembranen

Produktname	BioGide®/BioGidePerio® (BG) Geistlich VerNetzt (VN)	BioMend® (BM) BioMend Extend® (BME)	Ossix® (OS)	Tutodent® (TD)
REM	 	 	 	 
Hersteller	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz	Zimmer Dental GmbH, Freiburg, Deutschland	3i, Colbar R&D Ltd., Ramat Husharon, Israel	Tutogen, Neunkirchen am Brand., Deutschland
Herkunft	porkin Typ I und III Kollagen k. A.	bovin Typ I Kollagen Achillessehne	bovin Typ I Kollagen Achillessehne	bovin Typ I Kollagen Perikard
Vernetzung	BG: nativ VN1: 1x, VN2: 3x, VN3: 4x chemisch experimentell	Glutaraldehyd	Polysaccharidinsertion	nativ
Struktur	bilayer offenporig	monolayer geschlossenporig	monolayer kompakt	bilayer kompakt

Zusätzlich kamen im Tierversuch weitere Prüfkörper zum Einsatz, die geringfügige Veränderungen der in-vitro untersuchten Membrankörper darstellten. So entsprach die BioMendExtend[®] (BME) einer modifizierten BioMend[®]-Membran (BM), bei der durch eine um 30 % höhere Membranstärke auf rein physikalischem Wege eine höhere Festigkeit und längere Barrierefunktion gewährleistet werden soll. Um selektiv den Einfluss des Grades der chemischen Vernetzung zu untersuchen, wurden zudem Zwischenstufen des VN-Herstellungsprozesses aufgenommen. VN1 entsprach einer einfach, VN2 einer dreifach quervernetzten BioGide[®]-Membran. VN3 hatte die Vernetzung vierfach durchlaufen und war somit mit der in-vitro untersuchten VN identisch.

2.2 In-vitro Studie I: Biokompatibilität

In diesem Teil der Studie wurden die Membranen BG, VN, BM, OS und TD mit humanen SaOs-2-Osteoblast-like-Zellen (SaOs-2) und primären humanen parodontalen Ligament (PDL)-Fibroblasten inkubiert und nach sieben Tagen die Proliferation und Morphologie der Zellen auf dem Kollagen analysiert.

2.2.1 Isolation der PDL-Fibroblasten

Die parodontalen Ligamentfibroblasten wurden mit Einverständnis einer 22jährigen Patientin aus dem Parodont eines ihr aus oralchirurgischer Indikation operativ entfernten Weisheitszahnes gewonnen. Die Präparation der Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Mailhot und Mitarbeitern aus dem Jahre 1995. Hierfür wurde der Zahn unmittelbar nach steriler Operationstechnik in DMEM-Zellkulturmedium gelagert und keimfrei ins Labor überführt. Unter der Sterilbank wurde mittels eines Einmalskalpells das Parodont des mittleren Wurzeldrittels abgeschabt und mit 2 ml Fibroblastenmedium in einer Petri-Schale ausgesät (Mailhot et al., 1995). Als Fibroblastenmedium diente eine Mischung aus DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium, Cambrex Bio Science, Vervies, Belgien), 15 % FKS (Fetales Kälberserum, Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) und 1 % Penicillin/Streptomycin (im Folgenden als Pen/Strep abgekürzt, Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Die Kultivierung erfolgte standardisiert bei 5 %-iger CO₂-Konzentration,

gesättigter Luftfeuchtigkeit und 37 Grad Celsius im Brutschrank. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen aus den Ligamentsplittern ausgewachsen waren und auf dem Petrischalenboden konfluent erschienen. Nach Ablösen der Zellen mittels EDTA (Cambrex Bio Science, Vervies, Belgien) in einer finalen Konzentration von 0,1g/l in PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) wurden diese im Verhältnis 1:4 wiederholt gesplittet und für die folgenden Versuche in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2 SaOs-2-Osteoblast-like-cells

Bei den SaOs-2-Osteoblast-like-cells handelt es sich um eine Osteosarkomzelllinie, welche trotz maligner Transformation die wesentlichen Eigenschaften von primären Osteoblasten beibehalten hat (Murray et al., 1987; Rodan et al., 1987). Sie ist jedoch im Gegensatz zu primären Osteoblasten immortal und wurde in der Vorbereitung der Studie bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Braunschweig) unter der Nummer ACC 243 käuflich erworben. Als Kulturmedium der auch hier vor dem eigentlichen Experiment durchgeführten Zellvermehrung diente SaOs-2-Medium, definiert als McCoy's 5A Eagles Medium (Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe), versetzt mit 15 % FKS und 1 % Pen/Strep.

2.2.3 Zellkultur

Achtzehn Proben einer jeden Membran wurden mit einer sterilen Schere auf einen Durchmesser von 10 mm getrimmt und für 15 Minuten mit PBS gewaschen. Um ein Aufschwimmen der Membranen vom Zellboden zu vermeiden, wurden die Proben in einem Ringsystem (Minusheet® No 1300, Minucells and Minutissue GmbH, Bad Abbach) fixiert (Abb. 4a) und 24-Well-Zellkulturplatten (Lab



Abb. 4a: Minusheet®-Ringe



Abb. 4b: 24-Well-System

Tek Chamber Slide, Nalge Nunc, Wiesbaden) eingebracht (Abb. 4b). Als Kontrollgruppe dienten die Kunststoff-Zellkulturoberflächen leer gelassener Wells ohne Membran (Culture Dish, CD).

Es erfolgte eine Beimpfung der Proben mit

1. humanen PDL-Fibroblasten (4. Passage, 2×10^4 Zellen in 2 ml Fibroblastenmedium) (n=54)
oder
2. humanen SaOs-2-Osteoblast-like-cells (6. Passage, 2×10^4 Zellen in 2 ml SaOs-2-Medium)
(n=54).

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank standardisiert bei 5 %-iger CO_2 -Konzentration, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 37 Grad Celsius. Das Medium wurde am 3. und 5. Tag gewechselt. Am 7. Tag wurden die Proben mit PBS gespült, um nicht-adhärenente Zellen von der Oberfläche zu entfernen. Anschließend wurden die Membranhalter entfernt und die Wells je nach weiterer Verwendung mit 2 ml Paraformaldehyd- oder 2 ml Glutaraldehyd-Lösung fixiert.

2.2.4 Quantitative Analyse

Nach einstündiger Fixierung mit 10 %-igem gepufferten Paraformaldehyd wurden die Proben der quantitativen Analyse mit einer 10-fach verdünnten Hämatoxylin-Lösung für 10 Minuten gefärbt, in Leitungswasser gebläut und zwischen zwei Glas-Objektträger in wässriger Umgebung eingebracht. Anschließend wurden die Zellen im Auflichtmikroskop (Leitz Orthoplan, Leitz, Wetzlar) bei 200-facher Vergrößerung von einem hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit geblindeten Untersucher ausgezählt. Hierbei sorgte ein in das Strahlenfeld eingebrachtes Raster von exakt $0,25 \text{ mm}^2$ für eine Standardisierung des Zählareals. Nach Auszählen von sechs zufällig ausgewählten Arealen je Membranprobe wurde die durchschnittliche Zellzahl pro mm^2 berechnet. In jeder Gruppe und Zelllinie kamen sechs Proben zur Auswertung.

2.2.5 Morphologische Analyse

Nach 30-minütiger Fixierung mit 4 %-igem PBS-gepufferten Glutaraldehyd (pH 7,4) wurden jeweils drei Proben einer Gruppe und Zelllinie für 15 Minuten in PBS gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40 % bis 100 %, 10 %-Schritte) entwässert. Die Positivkontrollen wurden hierfür mittels einer diamantierten Säge aus dem Wellsystem herausgetrennt. Anschließend wurden die Proben zweimal für 15 Minuten in Hexamethyldisilazan (HMDS) gewaschen und luftgetrocknet. Nach Besputterung mit Gold erfolgte die ebenfalls geblindete morphologische Beurteilung der auf der Oberfläche adhärenen Zellen im Rasterelektronenmikroskop (DSM 950, Zeiss, Deutschland).

2.2.6 Statistische Analyse

Zur Berechnung der Statistik diente das Statistikprogramm SPSS (SPSS 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Nach Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen kam zum Vergleich der Gruppen ein nicht-parametrisches Testverfahren (Wilcoxon-Test) zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ definiert.

2.3 In-vitro Studie II: Endothelzellproliferation und -invasion

In diesem Teil der Studie wurden die Membranen BG, VN, BM, OS und TD mit humanen umbilikalen Venen-Endothelzellen (HUVEC) inkubiert und die Zellzahl auf den Oberflächen nach 1, 3 und 7 Tagen bestimmt. Zudem wurden histologische Schnitte der Membranen nach sieben Tagen Inkubation angefertigt, um die Invasion und das Wachstumsmuster der Zellen innerhalb der Membranstruktur zu beurteilen.

2.3.1 Isolation der HUVEC-Zellen

Die Isolation der HUVEC-Zellen erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von Jaffe et al. aus dem Jahre 1973, welches sich an der Erstbeschreibung von Muruyama et al. (1963) orientiert. Dabei werden die endothelialen Zellen mittels Kollagenaseablösung aus frischen Umbilikalvenenabschnitten gewonnen (Maruyama, 1963; Jaffe et al., 1973).

Unmittelbar nach der Geburt wurde eine frische Nabelschnur scharf von der Plazenta abgetrennt und in einer sterilen Nabelschnur-Pufferlösung (0,14 M NaCl; 0,004 M KCL; 0,001 M Phosphatpuffer und 0,011 M Glucose bei einem pH-Wert von 7,4) bei 4° C gelagert. Alle Manipulationen erfolgten unter streng sterilen Kautelen; Transport- und Aufbewahrungszeiten betrugen weniger als eine Stunde. Die Nabelschnur wurde im Labor unter der Sterilbank inspiziert, durch Klemmen beschädigte Anteile entfernt und in etwa 10 cm lange Stücke mit einer Schere geteilt. Die Kanalisierung der beiden Umbilikalvenen erfolgte mittels zweier stumpfer 14-Gauge-Sonden. Diese wurden nach erfolgreicher Sondierung etwa 2 cm innerhalb der Vene belassen und mit sterilen Klemmen fixiert. Die in den Umbilikalvenen enthaltenen Blutkoagel wurden durch mehrfaches Spülen mit 20 ml PBS-Lösung aus den Blutgefäßen entfernt. Es folgte die Sondierung der gegenüberliegenden Seite ebenfalls mittels 14-G-Sonden, an deren offenem Ende ein Polyethylenröhrchen befestigt wurde. Nach Verschluss dieser distalen Ableitungen mit Arterienklemmen wurden 10 ml einer 0,2 %igen Kollagenase-Lösung (CLS, Worthington Biochemical Corp, Freehold, NJ, USA) in die Umbilikalvenen injiziert und das proximale Ende ebenfalls mit Klemmen verschlossen. Anschließend wurden die Nabelschnurabschnitte in 37° warmer Pufferlösung für 15 Minuten inkubiert. Die auf diesem Wege enzymatisch von der Venenwand abgelösten Zellen wurden durch vorsichtige Perfusion von 30 ml MI99-Zellkulturmedium (Sigma, Missouri, USA) in ein distal angeschlossenes 50 ml Falcon-Tube ausgespült. Die Lösung wurde mit 10 ml FKS versetzt und bei 250 g für 10 Minuten sedimentiert. Nach Entfernung des Überschusses erfolgte die Resuspension der Zellen in 10 ml MI99. Nach erneuter Sedimentation in der Zentrifuge wurden die Zellen in 15 ml HUVEC-Medium überführt und gezählt. Als HUVEC-Medium diente eine Mischung aus ca. 75 % MI99, 20 % FKS, 0,4 % ECGS (10 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, Sigma, Missouri, USA), 3 % nicht-fraktioniertem Heparin (1000 IE/ml, Pfizer, West Ryde, NSW, Australia) und 1 % Pen/Strep. Es konnten im Mittel $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen je Ansatz gewonnen werden.

Zur Vermehrung der Zellen wurden zwei 75 ml Falcon-Zellkulturflaschen für 10 Minuten mit 0,1 %iger Gelatine beschichtet, mit 15 ml HUVEC-Medium-Zellsuspension beimpft und im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Zusatz inkubiert. Nach Erreichen eines konfluenten Zelllayers nach zwei bis vier Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet.

Hierfür wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit 1 %iger Trypsin/EDTA-Lösung für 1 Minute inkubiert, in Falcon-Tubes mit 5 ml FKS überführt und für 10 Minuten bei 250 g sedimentiert. Nach Entfernung des Überschusses erfolgte die Resuspension in 45 ml HUVEC-Medium und das Aussäen in ebenfalls Gelatine-beschichtete Zellkulturflaschen.

2.3.2 Zellkultur

Einundzwanzig Proben einer jeden Membran wurden auf einen Durchmesser von 1,2 mm getrimmt und in ein 96-Well-Zellkultursystem (Lab Tek Chamber Slide, Nalge Nunc, Wiesbaden) eingebracht. Die Membranen wurden mittels steriler, zurechtgeschnittener Kryo-Tube-Ringen am Wellboden fixiert und für 15 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte eine Beimpfung mit 2×10^3 HUVEC-Zellen/Well (4. Passage, 200 µl einer Lösung aus 10^4 Zellen/ml in HUVEC-Medium) (n=135). Als Positivkontrolle für die quantitative Analyse dienten 18 Wells ohne Membranen. Der Wellboden dieser Kompartimente wurde vor der Zellbeimpfung für 10 Minuten mit 0,1 %iger Gelatine beschichtet und ebenfalls mit Fixationsringen (ohne Funktion) versehen.

Die Zellkultur erfolgte für den Zeitraum von bis zu sieben Tagen im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Zusatz. Das Medium wurde für die 7-Tages-Gruppe am 3. und 5. Tag gewechselt. Am 1., 3. und 7. Tag wurden jeweils ein Drittel der Proben mit PBS gespült, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Fixationsringe entnommen und die Wells je nach weiterer Verwendung mit Trypsin/EDTA inkubiert oder mit Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

2.3.3 Histologische Analyse

Aus jeder Gruppe wurden drei 7-Tages-Proben für 2 Stunden in 10 %igem Paraformaldehyd in 0.15 molarem PBS (pH 7,4) fixiert und anschließend für 15 Minuten in PBS gespült. Die Einbettung der Proben in Paraffin erfolgte in histologischer Standardprozedur (Romeis, 1968). Die vertikal eingebetteten Membranen wurden in einem Mikrotom auf eine Schichtdicke von 7 µm geschnitten und mittels Hämatoxylin/Eosin (Romeis, 1968) gefärbt. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte im

Durchlichtmikroskop (BX 50, Olympus, Hamburg). Die in dieser Arbeit eingefügten Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Color View III, Olympus) in Verbindung mit einer Bildverarbeitungssoftware (analySIS FIVE docuS, Soft Imaging System, Münster) digital aufgenommen.

2.3.4 Quantitative Analyse

Die quantitative Analyse der auf den Membranen adhären Zellen erfolgte leicht modifiziert nach dem Protokoll von Breithaupt-Faloppa et al. (2006). Nach Entfernung der Fixierringe wurden jeweils sechs Proben einer jeden Gruppe mit PBS gespült, mit 200 µl einer 1 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung aufgefüllt und für drei Minuten im Brutschrank inkubiert. Hierdurch wurden die auf den Membranen adhären Zellen gelöst (Breithaupt-Faloppa et al., 2006). Die Erfassung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop. Hierbei wurde die Trypsinlösung im Well mehrfach mit einer sterilen Pipette durchmischt, im dreifachen Ansatz ein Volumen von 25 µl entnommen und auf die Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Anhand des Mittelwertes der Zellkonzentration der drei Messungen und des verwendeten Trypsin/EDTA-Volumens erfolgte schließlich die Berechnung der mittleren Zellzahl/Well (bzw. Membranprobe).

2.3.5 Statistische Analyse

Zur Berechnung der Statistik diente das Statistikprogramm SPSS (SPSS 12.0). Nach Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen kam zum Vergleich der Gruppen untereinander der nicht-parametrische Wilcoxon-Test zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ definiert.

2.4 In-vivo Studie: Biodegradation und Angiogenese

In diesem Teil der Arbeit wurden die zelluläre Reaktion und die Gewebeintegration sowie der zeitliche Verlauf der Biodegradation und der Gefäßeinsprossung von BG, BM, TD, OS und VN (hier: VN3) nach subkutaner Implantation in der Ratte untersucht. Vor Durchführung der Experimente

wurde das Vorhaben bei der Bezirksregierung beantragt und unter dem Aktenzeichen 50.05-230-1/03 durch das Regierungspräsidium Düsseldorf bewilligt.

Zusätzlich kamen zu den bereits in der Zellkultur untersuchten Membranen drei weitere Membranen als Modifikationen der in-vitro getesteten Materialien zum Einsatz:

1. BioMendExtend® (BME) als dickere BioMend®-Variante mit vom Hersteller proklamierter längerer Barrierefunktion und verzögertem Abbau.
2. VN1 (einfach quervernetzte BG) und
3. VN2 (dreifach quervernetzte BG).

Die im Tierversuch verwendete VN3 entsprach der VN-Membran aus den in-vitro Experimenten. Der Quervernetzungsprozess der VN-Membran bestand aus einer standardisierten Abfolge von chemischen Behandlungsschritten, die im Falle der VN (im Tierversuch: VN3) viermal wiederholt wurde. Die VN1 hatte diesen Schritt der Prozessierung nur einmal, die VN2 dreimal durchlaufen.

2.4.1 Tiermodell

Als Tiermodell wurde die subkutane Implantation in den Rückenbereich der Wistar-Ratte gewählt. Die Wistar-Ratte ist eine tierexperimentell sehr häufig verwendete Tierart und kann aufgrund ihrer Größe leicht und in ausreichender Anzahl mit geringem Aufwand gehalten werden. Insgesamt wurden 40 Ratten verwendet. Das Durchschnittsalter der Tiere betrug $3 \pm 0,5$ Monate, das mittlere Gewicht 350 ± 20 g. Entnahmezeitpunkte waren 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen, zu jedem Zeitpunkt gehörten 8 Tiere.

2.4.2 Vorbereitung der Implantate

Die Membranen wurden steril aus den Verpackungen entnommen, gefaltet und mit einer Schere auf eine achteckige Form von 2 cm Durchmesser getrimmt. Im Falle der

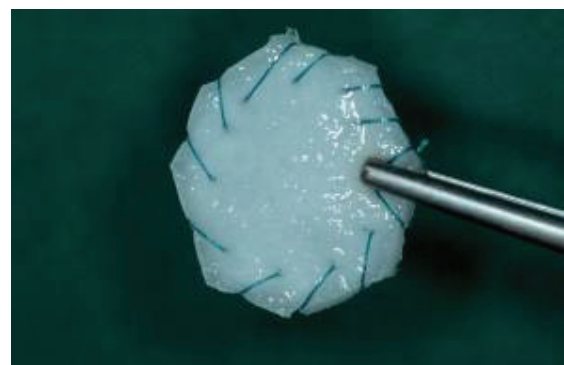


Abb. 5: Vorbereitung der Implantate

Bilayermembranen BG, VN1-3 und TD zeigte die glatte, zellokklusive Seite nach außen. Um eine beidseitige Resorption der Membran zu verhindern, wurde ein 3 µm dicker, nicht-resorbierbarer Polycarbonat-Spacer (Iso-pore[®], Millipore Corporate, Billerica, MA, USA) mittig eingelegt. Die Proben wurden mit nicht-resorbierbarer, gefärbter polyfiler Naht (Polyester 6/0, Resorba, Nürnberg) zirkulär vernäht (Abb. 5) und vor dem Einbringen in 0,9 %-iger isotonischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) rehydriert.

2.4.3 Chirurgisches Prozedere

Alle Eingriffe wurden unter intraperitoneal applizierter Allgemeinnarkose mit 9 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketanest[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe) und 5 mg/kg KG Xylazin (Sedaxylan[®], Pfizer Pharma GmbH) durchgeführt. Nach Applikation des Anästhetikums wurde eine Fläche von 8 x 4 cm auf dem Rücken der Tiere mittels eines elektrischen Rasierers und eines Rasiermessers enthaart und mit Polyvidon-Jod (Betaisodona[®], Mundipharma, Limburg/Lahn) desinfiziert. Nach Anbringen eines 2 cm langen Hautschnitts an der seitlichen rechten Thoraxwand wurden bei den auf dem Bauch liegenden

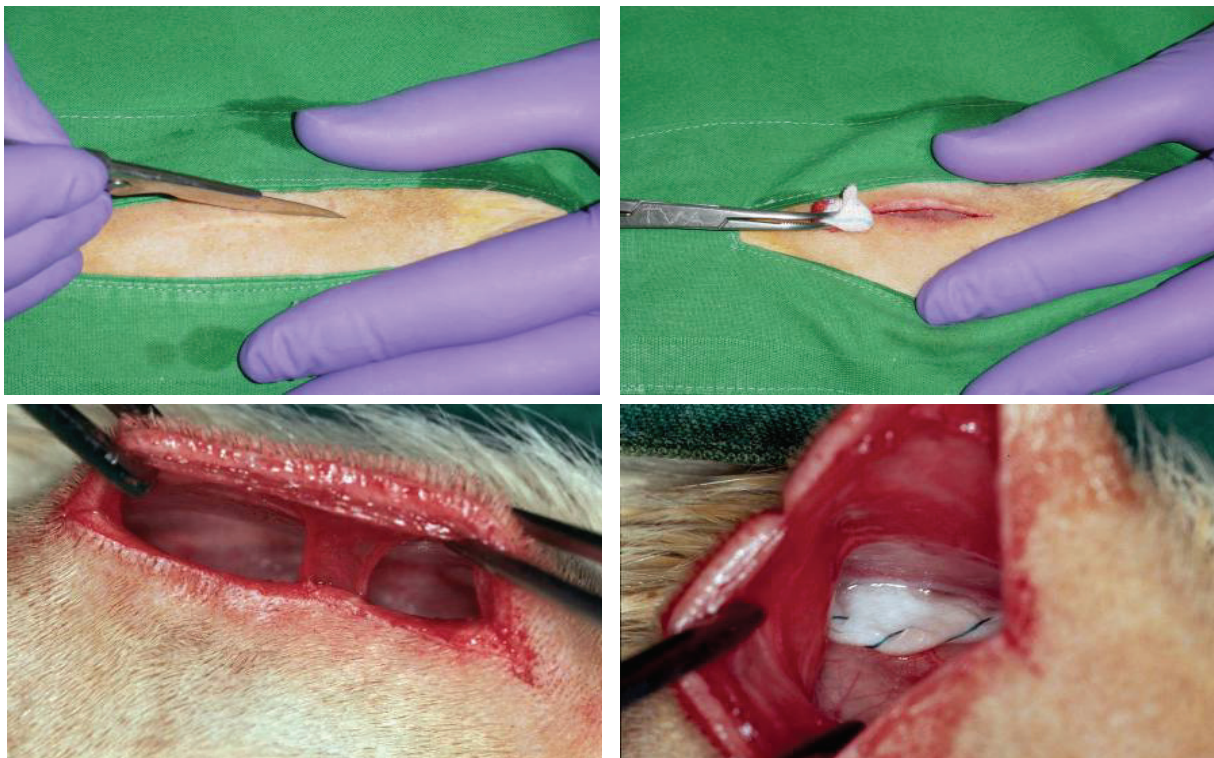


Abb. 6: Chirurgisches Prozedere

Tieren vier unabhängige subkutane Taschen von ca. 4 cm² stumpf auf der Muskelfaszie präpariert. Hierbei kamen jeweils 2 Taschen ipsilateral der Wirbelsäure (kaudal und kranial) und zwei weitere kontralateral (kaudal und kranial) zu liegen (Abb. 6).

Die vorbereiteten Implantate wurden entnahmeabhängig randomisiert in die resultierenden 160 Taschen eingebracht und mittels unresorbierbarer Naht (Polyester 6/0, Resorba) fixiert. Jedes Tier diente so der Testung von vier Proben, jede Membran kam pro Entnahmezeitpunkt viermal zum Einsatz. Die Haut wurde durch subkutane resorbierbare 4/0-Vicrylnähte (Resorba) gegen Zug gesichert und durch oberflächliche Naht mittels Polyester-3/0-Nähten (Resorba) verschlossen. Als Schmerzprophylaxe diente subkutan appliziertes Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer Pharma GmbH) in einer Dosierung von 4,5 mg/kg Körpergewicht. Es wurde intraoperativ sowie postoperativ für zwei Tage im Abstand von 24 Stunden verabreicht.

2.4.4 Entnahme der Proben

Nach einem Zeitraum von 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen wurden jeweils 8 Tiere mit CO₂ getötet. Die Implantate wurden mit dem umgebenden Gewebe entnommen und in 4 %igem Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte eine histologische Aufarbeitung und Anfärbung der Paraffinschnitte mittels Trichrom-Masson-Goldner-Färbung (Romeis, 1964) bzw. immunhistochemischer Analyse der Blutgefäßinvasion.

2.4.5 Histologische und histomorphometrische Auswertung

Die Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte im Durchlichtmikroskop (BX-50, Olympus). Neben einer allgemeinen Einschätzung der Gewebeintegration, zellulären Reaktion und Membranstruktur wurde unter Zuhilfenahme einer CCD-Kamera (Color View III, Olympus) und eines Bildverarbeitungsprogramms (analySIS FIVE docus, Soft Imaging System) an jeweils 12 randomisiert ausgewählten Stellen der zu diesem Zeitpunkt noch verbleibende Membrandurchmesser bei einer Originalvergrößerung von 100x vermessen. Es folgte die Berechnung des Mittelwertes für die jeweilige Membran und die statistische Auswertung der Einzelwerte in SPSS.

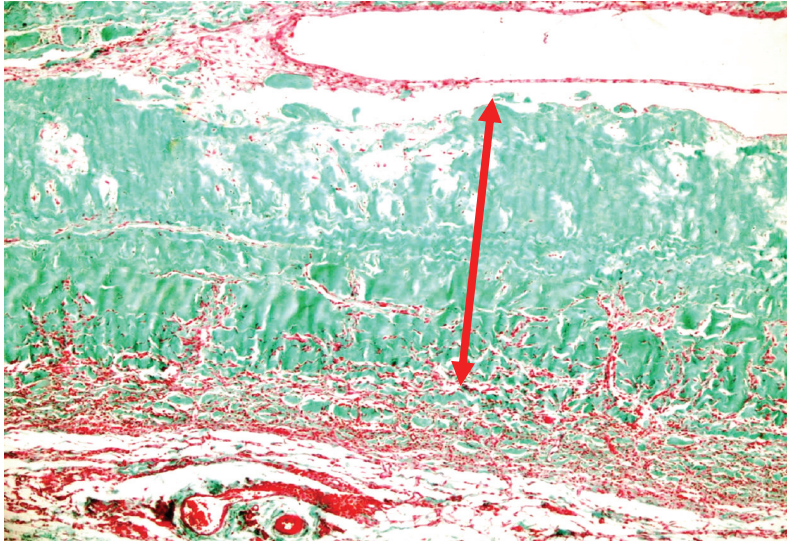


Abb. 7: Morphometrische Auswertung der Membrandurchmesser

2.4.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Daten diente das Statistikprogramm SPSS (SPSS 12.0). Nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorow-Smirnoff Anpassungstest kam eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für multiple Testung zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ definiert.

2.4.7 Immunhistochemische Auswertung

In einem zusätzlichen Ansatz wurden selektiv die innerhalb des Membrankörpers nachweisbaren Blutgefäße immunhistochemisch angefärbt und quantitativ erfasst. Hierfür wurde nach Deparaffinierung und Rehydrierung weiterer 5µm-Gewebsschnitte zunächst das Antigen Glutaminase II als charakteristischer Marker für Endothelzellen (Haroon et al., 1999; Buemi et al., 2004) durch 15-minütige Inkubation in 37°-warmer Demaskierungslösung (Dako Cytomation, Hamburg) freigelegt. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mittels 0,9 %iger H_2O_2 -Lösung in PBS (Merck) bei Raumtemperatur ausgeschaltet und nicht-spezifische Bindungsstellen durch 30minütige Inkubation mit Blockierlösung (Dako) abgesättigt. Nach 5minütiger Waschung in PBS erfolgte die Inkubation mit primären monoklonalen Mausantikörpern gegen Transglutaminase II (Labvision, Fremont CA, USA) in einer Verdünnung von 1:110 bzw. unspezifischen Antikörpern (Negativkontrolle) in einer

wasserdampfgesättigten Inkubationskammer bei Raumtemperatur (Haroon et al., 1999; Buemi et al., 2004). Nach anschließender erneuter Waschung in PBS wurden die Proben mit dem biotinmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Dako) in einer 1:60-Verdünnung für eine Stunde inkubiert. Nach Zusatz von Streptavidin-Peroxidase Lösung (1:300, Dako) für 15 min wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit dem Peroxidase-Substrat AEC (Dako) in einer Verdünnung von 1:300 inkubiert. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Zur histomorphometrischen Auswertung wurden drei Schnitte einer jeden Probe randomisiert ausgewählt und fotografiert. Die Auswertung der digitalen Bilder (Originalvergrößerung 100x) erfolgte mittels einer Bildverarbeitungssoftware (analySIS FIVE docuS, Soft Imaging System). Für jeden der Schnitte wurden vier randomisiert ausgewählte Areale des zu diesem Zeitpunkt noch nachweisbaren Membrankörpers identifiziert und in drei Anteile (inneres, mittleres und äußeres Layer) unterteilt. Hierbei wurde als äußeres Layer die zu dem Gewebe hin orientierte, als inneres Layer die Seite dem Polycarbonat-Spacer zugewandte Seite definiert. Im Falle der Bilayermembranen entsprach die äußere Seite somit der zelloklusiven (glatten) Seite. Für jedes Layer wurden die einzelnen immunhistochemisch markierten Blutgefäße sowie die Gesamtfläche vermessen (Abb. 8) und der prozentuale Anteil der Blutgefäßfläche im Vergleich zur Gesamtfläche errechnet.

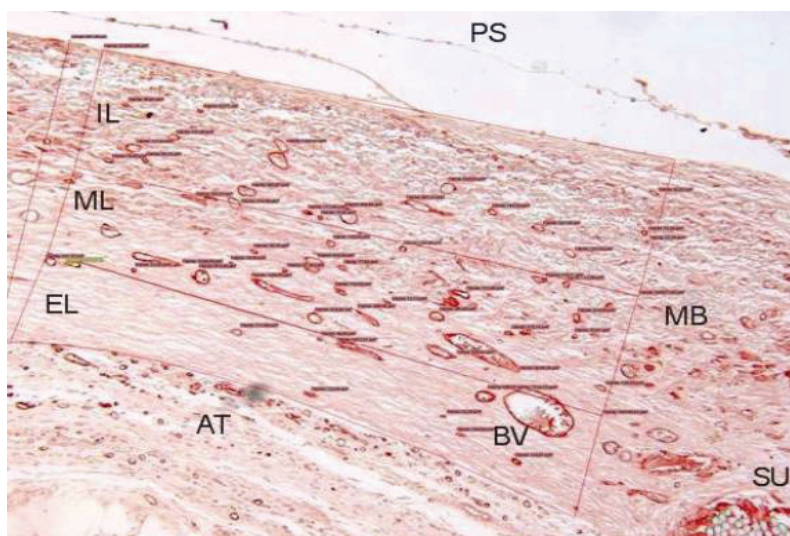


Abb. 8 : Morphometrische Auswertung der Blutgefäßdichte

IL/ML/EL: inneres/mittleres/äußeres Layer; BV: Blutgefäß; MB: Membrankörper; SU: Naht, AT: Bindegewebe
PS: Polycarbonate-Spacer

2.4.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Daten diente das Statistikprogramm SPSS (SPSS 12.0). Nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorow-Smirnoff-Anpassungstest kam eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für multiple Testung zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ definiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 In-vitro: Biokompatibilität

3.1.1 SaOs-2-Osteoblasten

3.1.1.1 Quantitative Analyse

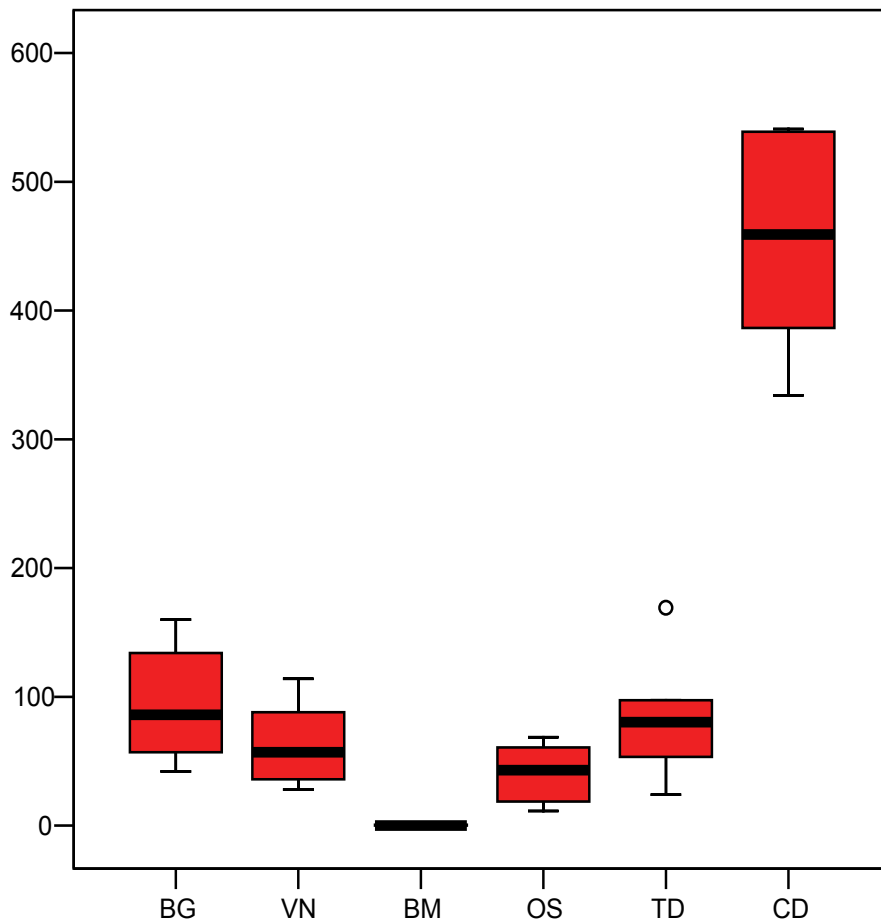


Abb. 9: Boxplots der ermittelten SaOs-2-Zellzahlen nach 7 Tagen Kulturdauer

Tabelle 3 Deskriptive Statistik der SaOs-2-Zellzahlen

	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
BG	10	42,00	160,00	94,17	45,71
VN	10	28,00	114,00	63,33	32,71
BM	10	0,00	1,32	0,33	0,55
OS	10	11,32	68,68	40,89	23,06
TD	10	24,00	169,20	84,08	49,10
CD	10	334,16	540,96	453,07	92,19

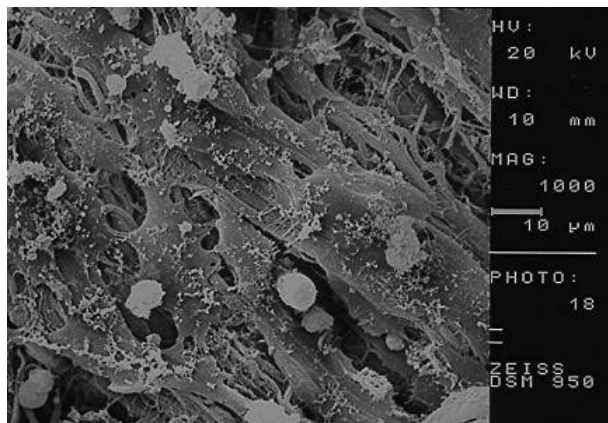
Abbildung 9 zeigt die deskriptive Statistik der ermittelten SaOs-2-Zellzahlen nach sieben Tagen Kulturdauer in Boxplot-Form. Auf der Ordinate sind die mittleren Zellzahlen je cm² Membranprobe aufgetragen, auf der Abszisse die einzelnen Gruppen. Die Mediane sind als dicke horizontale Linie innerhalb der 2. (unterer roter Kasten) und 3. Quartile (oberer roter Kasten) für die jeweilige Gruppe dargestellt. Die dünnen Linien oberhalb begrenzen das 1. Quartil und zeigen an der Spitze die Maximalwerte an. Die dünnen Linien unterhalb bilden das 4. Quartil und werden von den Minimalwerten begrenzt. Ausreisser sind als Stern oder Kreis aufgeführt. Einzelwerte und Standardabweichungen je Gruppe siehe Tabelle 3.

In der induktiven Statistik ergab sich durch nicht-parametrische Testung eine statistisch signifikant höhere Anzahl von SaOs-2-Osteoblasten auf der Kontrolloberfläche im Vergleich zu allen Kollagenmembranen ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test). BioGide[®] war der Ossix[®]-Membran zudem signifikant überlegen ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test). Die BioMend[®]-Membran zeigte im Vergleich zu allen anderen Kollagenen signifikant niedrigere Werte ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test).

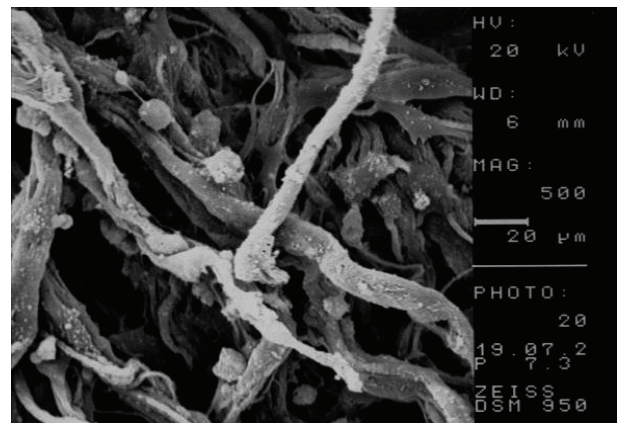
Die leichten Unterschiede zwischen den übrigen Membranen waren nicht signifikant ($P > 0,05$, Wilcoxon-Test); auch die chemisch vernetzte VN-Membran wies keinen Unterschied zu ihrem nicht vernetzten Gegenstück BioGide[®] auf.

3.1.1.2 Morphologische Analyse (REM)

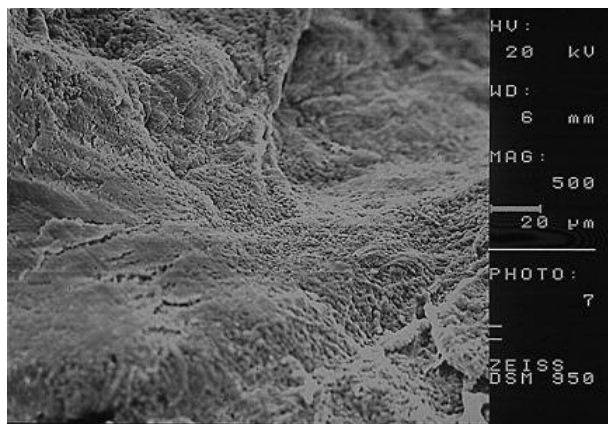
Die rasterelektronenmikroskopischen Auswertung offenbarte, dass die SaOs-2-Osteoblasten auf der Kontrolloberfläche vollständig auf dem Untergrund ausgebreitet waren und flach und mit weiten Ausläufern imponieren (Abb. 10f). BioGide[®], VN und Tutodent[®] zeigten ein sehr ähnliches Bild vieler kugelförmiger Zellen. Diese waren zum Teil perlschnurartig auf den Kollagenfasern der rauen Seite dieser Bilayermembranen aufgereiht (Abb. 10a, b, e). Die Ossix[®]-Membran zeigte eine vermehrt flache Zellmorphologie (Abb. 10d). Auf der BioMend[®]-Oberfläche waren auch nach genauer Abrasterung der Oberfläche keine Zellen nachweisbar (Abb. 10c).



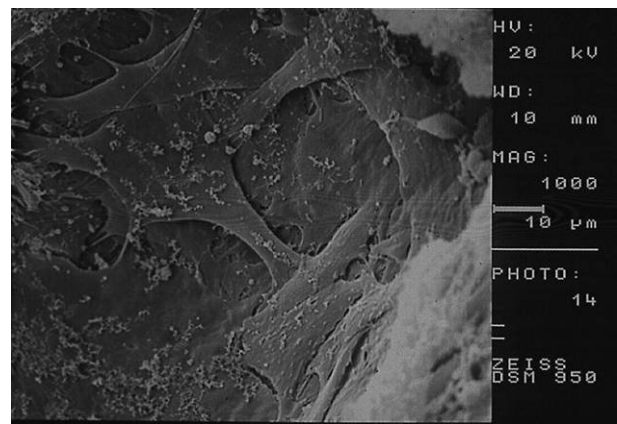
a. BioGide®



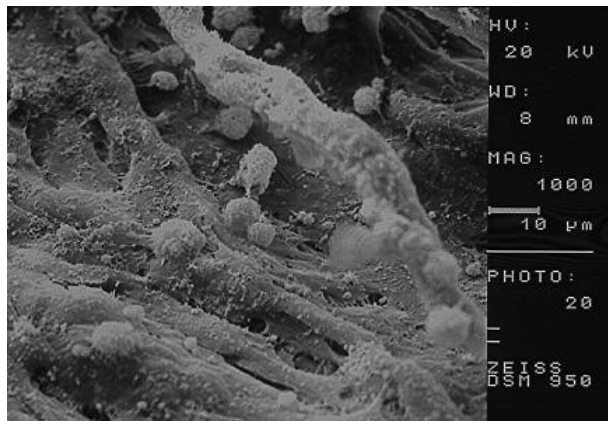
b. VN



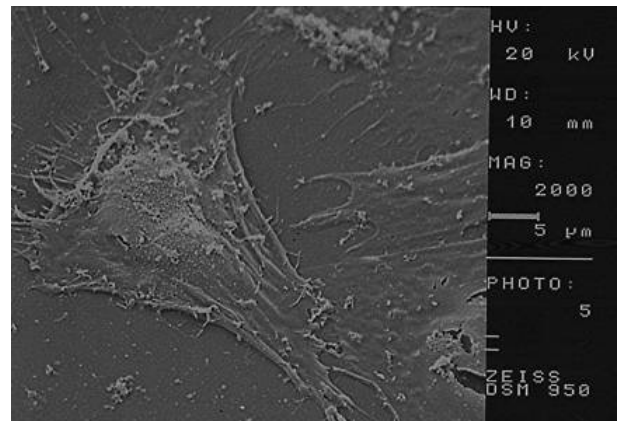
c. BioMend®



d. Ossix®



e. Tutodent®



f. CD (Kontrolle)

Abb. 10: Morphologische Beurteilung der SaOs-2-Zellen im REM

3.1.2 PDL-Fibroblasten

3.1.2.1 Quantitative Analyse

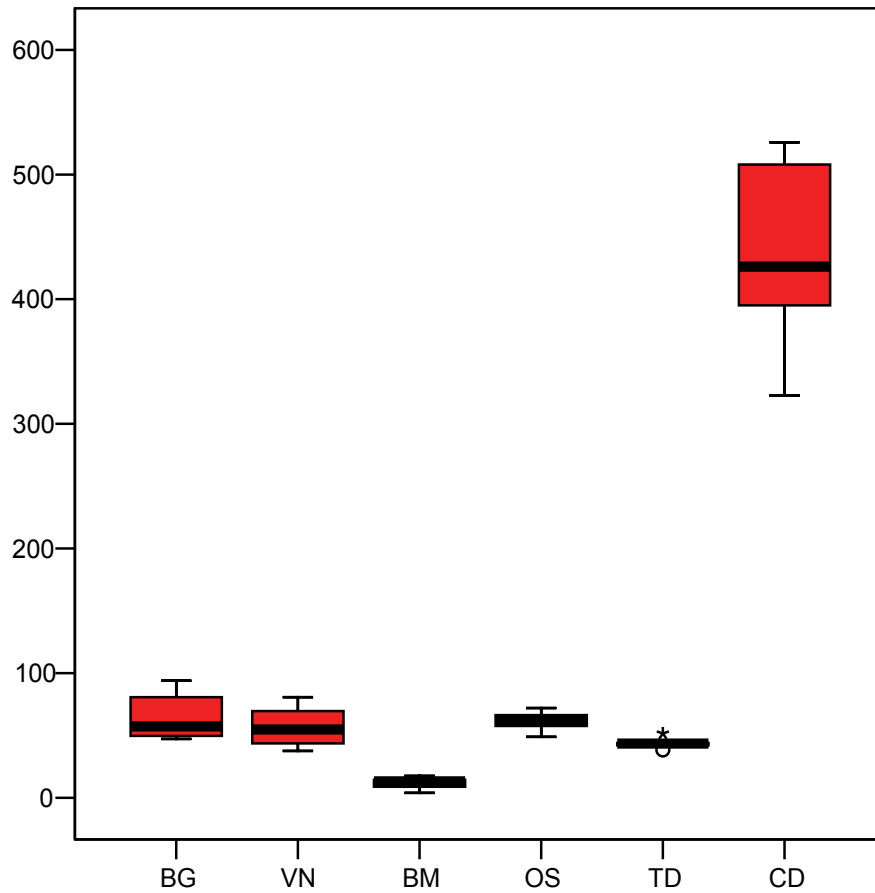


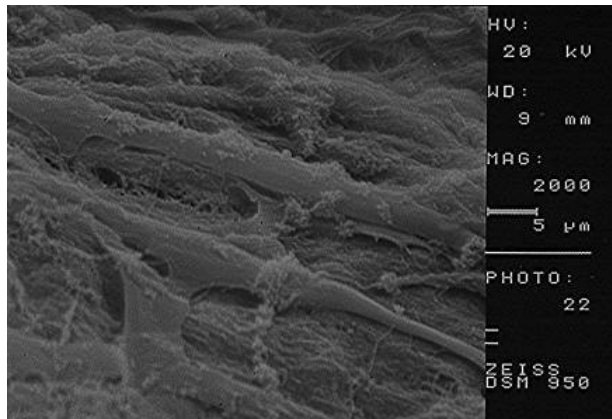
Abb. 11: Boxplots der ermittelten PDL-Zellzahlen nach 7 Tagen Kulturdauer

Tabelle 4 Deskriptive Statistik der PDL-Zellzahlen

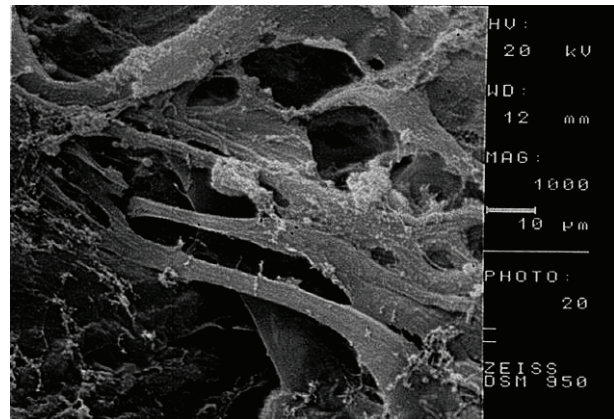
	Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
BG	10	47,20	94,00	64,33	18,82
VN	10	37,60	80,80	56,87	16,08
BM	10	4,00	17,60	11,87	4,78
OS	10	48,80	72,00	61,33	8,14
TD	10	38,40	51,60	43,80	4,33
CD	10	322,74	525,93	433,99	76,58

Abbildung 11 zeigt die deskriptive Statistik der ermittelten PDL-Zellzahlen nach sieben Tagen Kulturdauer in Boxplot-Form. Auf der Ordinate sind die mittleren Zellzahlen je cm² Membranprobe aufgetragen, auf der Abszisse die einzelnen Gruppen. Zur Erläuterung der Boxplot-Darstellung siehe Kap. 3.1.1.1. Einzelwerte und Standardabweichungen je Gruppe siehe Tabelle 4.

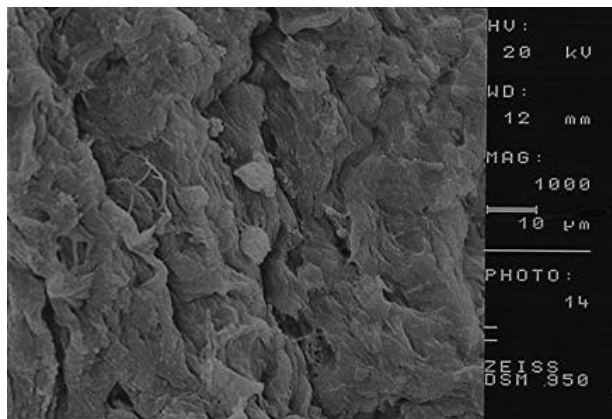
3.1.2.2 Morphologische Analyse (REM)



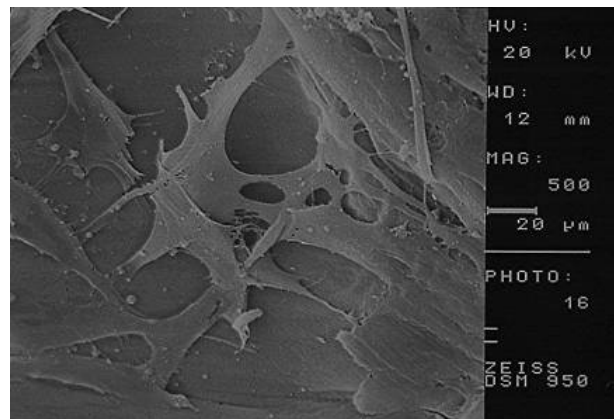
a. BioGide®



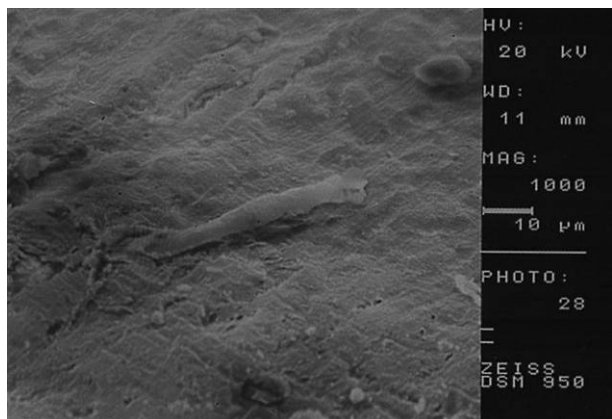
b. VN



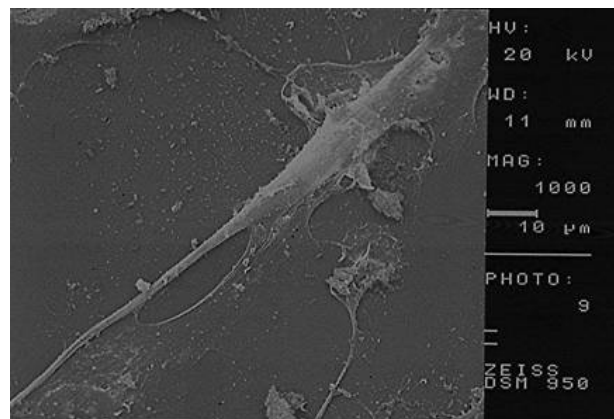
c. BioMend®



d. Ossix®



e. Tutodent®



f. CD (Kontrolle)

Abb. 12: Morphologische Beurteilung der PDL-Fibroblasten im REM

Die PDL-Fibroblasten auf der Kontrolloberfläche (Zellkulturkunststoff) imponierten spindelförmig (Abb. 12f) und waren in hoher Anzahl auf dem Wellboden anzutreffen. Zum großen Teil war eine Identifizierung einzelner Zellen nicht möglich, da sie auf weiten Anteilen des Wellbodens konfluent erschienen. Ebenso wie bei den SaOs-2-Osteoblasten war die Morphologie der PDL-Zellen auf der Oberfläche von BioGide® und VN der Kontrollgruppe ähnlich. So zeigten die BioGide® und VN eine hohe Anzahl spindelförmiger Zellen, welche die einzelnen Kollagenfasern der in diesem Fall „glatten“ und somit deutlich weniger mikrostrukturierten Oberfläche überspannten (Abb. 12a, b). Auffallend weniger Zellen waren auf der Tutodent®-Oberfläche anzutreffen, wobei eine Spindelform bei diesen Zellen nur angedeutet war (Abb. 12e). Ossix® zeigte eher flache Zellverbände, welche zum Teil die eingepressten Hohlräume überspannten (Abb. 12d). Im Gegensatz zu den anderen Membranen waren auf der BioMend®-Membran nur vereinzelte Zellen nachweisbar. Diese waren kugelförmig und zeigten keine Anzeichen einer Ausbreitung auf der Oberfläche (Abb. 12c).

3.2 In-vitro: Endothelzellproliferation und –invasion

3.2.1 Quantitative Analyse

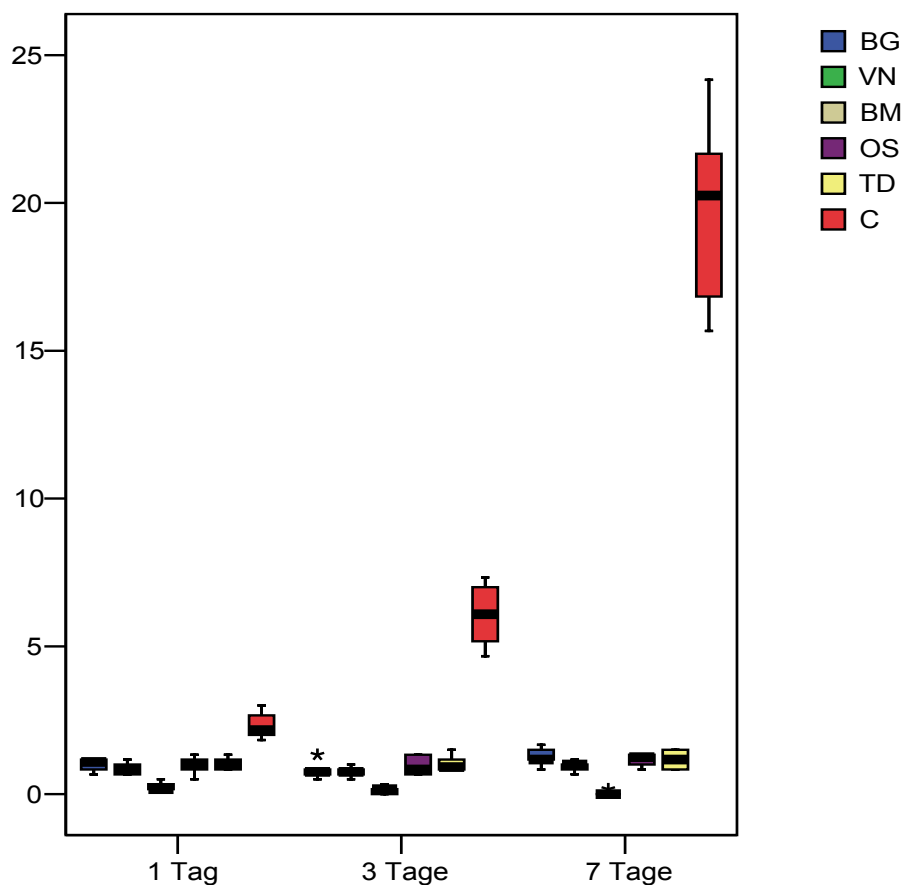
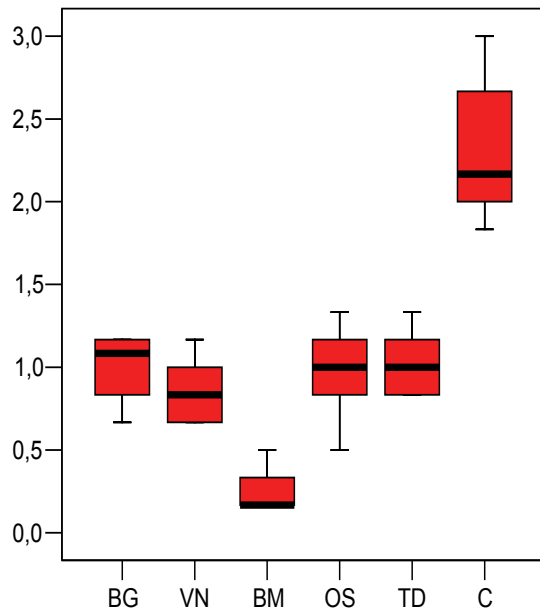


Abb. 13. : Boxplot der ermittelten HUVEC-Zahlen in 1000/Well in Abhängigkeit der Kulturdauer

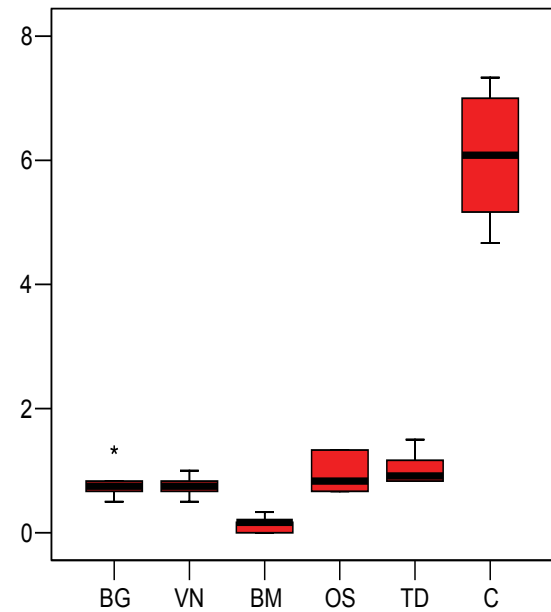
Tabelle 5 Deskriptive Statistik der HUVEC-Zellzahlen in 1000/Well über die Zeit

Dauer	1 Tag			3 Tage			7 Tage		
	N	MW	SD	N	MW	SD	N	MW	SD
BG	6	1,00	,21	6	0,81	,29	6	1,25	,29
VN	6	0,86	,22	6	0,75	,17	6	0,95	,17
BM	6	0,25	,14	6	0,14	,13	6	0,03	,07
OS	6	0,97	,29	6	0,94	,33	6	1,17	,21
TD	6	1,03	,19	6	1,03	,27	6	1,17	,32
C	6	2,31	,45	6	6,06	1,13	6	19,81	3,18

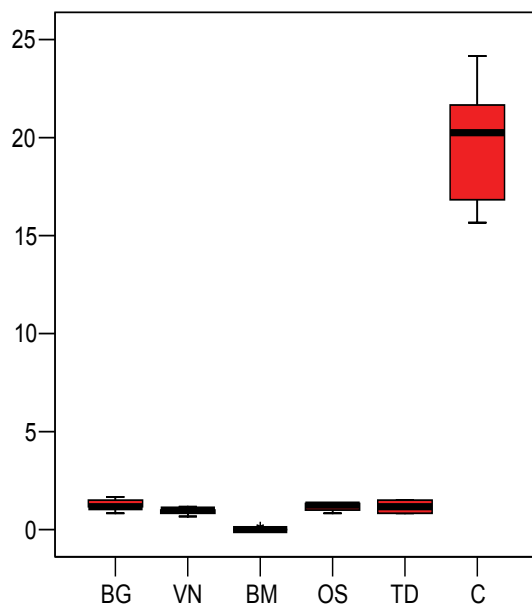
Abbildung 13 zeigt die deskriptive Statistik der ermittelten HUVEC-Zellzahlen in 1000 pro Prüfkörper nach einem, drei und sieben Tagen Kulturdauer in Boxplot-Form. Auf der Ordinate sind die mittleren Zellzahlen in 1000 je Membranprobe aufgetragen, auf der Abszisse die Kulturdauer. Die Zugehörigkeit zu den einzelnen Gruppen ist als Farbcodierung gekennzeichnet. Erläuterung der Boxplot-Darstellung siehe 3.1.1.1.



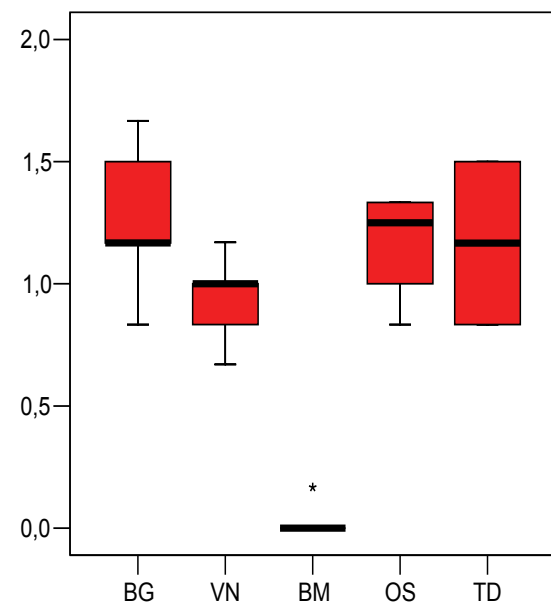
a. 1 Tag



b. 3 Tage



c. 7 Tage



d. 7 Tage ohne Kontrollgruppe

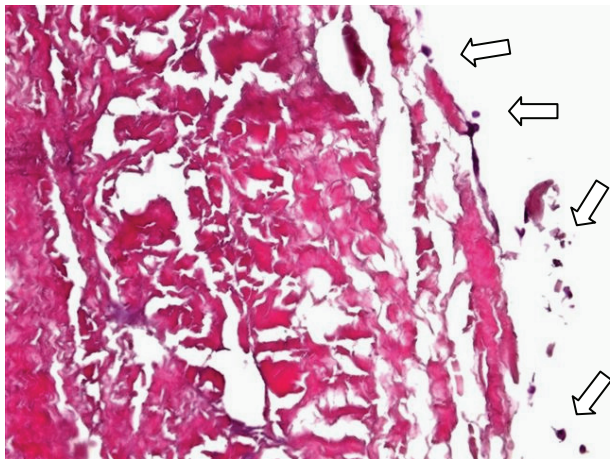
Abb. 14: Einzelboxplots der HUVEC-Zahlen in 1000/Well nach 1, 3 und 7 Tagen Kulturdauer

Da die Werte der Kontrollgruppe denen der Testgruppen zum Teil bis um das zwanzigfache überlegen waren, erscheint in Abb. 13 ein grafischer Vergleich innerhalb der einzelnen Membranproben erschwert. Aus diesem Grund sind die Daten in Abb. 14 a-c in Abhängigkeit der Kulturdauer getrennt dargestellt. Zudem wurde in Abb. 14 d zum besseren Vergleich der einzelnen Membranen auf die Darstellung der Kontrollgruppe verzichtet. Zur Erläuterung der Boxplot-Darstellung siehe Kap. 3.1.1.1.

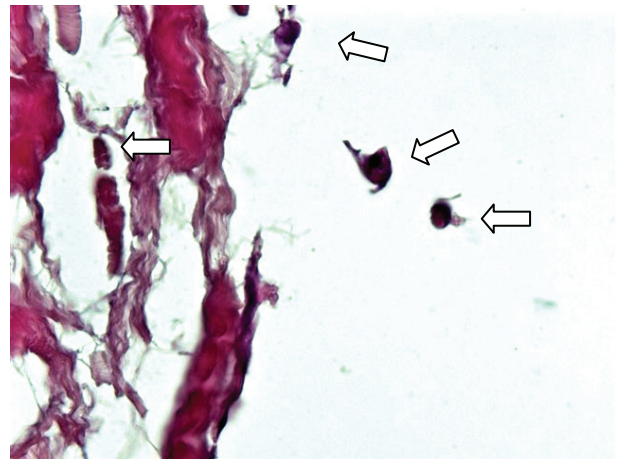
In der induktiven Statistik innerhalb der Gruppen über die Zeit ließ sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl der Kontrollgruppe vom 1. zum 3. ebenso wie vom 3. zum 7. Tag nachweisen ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test). Die Zellzahl auf BioMend® nahm hingegen vom 1. zum 3. Tag und vom 3. zum 7. Tag signifikant ab ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test). Bei den anderen Gruppen war keine signifikante Veränderung der Zellzahl in Abhängigkeit der Kulturdauer nachzuweisen.

Die induktive Statistik des Gruppenvergleiches zu den einzelnen Zeitpunkten ergab eine sowohl am 1., als auch am 3. und 7. Tag signifikant höhere Zellzahl der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Kollagenen ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test). Die BioMend®-Membran zeigt die geringsten Werte und weist bereits nach einem Tag einen deutlich geringeren Wert als alle anderen Gruppen auf, was sich statistisch signifikant auch über drei und sieben Tage fortsetzt ($P < 0,05$, Wilcoxon-Test). Die Kollagene der BioGide®, VN, Ossix® und Tutogen® unterschieden sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte statistisch signifikant ($P > 0,05$, Wilcoxon-Test).

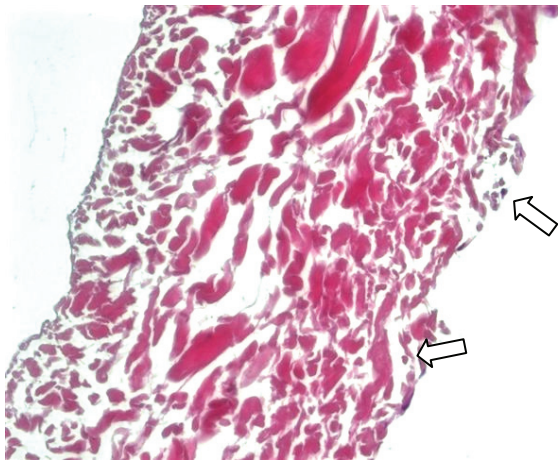
3.2.2 Histologische Beurteilung des Wachstumsmusters



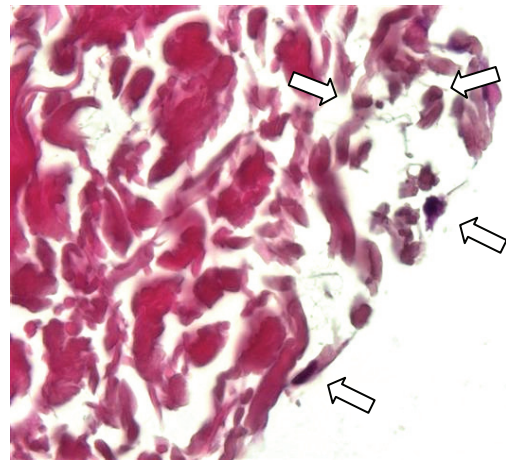
a. BioGide®, Originalvergr. 200x



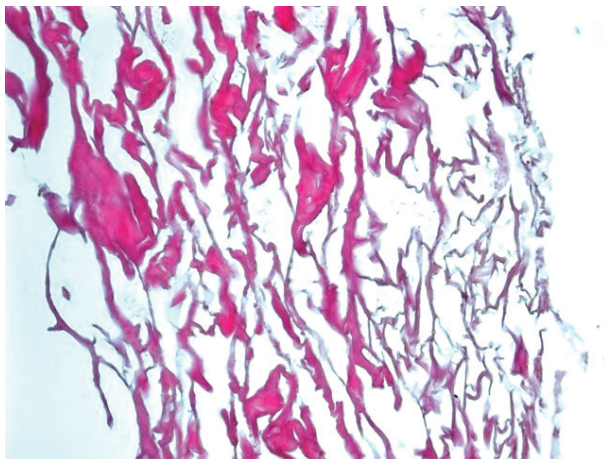
b. BioGide®, Originalvergr. 600x



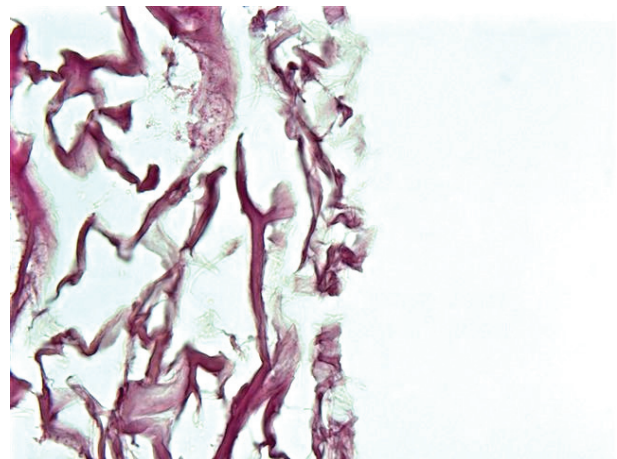
c. VN, Originalvergr. 200x



d. VN, Originalvergr. 600x

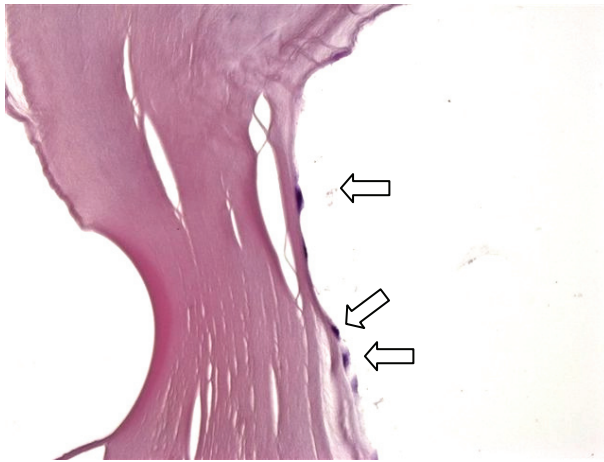


e. BioMend®, Originalvergr. 200x

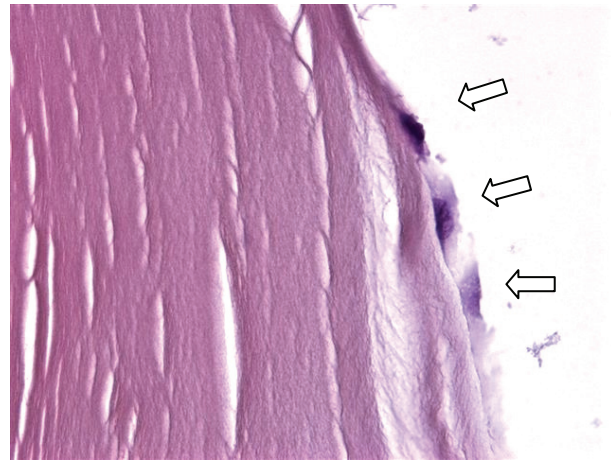


f. BioMend®, Originalvergr. 600x

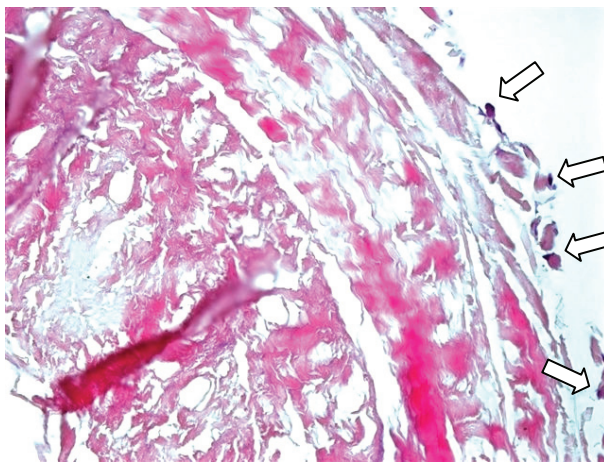
Abb. 15 a-f: HE-gefärbte Histologien der 7-Tages-Proben zur Beurteilung des Wachstumsmusters



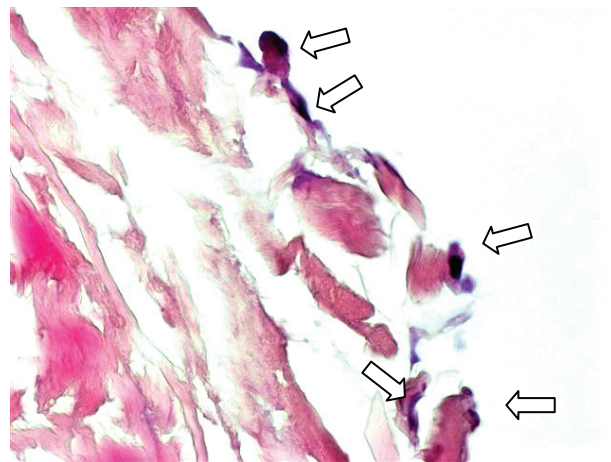
g. Ossix®, Originalvergr. 200x



h. Ossix®, Originalvergr. 600x



i. Tutodent®, Originalvergr. 200x



j. Tutodent®, Originalvergr. 600x

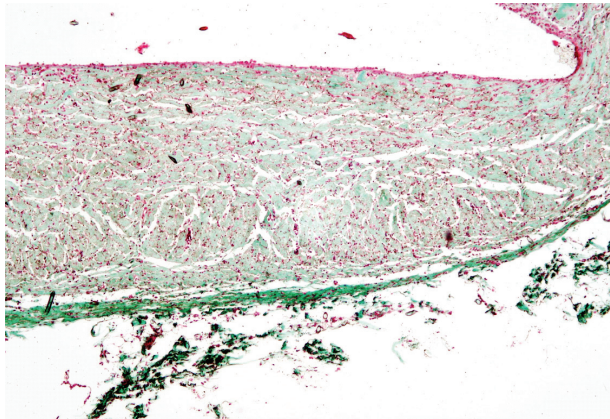
Abb. 15 g-j: HE-gefärbte Histologien der 7-Tages-Proben zur Beurteilung des Wachstumsmusters

Die histologische Analyse des Wachstumsmusters der Zellen auf den Membranen zeigte für die Bilayermembranen BioGide®, VN und Tutodent® ein Wachstum von HUVEC-Zellen (Pfeile) hauptsächlich auf der oberflächlichsten Schicht mit Invasion einzelner Zellen in die äußersten Anteile der offenporigen Membrankörper (15 a-d, i-j). Die Ossix®-Membran erschien außerordentlich kompakt und ließ ein Wachstum der Zellen ausschließlich auf der Oberfläche erkennen. Diese waren im Vergleich zu BG, VN und TD eher flach und monolayerartig auf dem Kollagen verteilt. Eine Zellinvasion in den Membrankörper war nicht ersichtlich (Abb. 15 g,h). Eine Ausbildung von blutgefäßähnlichen Strukturen war bei keiner der Proben zu erkennen. Auf dem BioMend®-Kollagen ließen sich keine Zellen darstellen (Abb. 15 e,f).

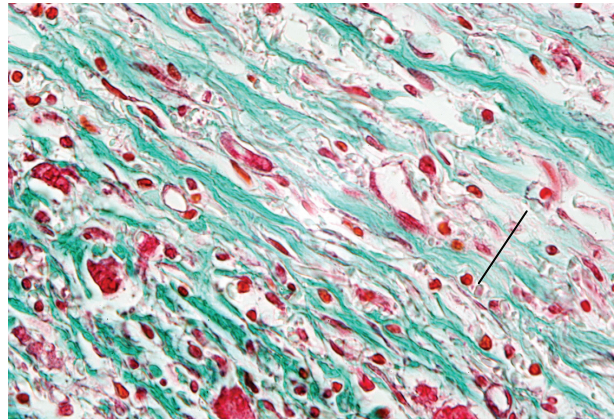
3.3 In-vivo: Biodegradation

3.3.1 Histologien

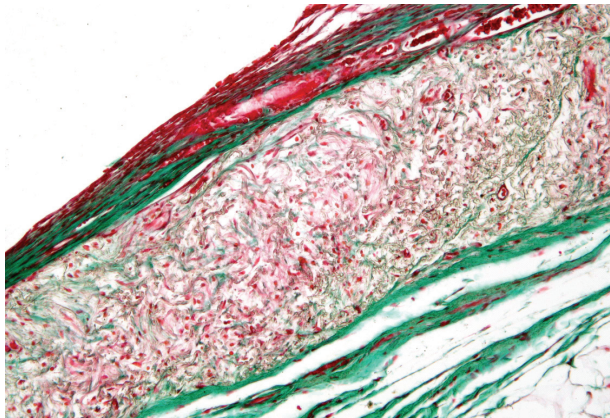
3.3.1.1 BG



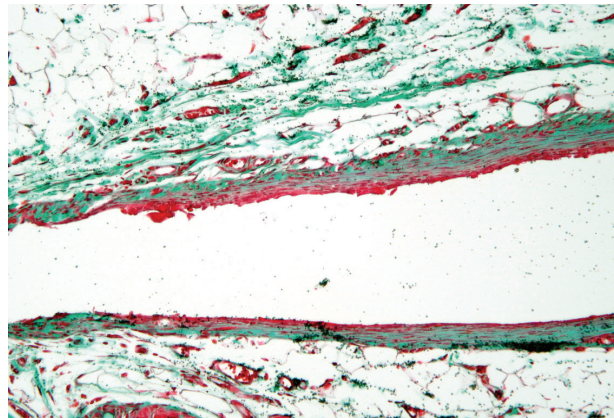
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 4 Wochen, Originalvergr. 400x



c. 2 Monate, Originalvergr. 200x



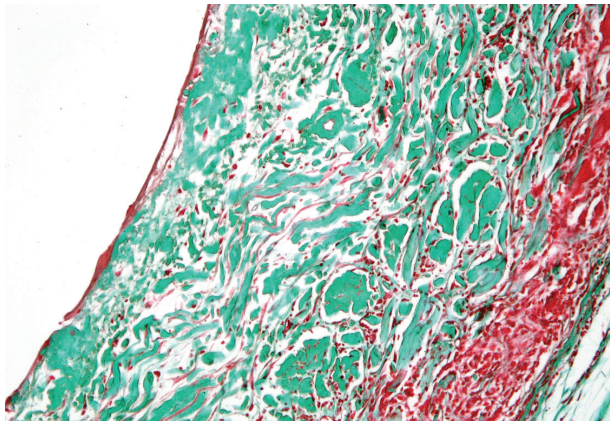
d. 4 Monate, Originalvergr. 200x

Abb. 16: Histologische Beurteilung der VN-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

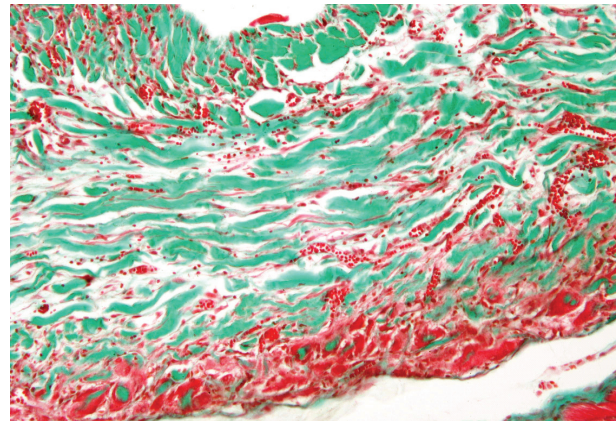
Die BioGide®-Proben zeigten bereits nach zwei Wochen eine deutliche Einwanderung von Zellen in das native Kollagen. Diese penetrierten die in ihrer Gesamtheit den kompletten Membrankörper (Abb. 16a). Nach vier Wochen war zudem eine hohe Anzahl von Blutgefäßen innerhalb des Membrankörpers nachweisbar, ebenso eine Vielzahl von Fibroblasten bei nur sehr wenigen Entzündungszellen wie Makrophagen und Granulozyten (Abb. 16b). Mehrkernige Riesenzellen waren nicht ersichtlich. Zwei Monate nach Implantation war der Membrankörper bei hervorragender Gewebeintegration bereits weitestgehend organisiert (Abb. 16c). Nach vier und sechs Monaten konnte

nur noch eine deutliche Kapsel um den Polycarbonat-Spacer und keine Reste der Membran mehr nachgewiesen werden (Abb. 16d).

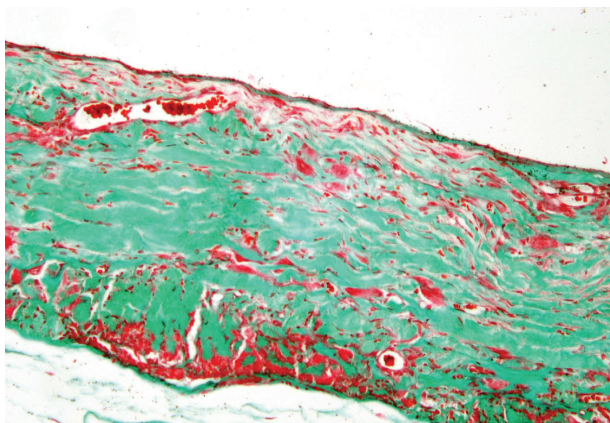
3.3.1.2 VN1



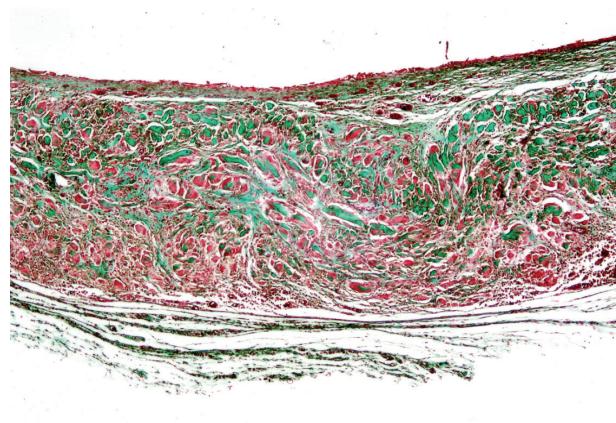
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 4 Wochen, Originalvergr. 100x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 40x



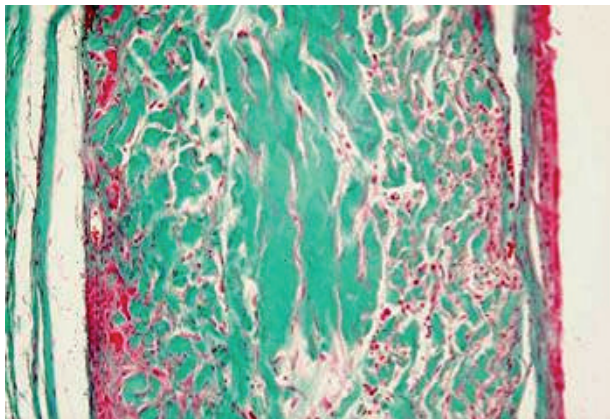
d. 16 Wochen, Originalvergr. 40x

Abb. 17: Histologische Beurteilung der VN1-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

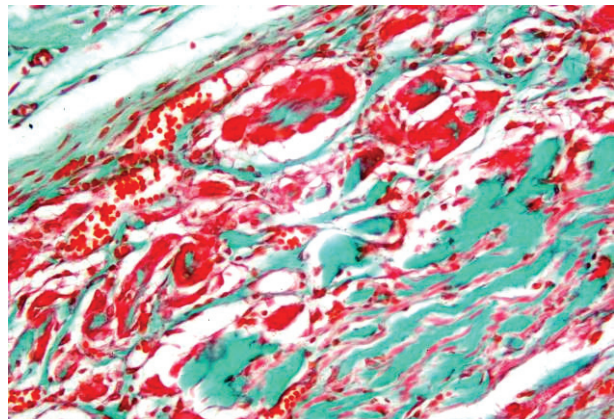
Die einfach chemisch vernetzte VN1 zeigte ebenso wie BioGide® bereits nach zwei Wochen Zellen innerhalb des gesamten Membrankörpers. Während einige Blutgefäße von der Außenseite in den Membrankörper eindringen, war hier auch ein Band von mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen ersichtlich. Offenbar unterhielt die Membran hier eine Entzündungsreaktion (Abb. 17a). Nach weiteren zwei Wochen hatten die Blutgefäße die Innenseite erreicht, während die Fremdkörperreaktion auf der Außenseite unverändert fortbestand (Abb. 17b). Acht Wochen nach Implantation war die Membran noch deutlich als solche zu identifizieren; zudem waren innerhalb des Membrankörpers auch Blutgefäße größeren Durchmessers hinzu gekommen. Bei guter

Gewebeintegration zeigte sich weder Kapsel- noch Spaltbildung um das Implantat (Abb.17c). Nach 16 Wochen war die Fremdkörperreaktion bis in die inneren Schichten des Membrankörpers vorgedrungen (Abb. 17d), während nach 24 Wochen die Membran ebenso wie BioGide® nur noch rudimentär nachweisbar war.

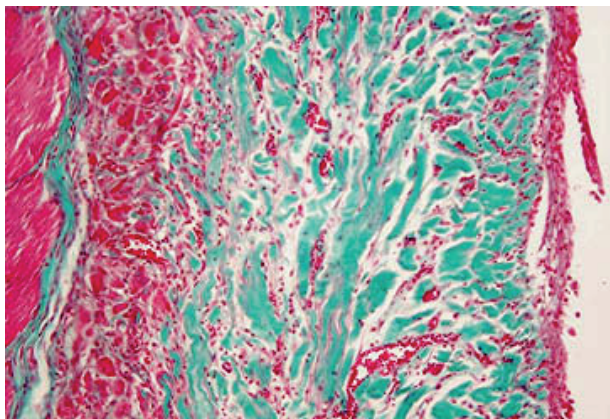
3.3.1.3 VN2



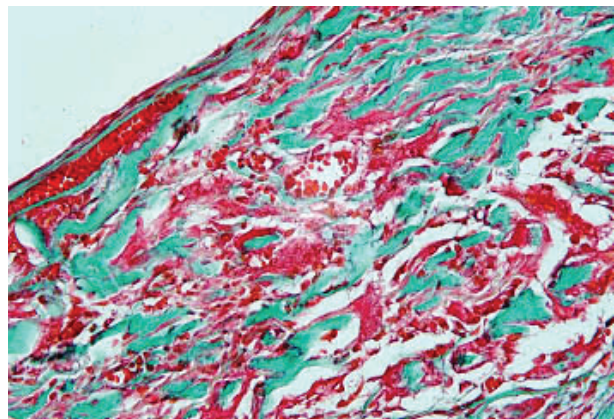
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 4 Wochen, Originalvergr. 200x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 40x



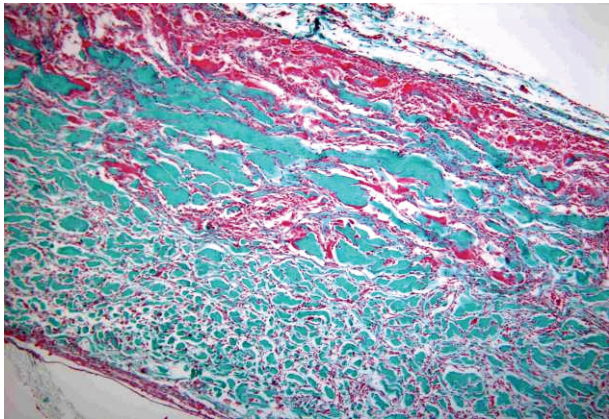
d. 24 Wochen, Originalvergr. 100x

Abb. 18: Histologische Beurteilung der VN2-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

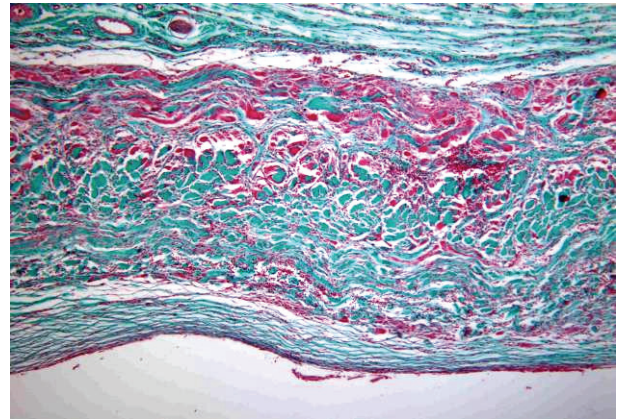
Die VN2-Implantate mit dreifacher Quervernetzung zeigten ein sehr ähnliches Bild wie die VN1-Membranen. Nach zwei Wochen waren einzelne Zellen bereits bis auf die Innenseite der Membran durchgedrungen, während an der Außenseite ein Riesenzellband imponierte (Abb. 18a). In höherer Vergrößerung sah man deutlich, wie sich nach vier Wochen die zu mehrkernigen Riesenzellen fusionierten Makrophagen um die einzelnen Kollagenfasern legten und das quervernetzte Kollagen zu resorbieren versuchten (Abb.18b). Nach acht Wochen war ebenso wie bei VN1 eine deutliche

Zunahme der Blutgefäßdurchmesser bei gleich bleibender Entzündungsreaktion auf der Außenseite ersichtlich (Abb. 18c). Im Gegensatz zu VN1 war der Membrankörper jedoch auch nach 24 Wochen Implantationszeit noch deutlich als solcher zu identifizieren. Zudem war eine ausgeprägte Blutgefäßinvasion und Entzündungsreaktion in allen Membranteilen ersichtlich (Abb. 18d).

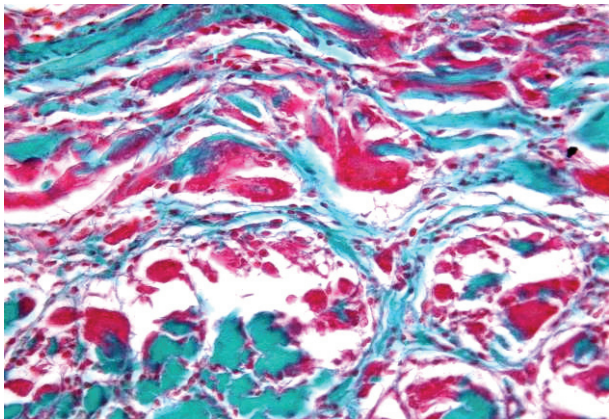
3.3.1.4 VN3



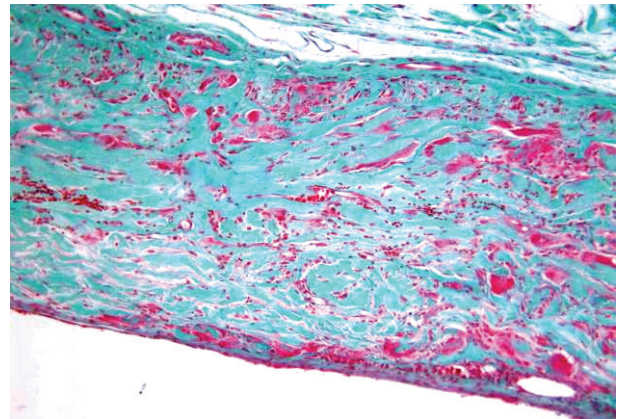
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 8 Wochen, Originalvergr. 40x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 400x



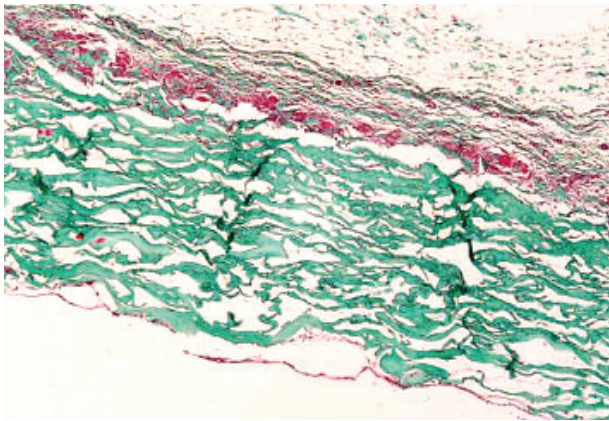
d. 24 Wochen, Originalvergr. 40x

Abb. 19: Histologische Beurteilung der VN3-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

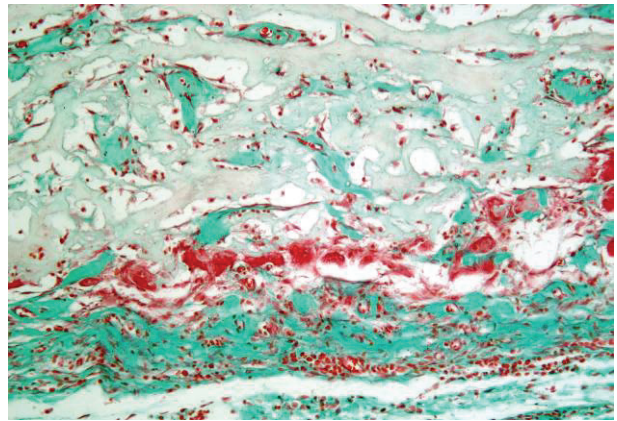
Die Histologien der VN3 Membran als vierfach vernetzte BioGide®-Variante erschienen denen von VN1 und VN2 vergleichbar. Bei guter Gewebeintegration mit äußerem deutlichen Entzündungszellband war bereits nach zwei Wochen ein vollständiges Durchwachsen der Membran erkennbar, wenngleich die entzündliche Reaktion insgesamt noch stärker erschien als bei den weniger vernetzten Proben (Abb. 19a). Nach acht Wochen war dieses Bild im Gegensatz zu VN1 und VN2

weiterhin unverändert (Abb. 19b). Vor allem im Außenbereich waren eine Vielzahl von mehrkernigen Riesenzellen und anderen Entzündungszellen mit der Resorption des Materials beschäftigt (Abb.19c). Nach 24 Wochen schien die Fremdkörperreaktion wieder abzunehmen, während der Membrankörper als solches immer noch in deutlicher Ausdehnung und von Blutgefäßen durchzogen imponierte (Abb.19d).

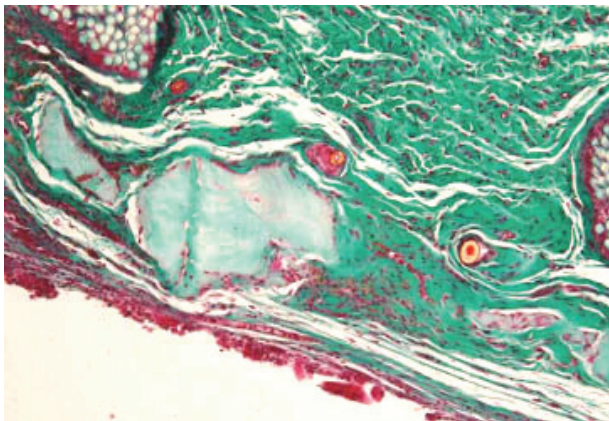
3.3.1.5 BM



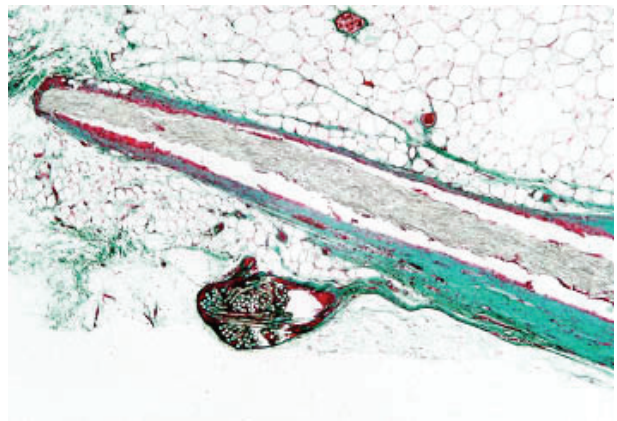
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 4 Wochen, Originalvergr. 100x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 200x



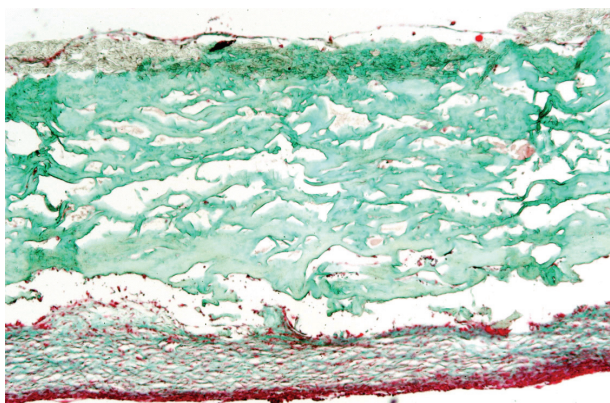
d. 16 Wochen, Originalvergr. 40x

Abb. 20: Histologische Beurteilung der BM-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

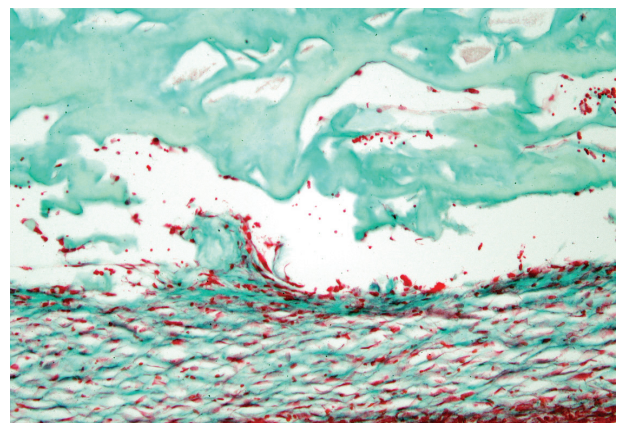
BioMend® zeigte nach zwei Wochen annähernd keine Zellinvasion. Ein teilweise ersichtliches dünnes Zellband auf der Innenseite war nachweislich von der Seite her in den Implantatkörper eingewachsen (Abb. 20a). Außerhalb der eigentlichen zellulären Reaktion war zudem eine leichte Kapselbildung um das Implantat nachweisbar (Abb. 20a). Innerhalb von vier Wochen waren Entzündungszellen, Fibroblasten und Blutgefäße in den Membrankörper eingedrungen, während sich auf der Außenseite

ein Band von mehrkernigen Riesen- und anderen Entzündungszellen angesammelt hatte. Die unterschiedlichen Grüntöne innerhalb des Membrankörpers ließen bereits organisierte und nicht-organisierte Anteile des Kollagens unterscheiden (Abb. 20b). Abbildung 20c zeigt als acht Wochen-Histologie ein solches nicht-organisiertes Membranareal in hoher Vergrößerung: während das umgebende Kollagen dunkel erscheint und Fibroblastenzellkerne enthält, ist ein kleiner Anteil amorpher Membranmasse als hellere Struktur deutlich abzugrenzen. Die beiden anderen hell strukturierten Bereiche entsprechen dem quer angeschnittenen polyfilen Nahtmaterial, mit dem die einzelnen Implantate stabilisiert und markiert waren. Nach 16 Wochen war die Membran vollständig resorbiert – es ließen sich nur noch der Polycarbonat-Spacer, eine dünne umgebende Kapsel sowie umgebenes Fettgewebe mit frei darin befindlichen Nahtanschnitten erkennen (Abb. 20d).

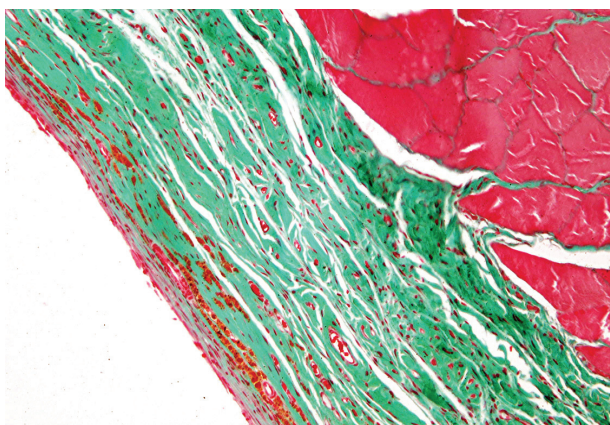
3.3.1.6 BME



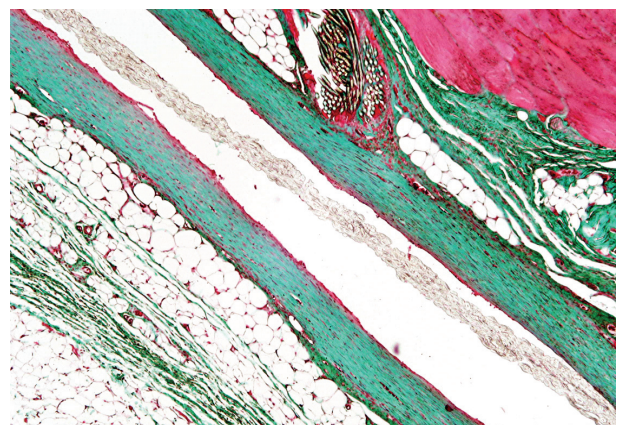
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 2 Wochen, Originalvergr. 100x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 100x

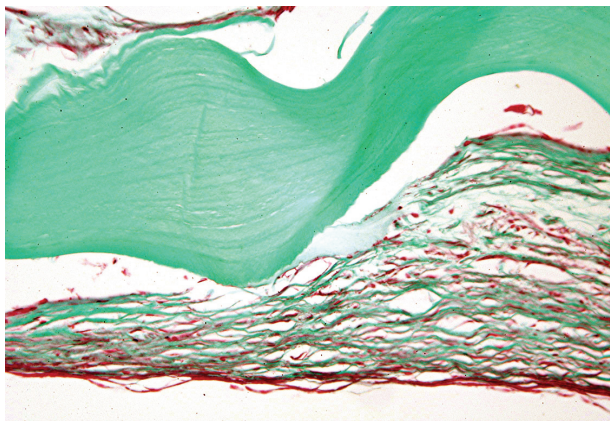


d. 16 Wochen, Originalvergr. 40x

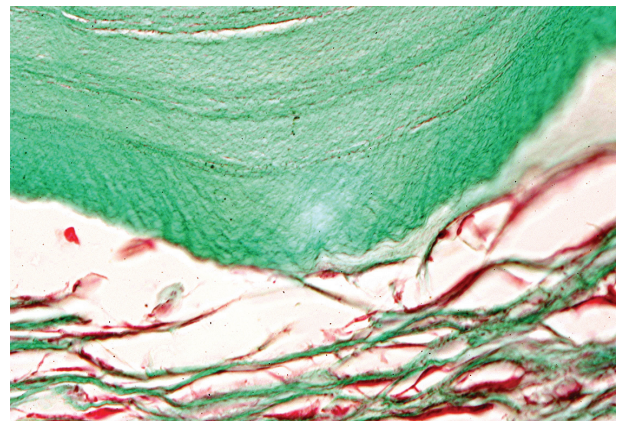
Abb. 21: Histologische Beurteilung der BME-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

Die BioMendExtend®-Membran glich strukturell dem BioMend®-Kollagen, mit dem Unterschied eines erhöhten Membrandurchmessers. Der Aufbau beider Membranen imponierte im Gegensatz zu BioGide®, VN1-3 und Tutodent® eher artifiziell geschichtet, ohne Anzeichen kommunizierender Hohlräume. Die Histologie zeigte nach zwei Wochen eine deutliche Kapsel- und Spaltbildung um den Membrankörper als Zeichen fehlender Gewebeintegration (Abb. 21a). Es ließen sich bei höherer Vergrößerung nur in der äußersten Schicht der Membran vereinzelt Zellen nachweisen (Abb. 21b). Nach acht Wochen war der Membrankörper ebenso wie bei BM bereits vollständig durch körpereigenes Kollagen ersetzt (Abb. 21c). Wie in Abb. 21d ersichtlich, waren nach 16 und 24 Wochen nur noch der Spacer (grau) mit Kapsel (grün), das umgebende Fett-(schaumig weiß), Binde- (grün) und Muskelgewebe (rot) und vereinzelt angeschnittenes Nahtmaterial (grün mittig oben), umgeben von einer Fremdkörperreaktion erkennbar.

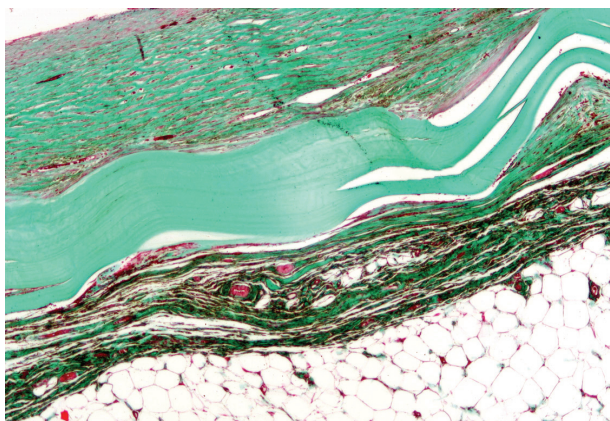
3.3.1.7 OS



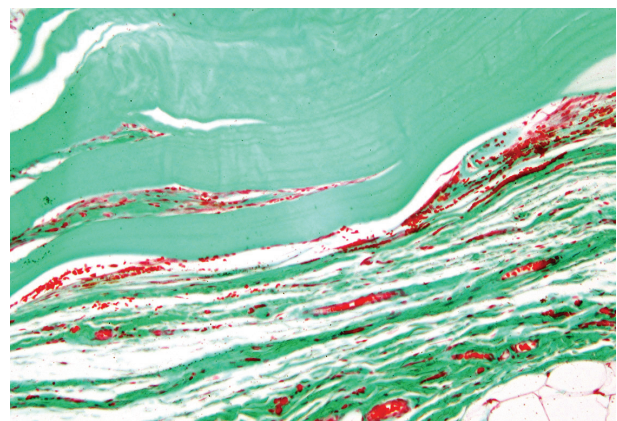
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 4 Wochen, Originalvergr. 200x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 40x

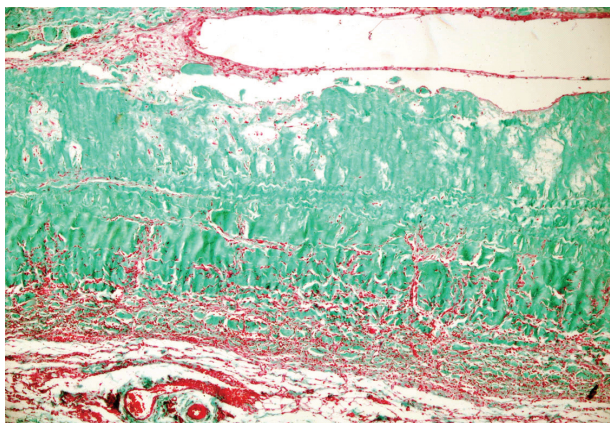


d. 24 Wochen, Originalvergr. 100x

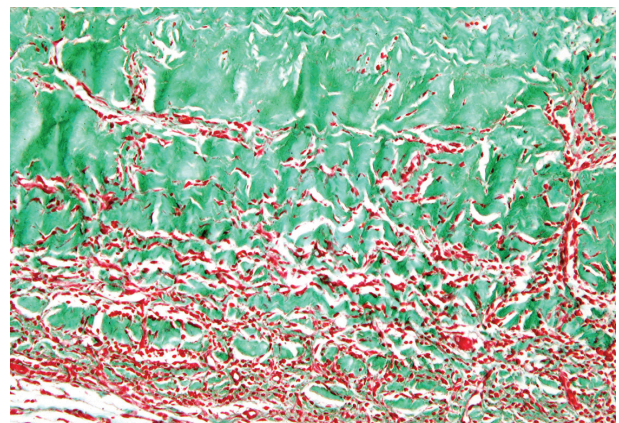
Abb. 22: Histologische Beurteilung der OS-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

Das Kollagen der Ossix[®]-Membran erschien sehr kompakt und war nach zwei (Abb. 22a) und vier Wochen (Abb. 22b) von einer deutlichen Kapsel- und Spaltbildung umgeben. Es war keinerlei Zellinvasion in den Membrankörper ersichtlich. Die Kapselbildung persistierte auch nach acht Wochen deutlich. Eine Resorption oder Organisation des Implantates war nicht beobachtbar (Abb. 22c). Nach 24 Wochen Einheilzeit ließ sich zumindest im Randbereich mancher Proben ein oberflächliches Aufbrechen der Kollagenstruktur erkennen (Abb. 22d). Der Membrankörper an sich (Abb. 22d rechts oben) war jedoch immer noch unverändert kompakt und zeigte nur wenige Anzeichen einer Gewebeintegration, keine Zellinvasion und keine Membranresorption.

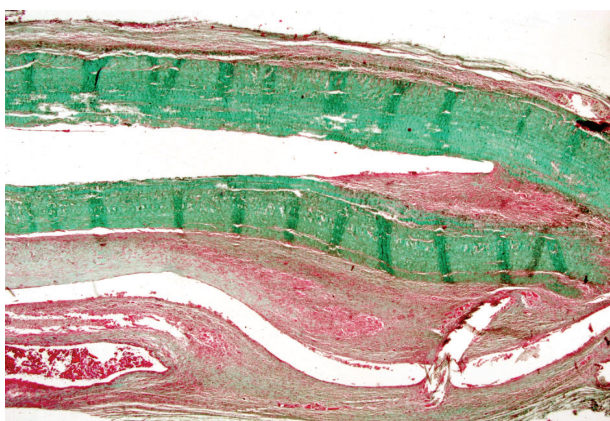
3.3.1.8 TD



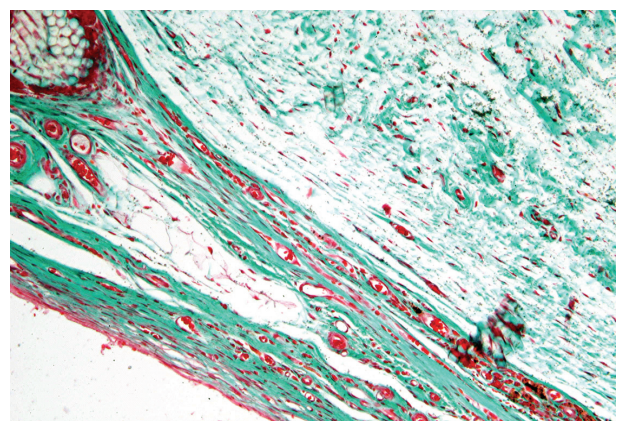
a. 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. 2 Wochen, Originalvergr. 100x



c. 8 Wochen, Originalvergr. 12,5x



d. 16 Wochen, Originalvergr. 200x

Abb. 23: Histologische Beurteilung der TD-Membran nach unterschiedlichen Heilungsperioden

Die Tutodent[®]-Membranen erschienen im inneren und mittleren Anteil strukturell deutlich kompakter als die anderen Bilayermembranen BG und VN1-3. Nach zwei Wochen Implantationszeit war eine Zellinvasion nur in das äußere, lockere Drittel der Membran nachweisbar. Die inneren beiden Layer waren nur sehr vereinzelt von Zellen erschlossen (Abb. 23a). Weiterhin war eine gute Gewebeintegration festzustellen. Bei höherer Vergrößerung wird in Abb. 23b der zur Mitte hin abnehmende zelluläre Anteil im Membrankörper noch deutlicher. Auch die neu gebildeten Blutgefäße scheinen nicht über das äußere Drittel vorzudringen. Es waren zudem keine mehrkernigen Riesenzellen und nur eine geringe Anzahl an Makrophagen und Granulozyten erkennbar. Nach acht Wochen Implantationszeit war die Membran immer noch stabil, jedoch war es vielfach zu einer Art Kapselbildung gekommen (Abb.23c). Nach 16 Wochen war auch die Tutodent[®]-Membran weitestgehend resorbiert (Abb. 23d).

3.3.2 Histomorphometrie

In der grafischen Darstellung der histomorphometrischen Analyse (Abb. 24) ist der mittlere Membrandurchmesser in Abhängigkeit vom Implantationszeitraum für jede einzelne Membran als Balkendiagramm mit Standardabweichung (dünne Linie) dargestellt. Statistisch signifikante Reduktionen zu den Zwei-Wochen-Werten ($P < 0,05$, ANOVA) sind mit einem Stern gekennzeichnet (*). Hochsignifikante ($P < 0,01$) wurden mit zwei (**) und höchstsignifikante ($P < 0,001$) mit drei Sternen (***) kenntlich gemacht. Tabelle 6 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen, ebenfalls unter Angabe der Signifikanzlevel.

Es zeigte sich, dass sich die Membranen bereits deutlich hinsichtlich ihres Anfangsdurchmessers unterscheiden. Während alle Bilayermembranen eine Dimension von etwa 600-800 μm aufwiesen, war die Ossix[®]-Membran mit etwa 300 μm deutlich dünner. BioMendExtend[®] erschien mit 1100 μm am stärksten dimensioniert, auch im Vergleich zu ihrem Schwesterprodukt BioMend[®] mit ca. 700 μm . Im induktiven Vergleich ergab sich, dass eine statistisch signifikante Reduktion des Membrandurchmessers im Vergleich zu den Zwei-Wochen-Werten bei BioGide[®] bereits nach vier

Wochen erreicht war ($P < 0,001$, ANOVA). VN1 und VN2 erreichten das Signifikanzniveau erst nach acht Wochen. Dabei hatte VN1 nach acht Wochen höchstsignifikant an Volumen verloren ($P < 0,001$, ANOVA); VN2 hatte das Signifikanzlevel jedoch nur gerade eben erreicht ($P < 0,05$, ANOVA). Die Werte von VN3 unterlagen zu keinem Zeitpunkt einer statistisch signifikanten Reduktion des Membrandurchmessers ($P > 0,05$, ANOVA, respektive). BioMend® und BioMendExtend® blieben über die ersten vier Wochen sehr stabil, unterlagen dann aber beide nach 8 Wochen einem deutlichen Membrankollaps ($P < 0,001$, ANOVA), dessen Restdurchmesser sich auch im weiteren Verlauf nicht mehr weiter reduzierte. Die Ossix®-Membran blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil, mit nur sehr geringer Streuung blieben die Werte stetig um 300 µm mit nur minimaler Reduktion ($P > 0,05$, ANOVA). Tutodent® unterlag einer stetigen Dimensionsreduktion, die das Signifikanzniveau erstmals nach 16 Wochen erreichte ($P < 0,001$, ANOVA).

Tabelle 6 Deskriptive Statistik der histomorphometrischen Daten

	BioGide®		VN1		VN2		VN3	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
2 Wochen	781,7	68,8	587,1	124,2	636,5	147,7	463,9	134,2
4 Wochen	289,6***	88,6	455,8	95,7	530,2	33,1	540,8	35,2
8 Wochen	128,6***	93,8	176,2***	28,2	364,6*	63,9	420,6	44,1
16 Wochen	142,0***	43,7	159,5***	57,9	219,8***	165,8	203,5	189,7
24 Wochen	166,9***	51,7	159,3***	47,4	87,4***	20,6	239,3	104,3

	BioMend®		BioMend Extend®		Ossix®		Tutodent®	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
2 Wochen	711,9	94,3	1070,8	230,8	318,2	41,7	696,5	96,0
4 Wochen	665,7	309,1	1065,6	267,8	323,4	47,0	681,8	51,8
8 Wochen	94,8***	37,0	113,9***	24,1	311,7	40,3	489,3	94,7
16 Wochen	127,0***	48,1	135,0***	67,4	289,1	37,6	263,6***	153,8
24 Wochen	101,2***	20,3	128,4***	38,5	289,8	71,5	206,5***	53,5

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

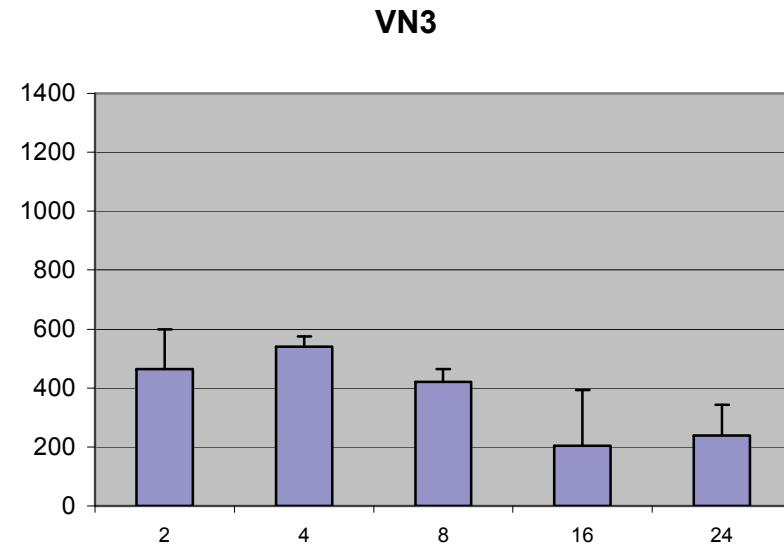
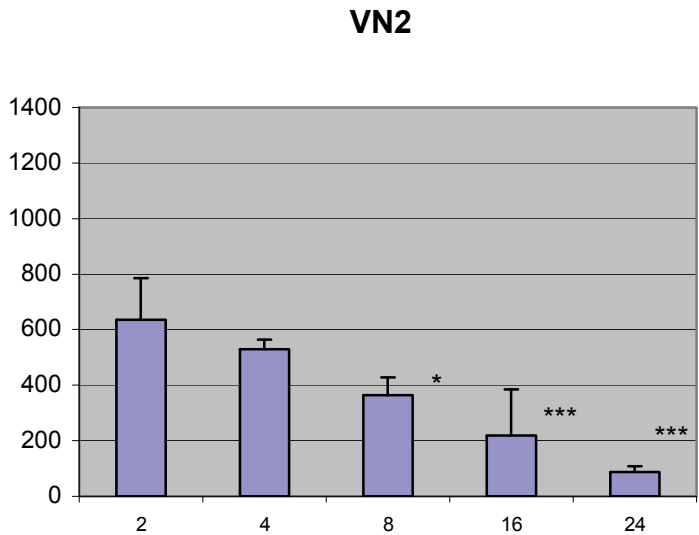
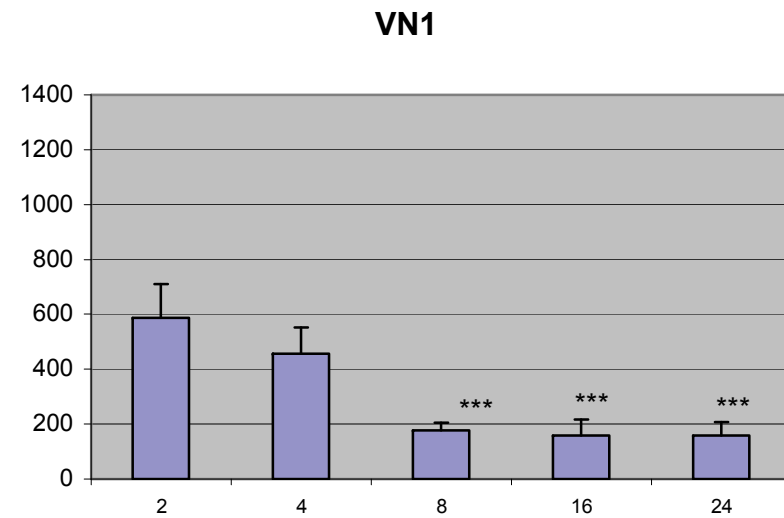
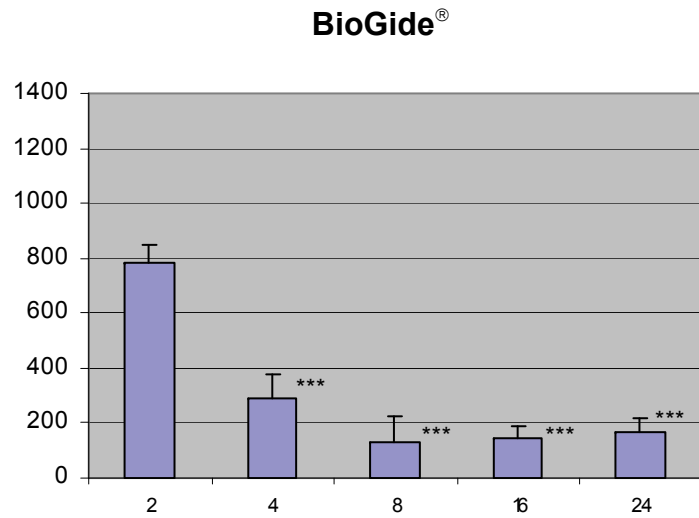


Abb. 24a: Grafische Darstellung der mittleren Membrandurchmesser und Standardabweichungen in µm nach unterschiedlichen Heilungsperioden

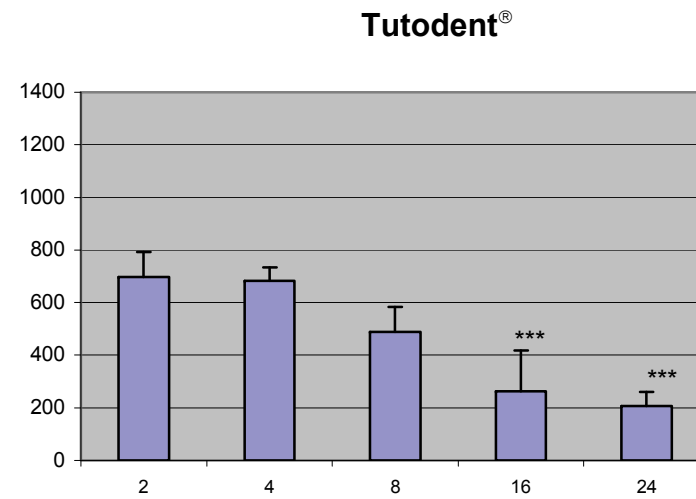
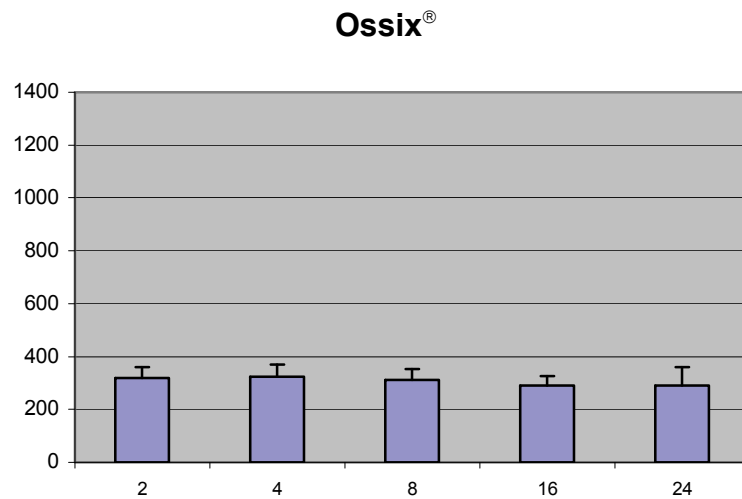
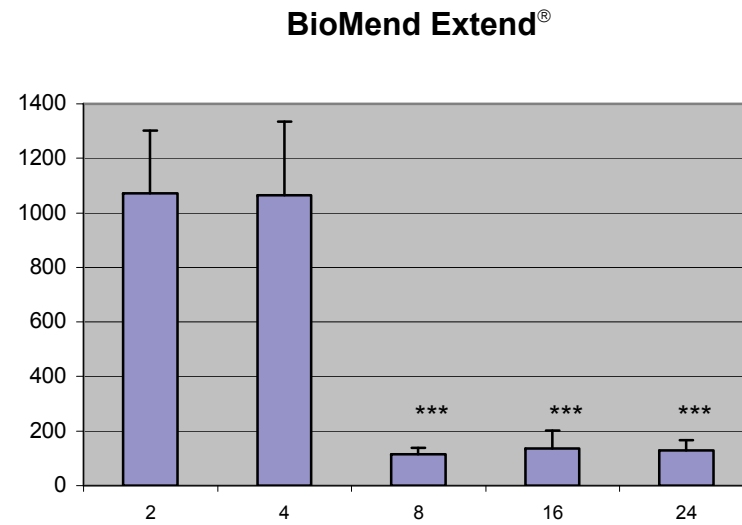
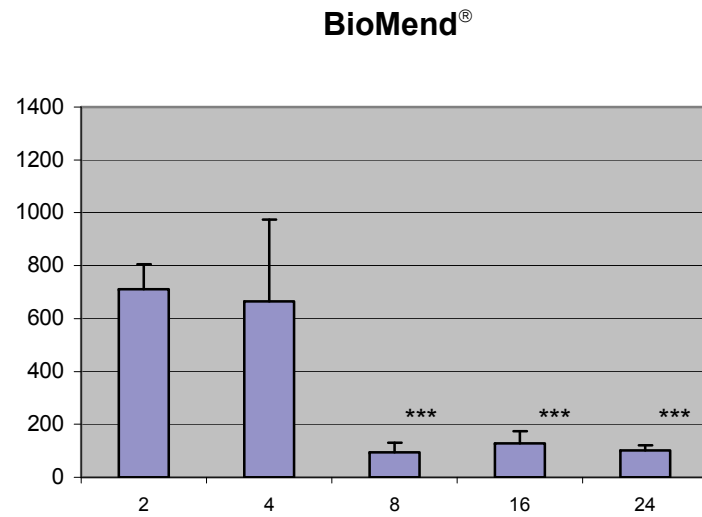
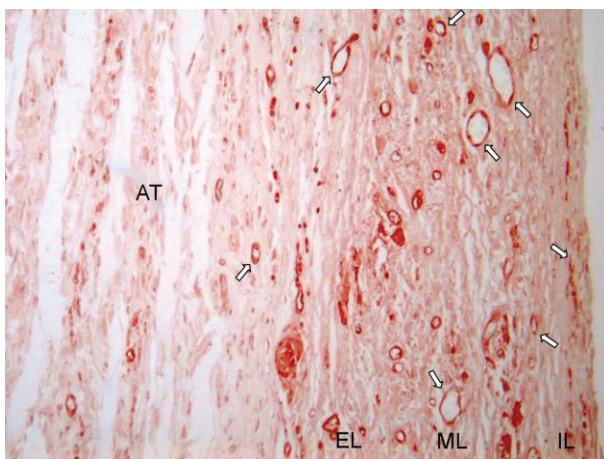


Abb. 24b: Grafische Darstellung der mittleren Membrandurchmesser und Standardabweichungen in µm nach unterschiedlichen Heilungsperioden

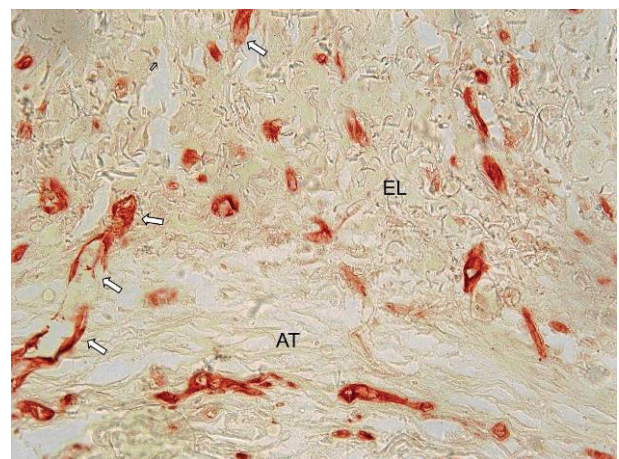
3.4 In-vivo: Angiogenese

3.4.1 Immunhistologie

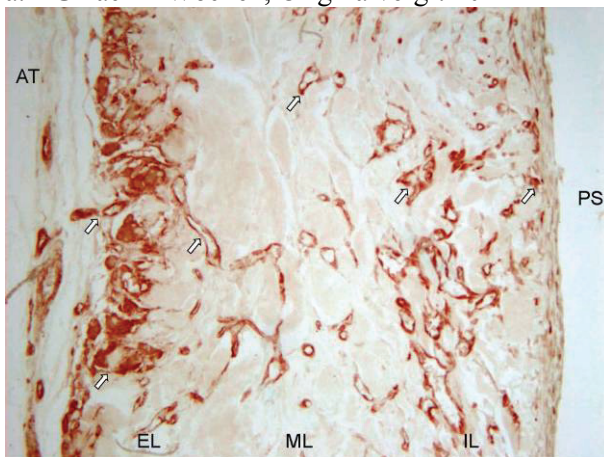
Für die BioGide®-Membran offenbarte die immunhistochemische Anfärbung der Blutgefäße eine sehr homogene und vollständige Vaskularisierung des gesamten Membrankörpers bereits nach zwei Wochen Heilungsperiode (Abb. 25a). In der höheren Vergrößerung in Abb. 25b erkennt man deutlich, wie sich die Blutgefäße (Pfeile) entlang der Kollagenfasern durch das interkonnektierende Porensystem der nativen BG winden. Auch die quervernetzten Membranen VN1-3 zeigten eine nach zwei Wochen bereits vollständige Erschließung der Membrankörper mit Blutgefäßen (Abb. 25c). Insgesamt schienen die Blutgefäße einen größeren Durchmesser zu haben als bei BG (Abb. 25d).



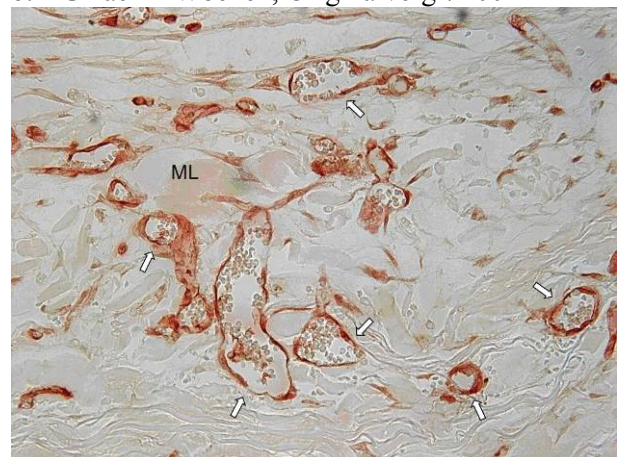
a. BG nach 2 Wochen, Originalvergr. 40x



b. BG nach 2 Wochen, Originalvergr. 100x



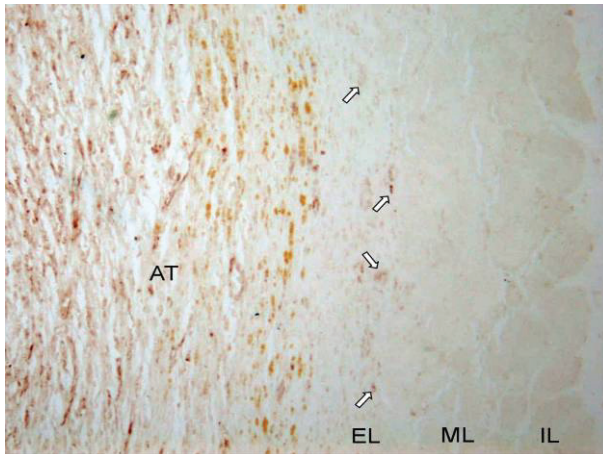
c. VN1 nach 2 Wochen, Originalvergr. 40x



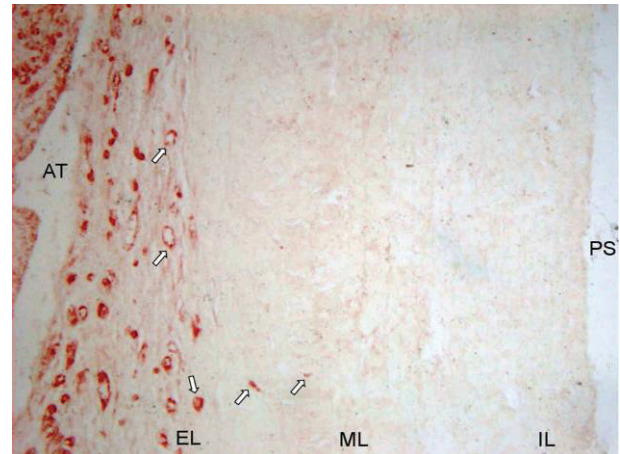
d. VN3 nach 2 Wochen, Originalvergr. 200x

Abb. 25 a-d: Immunhistologische Beurteilung der Blutgefäßinvasion

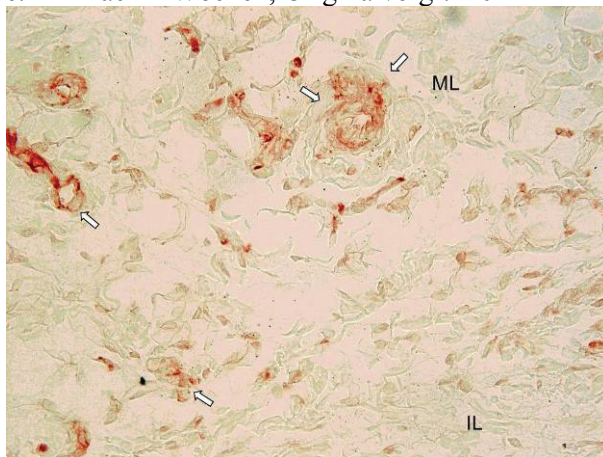
(EL/ML/IL: äußeres/mittleres/inneres Layer, AT: umgebendes Bindegewebe, PS: Polycarbonat-Spacer, Pfeile markieren Blutgefäße)



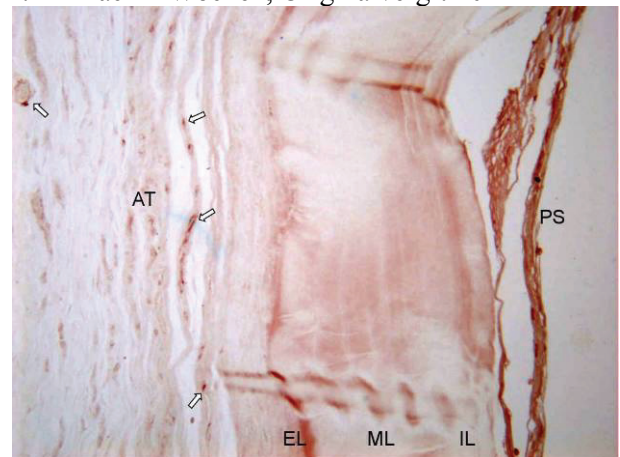
e. BM nach 2 Wochen, Originalvergr. 40x



f. TD nach 2 Wochen, Originalvergr. 40x



g. BME nach 4 Wochen, Originalvergr. 200x



h. OS nach 24 Wochen, Originalvergr. 40x

Abb. 25 e-h: Immunhistologische Beurteilung der Blutgefäßinvasion

(EL/ML/IL: äußeres/mittleres/inneres Layer, AT: umgebendes Bindegewebe, PS: Polycarbonat-Spacer, Pfeile markieren Blutgefäße)

Im Gegensatz zu den BG- und VN-Membranen waren nach zwei Wochen bei BM, BME und TG die Blutgefäße ausschließlich im äußeren Membrananteil nachzuweisen. Dabei war auffällig, dass die Glutaraldehyd-quervernetzten BM (Abb. 25e) und BME deutlich weniger Kapillaren in der äußeren Schicht zeigten als die native TD-Membran. Bei TD schien eine weitere Blutgefäßinvasion in die Mittelschicht durch die hier sehr kompakte Kollagenstruktur gebremst zu werden (Abb. 25f). Nach vier Wochen Heilungsperiode hatten einige Blutgefäße auch in BM und BME (Abb. 25g) das mittlere Layer erreicht. Für die Ossix[®]-Membran konnte während der gesamten Studiendauer von maximal 24 Wochen keine Blutgefäßinvasion in den Membrankörper nachgewiesen werden (Abb. 25h).

3.4.2 Histomorphometrie

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse sind nach Membranarten aufgeteilt in Form von Liniendiagrammen in Abb. 26 dargestellt. Dabei ist auf der Ordinate der mittlere Blutgefäß-Längs- und-Querschnitt als Blutgefäßdichte in Prozent aufgetragen. Die Abszisse entspricht den einzelnen Heilungsperioden. Zudem kennzeichnen verschiedene Farben die unterschiedlichen Layer (blau: äußeres, pink: mittleres, gelb: inneres Membrandrittel) mit jeweiliger Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Zahlenwerte der einzelnen Layer sind in Tabelle 7 angegeben, Tabelle 8 gibt Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Membrankörper ohne Unterscheidung der einzelnen drei Layer an.

Mit Ausnahme von OS zeigten alle Membranen eine vollständige Erschließung des Membrankörpers spätestens innerhalb der ersten acht Wochen. Es wurden jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich des Erschließungsmusters und der Erschließungsgeschwindigkeit festgestellt.

BG und VN1-3 offenbarten im induktiven Vergleich der drei Schichten vergleichbare Blutgefäßdichten ($P > 0,05$, ANOVA, respektive), was auf eine homogene Erschließung des Membrankörpers bereits nach zwei Wochen Heilungsperiode schließen ließ. Der Vergleich von BG und VN1-3 untereinander zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der Blutgefäßinvasion von BG, VN1 und VN2 ($P > 0,05$, ANOVA), während die Blutgefäßdichte von VN3 innerhalb der ersten zwei Wochen signifikant höhere Werte offenbarte ($P < 0,01$, ANOVA).

Im Gegensatz dazu war die initiale Angiogenese bei BM, BME und TD völlig anders gestaltet: Zwei Wochen nach Implantation zeigte TD vergleichbare Blutgefäßdichten im äußeren Layer wie BG und VN1-3 ($P > 0,05$, ANOVA), die beiden inneren Layer jedoch waren hochsignifikant geringer von Blutgefäßen durchsetzt ($P < 0,01$, ANOVA, respektive). BM und BME zeigten mit Ausnahme von OS die signifikant geringsten Blutgefäßdichten nach zwei Wochen ($P < 0,01$, ANOVA, respektive), jedoch war auch hier im internen Vergleich eine signifikante Zunahme der Blutgefäßdichte im weiteren Verlauf nach vier und acht Wochen feststellbar ($P < 0,05$, ANOVA, respektive).

OS zeigte während der gesamten Studiendauer keine Blutgefäßinvasion und somit die signifikant geringsten Werte nach 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen Heilungsperiode ($P < 0,001$, ANOVA, respektive).

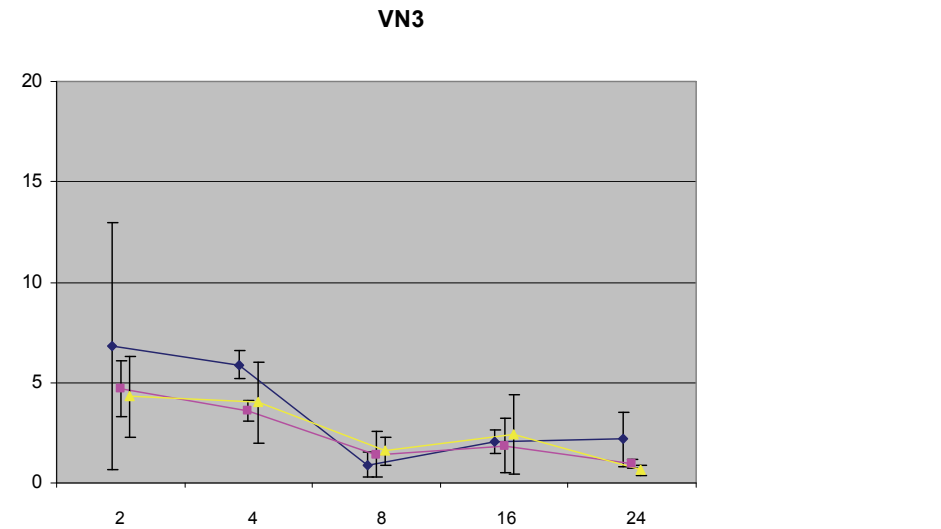
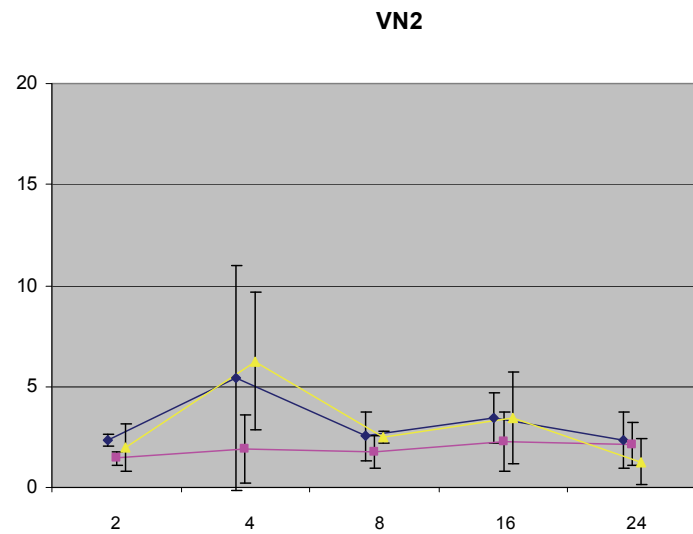
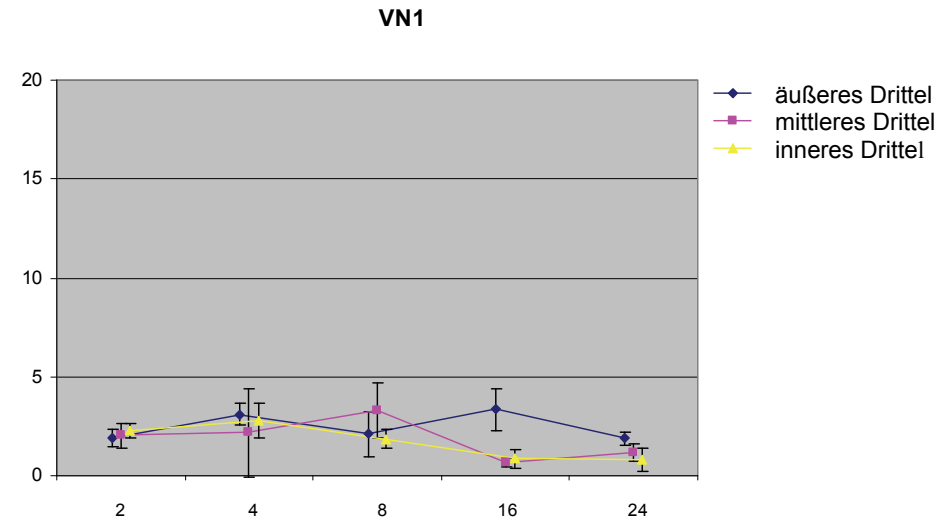
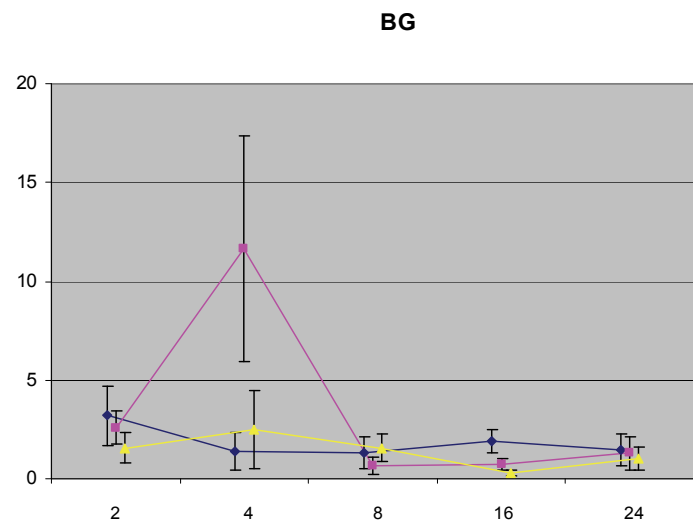


Abb. 26a: Grafische Darstellung der mittleren Blutgefäßdichten und Standardabweichungen der verschiedenen Layer in % nach unterschiedlichen Heilungsperioden

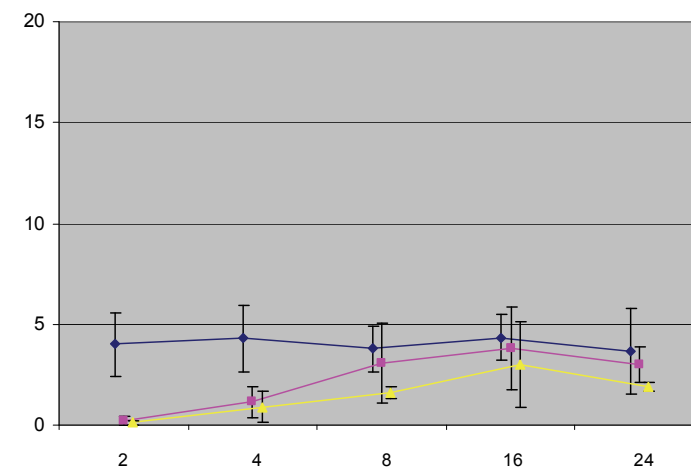
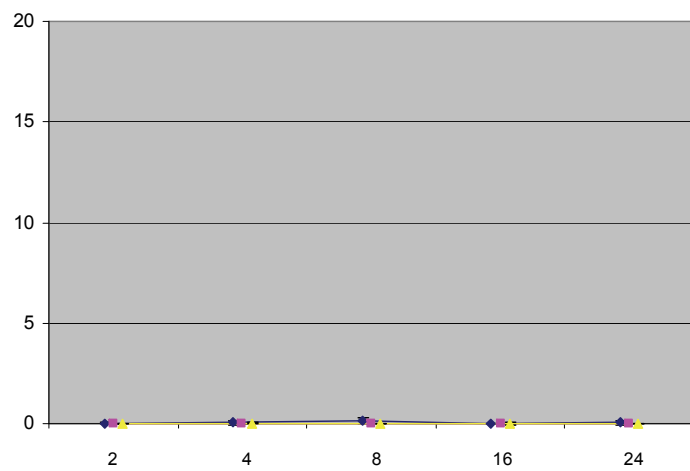
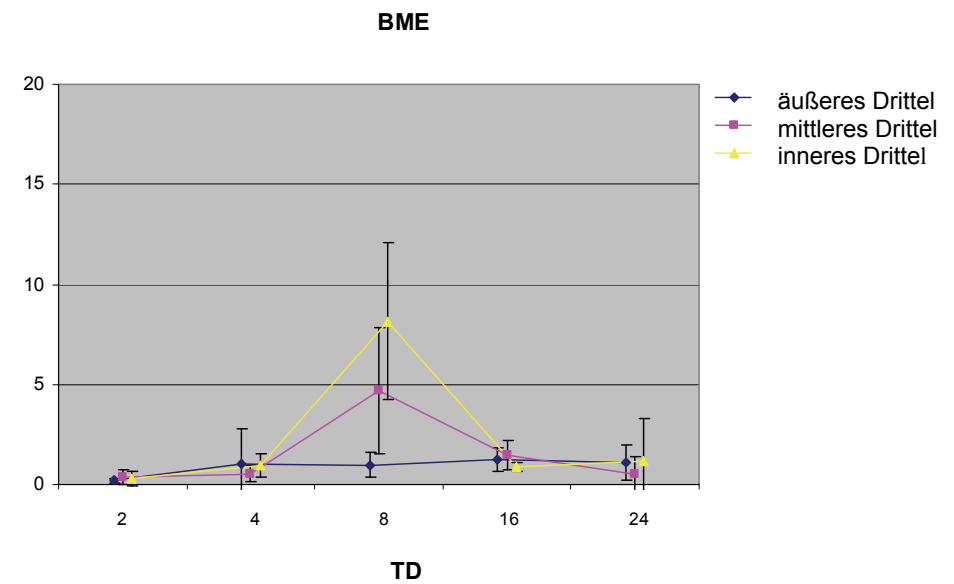
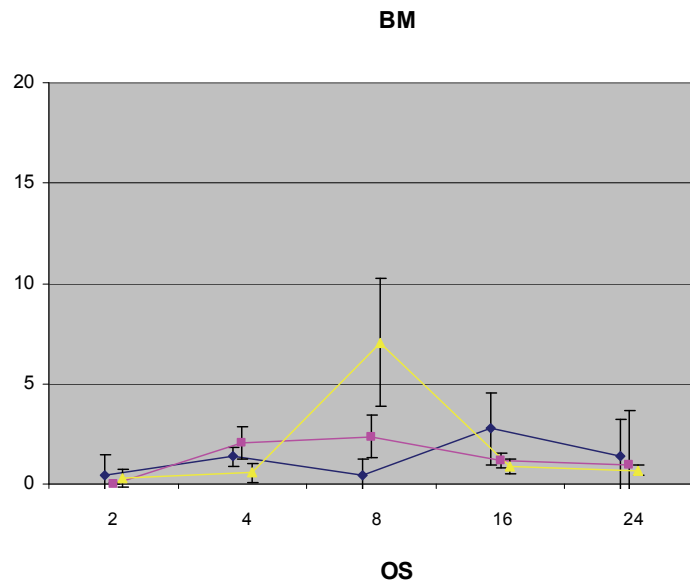


Abb. 26b: Grafische Darstellung der mittleren Blutgefäßdichten und Standardabweichungen der verschiedenen Layer in % nach unterschiedlichen Heilungsperioden

Tabelle 7 Deskriptive Statistik der erhobenen Blutgefäßdichten in den einzelnen Membranschichten

		BG		VN1		VN2		VN3		BM		BME		TD		OS	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
2 Wochen	äußeres Drittel	3,21	1,51	1,89	0,44	2,33	0,28	6,82	6,17	0,44	0,99	0,20	0,13	4,01	1,56	0,02	0,04
	mittleres Drittel	2,58	0,85	2,05	0,62	1,43	0,30	4,68	1,36	0,02	0,04	0,38	0,38	0,20	0,24	0,00	0,00
	inneres Drittel	1,56	0,77	2,27	0,39	1,96	1,16	4,30	1,99	0,30	0,43	0,27	0,38	0,11	0,12	0,00	0,00
4 Wochen	äußeres Drittel	1,41	0,94	3,11	0,56	5,43	5,57	5,90	0,67	1,38	0,48	1,06	1,71	4,29	1,63	0,04	0,09
	mittleres Drittel	11,64	5,71	2,16	2,27	1,93	1,69	3,62	0,51	2,06	0,82	0,54	0,40	1,14	0,75	0,00	0,00
	inneres Drittel	2,47	1,97	2,78	0,90	6,26	3,40	3,99	2,02	0,58	0,48	0,95	0,57	0,90	0,78	0,00	0,00
8 Wochen	äußeres Drittel	1,32	0,81	2,10	1,12	2,54	1,18	0,91	0,64	0,42	0,84	0,97	0,63	3,78	1,11	0,14	0,14
	mittleres Drittel	0,64	0,45	3,28	1,39	1,76	0,80	1,43	1,15	2,36	1,06	4,67	3,17	3,09	1,96	0,00	0,00
	inneres Drittel	1,56	0,72	1,86	0,45	2,51	0,31	1,60	0,70	7,07	3,20	8,16	3,93	1,61	0,31	0,00	0,00
16 Wochen	äußeres Drittel	1,91	0,57	3,35	1,05	3,43	1,24	2,04	0,60	2,75	1,82	1,26	0,59	4,36	1,12	0,00	0,00
	mittleres Drittel	0,74	0,29	0,67	0,23	2,28	1,48	1,85	1,36	1,15	0,37	1,47	0,76	3,80	2,05	0,00	0,00
	inneres Drittel	0,30	0,15	0,84	0,45	3,44	2,30	4,47	1,96	0,89	0,38	0,87	0,21	3,02	2,12	0,00	0,00
24 Wochen	äußeres Drittel	3,96	2,76	2,37	0,33	7,01	5,39	3,17	1,35	3,80	3,83	10,47	13,53	4,46	2,14	0,00	0,00
	mittleres Drittel	1,99	0,84	1,77	0,42	4,64	2,11	0,92	0,22	3,09	2,74	2,54	0,85	3,01	0,88	0,00	0,00
	inneres Drittel	1,53	0,60	1,29	0,58	3,23	1,07	0,62	0,25	0,89	0,26	6,14	8,32	1,90	0,23	0,00	0,00

Tabelle 8 Deskriptive Statistik der erhobenen Blutgefäßdichten gesamt

	BG		VN1		VN2		VN3	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
2 Wochen	2,45	1,04	2,07	0,48	1,91	0,58	5,27	3,17
4 Wochen	5,17	2,87	2,68	1,24	4,54	3,55	4,50	1,07
8 Wochen	1,17	0,66	2,41	0,99	2,27	0,76	1,31	0,83
16 Wochen	0,98	0,34	1,62	0,58	3,05	1,67	2,79	1,31
24 Wochen	2,49	1,40	1,81	0,44	4,96	2,86	1,57	0,61

	BM		BME		TD		OS	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
2 Wochen	0,25	0,49	0,28	0,30	1,44	0,64	0,01	0,01
4 Wochen	1,34	0,59	0,85	0,89	2,11	1,05	0,01	0,03
8 Wochen	3,28	1,70	4,60	2,58	2,83	1,13	0,05	0,05
16 Wochen	1,60	0,86	1,20	0,52	3,73	1,76	0,00	0,00
24 Wochen	2,59	2,28	6,38	7,57	3,12	1,08	0,00	0,00

Bei dem induktiven Vergleich der initialen Angiogenese nach zwei Wochen zeigten sich die signifikant höchsten Werte bei VN3 ($5,27 \pm 2,73$), gefolgt von BG ($2,45 \pm 0,88$), VN1 ($2,07 \pm 0,29$), VN2 ($1,91 \pm 0,55$) und TD ($1,44 \pm 0,53$). BME ($0,35 \pm 0,29$) und BM ($0,25 \pm 0,4$) waren signifikant geringer angiogenetisch erschlossen. Für OS ($0,01 \pm 0,01$) ließ sich sowohl nach zwei Wochen, als auch über den gesamten restlichen Studienzeitraum die geringste Blutgefäßinvasion in den Membrankörper nachweisen ($P < 0,05$, ANOVA, respektive).

DISKUSSION

In dieser Studie wurden verschiedene kollagene Membranen aus der GTR- und GBR-Therapie in-vitro und in-vivo auf die Aspekte morphologischer Aufbau, Biokompatibilität, Gewebeintegration, Biodegradation und transmembranöse Angiogenese untersucht.

Die Zellkulturexperimente mit humanen PDL-Fibroblasten, SaOs-2-Osteoblast-like-cells und humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) offenbarten eine signifikante Reduktion von Attachment und Proliferation auf allen untersuchten Kollagenmembranen im Vergleich zur Kontrolle. Auf der Oberfläche adhärente PDL-Fibroblasten pro mm² zeigten nach sieben Tagen folgende Reihenfolge: CD (Kontrolle, 434 ± 76) > BG (64 ± 19) = OS (61 ± 8) = VN (57 ± 16) > TD (44 ± 4) > BM (12 ± 5). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die SaOs-Osteoblasten beobachtet: CD (453 ± 92) > BG (94 ± 46) = TD (84 ± 49) = VN (63 ± 33) > OS (41 ± 23) > BM (0). Die HUVEC-Zellversuche offenbarten nach sieben Tagen folgende Zellzahlen in 1000: CD ($19,8 \pm 3,2$) > BG ($1,3 \pm 0,3$) = OS ($1,2 \pm 0,2$) = TD ($1,2 \pm 0,3$) = VN ($1,0 \pm 0,2$) > BM ($0 \pm 0,1$). Dabei war eine signifikante Proliferation der Zellen über die Zeit allein auf der Oberfläche der Positivkontrolle nachweisbar. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung ergab eine vergleichbare Zellmorphologie der PDL-Fibroblasten mit guter Anhaftung und Ausbildung von Filopodien für die Kontrollgruppe und alle Membranen außer BM. Die Zellmorphologie der SaOs-2-Osteoblasten zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Affinität zur Oberfläche mit deutlich erkennbarer Abkuglung des Zellkörpers und ohne Ausbildung von Zytoplasmaausläufern. Auf BM waren nur wenige abgekugelte PDL-Zellen und keine SaOs-2-Zellen nachweisbar.

Die HE-Schnitte der mit HUVEC-Zellen inkubierten Proben offenbarten deutliche Unterschiede hinsichtlich des morphologischen Aufbaus der Kollagenmembranen: BioGide®, VN und Tutodent® wiesen als einzige Bilayermembranen die Struktur eines interkonnektierenden Porensystems auf. Im Gegensatz zu BG war die TD-Membran jedoch deutlich kompakter, womöglich als Resultat der dichten Struktur des bovinen Perikards. Im Gegensatz hierzu erschien das BM-Kollagen eher geschichtet. Zwischen den einzelnen Schichten waren weite Hohlräume erkennbar, die nicht miteinander in Verbindung standen. Von allen untersuchten Produkten zeigte OS die kompakteste Struktur ohne erkennbare Zwischenräume.

Bezüglich des HUVEC-Wachstumsmusters offenbarte sich ein nur sehr oberflächliches Einwachsen von vereinzelt Endothelzellen in die offenporige Struktur von BG, VN und TD. OS zeigte aufgrund der kompakten Struktur keine Zellen innerhalb des Membrankörpers. Auf BM waren erneut keine Zellen nachweisbar. Es ließ sich folgern, dass die Glutaraldehyd-Quervernetzung von BM einen hemmenden Einfluss auf PDL-Fibroblasten und einen zytotoxischen Effekt auf SaOs-2-Osteoblasten und HUVEC-Zellen hatte. BG, TD und OS wiesen eine gute Biokompatibilität auf, während die kompakte Struktur von OS das Einwachsen von Zellen erschwert. Die experimentelle chemische Quervernetzung von VN schien die hohe Biokompatibilität von nativem porkinen Typ I und III-Kollagen nicht negativ zu beeinflussen.

In dem tierexperimentellen Teil dieser Studie wurden über einen Zeitraum von 24 Wochen neben der Biodegradation die Gewebeintegration, die Vaskularisation der Membran sowie das Auftreten mehrkerniger Riesenzellen und Makrophagen als Zeichen einer Fremdkörperreaktion bewertet. Die histomorphometrische Analyse des Tierversuches ergab eine ca. 30 % dickere Membranstruktur von BME gegenüber BM. Die höchste Gewebeintegration und Vaskularisation zeigten BG und VN1-3, gefolgt von BM, BME und TD. OS war vom umgebenden Bindegewebe durch einen schmalen Spalt getrennt und zeigte selbst nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Wochen keine Anzeichen einer Vaskularisation oder Kollagen-Resorption. Die histomorphometrische Auswertung ergab die nachfolgenden Resorptionszeiten: BG (2-4 Wochen), VN1 (4 Wochen), VN2 (4 – 8 Wochen), BM und BME (4-8 Wochen), TD und VN3 (8-16 Wochen) und OS (>24 Wochen). Die Biodegradation von VN1, BM, BME und TD war von leicht ausgeprägten entzündlichen Reaktionen sowohl im Randbereich als auch im Inneren der Membran begleitet. VN2 und VN3 zeigten etwas stärkere Entzündungsreaktionen und ein gehäuftes Auftreten mehrkerniger Riesenzellen. Die immunhistologischen Untersuchungen der Blutgefäßinvasion über die Zeit offenbarten, dass sich die Membranen auch in Hinblick auf die frühzeitige transmembranöse Angiogenese signifikant unterscheiden. Die immunhistochemische Charakterisierung (Transglutaminase II) der initialen Vaskularisation zeigte, dass die transmembranöse Angiogenese von BG und VN1-3 bereits nach zwei Wochen abgeschlossen war. Im Vergleich hierzu waren BM, BME und TD erst nach einem

Beobachtungszeitraum von vier bis acht Wochen angiogenetisch erschlossen. Im Vergleich der initialen Angiogenese nach zwei Wochen zeigte VN3 ($5,27 \pm 2,73$) die höchste Blutgefäßdichte innerhalb des Membrankörpers, gefolgt von BG ($2,45 \pm 0,88$), VN1 ($2,07 \pm 0,29$), VN2 ($1,91 \pm 0,55$), TD ($1,44 \pm 0,53$), BME ($0,35 \pm 0,29$) und BM ($0,25 \pm 0,4$). Für OS konnte immunhistochemisch keine Vaskularisation bis zu 24 Wochen nach Implantation nachgewiesen werden.

Der in-vitro Anteil dieser Untersuchung wurde durchgeführt, um die Zellanlagerung, -proliferation und Morphologie von PDL-Fibroblasten und SaOs-2-osteoblastenähnlichen Zellen sowie humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen auf tierischen, für die Anwendung als Barriere-Membran aufbereiteten Typ I und III-Kollagenen zu untersuchen. Das Biomaterial Kollagen hat sich in der Vergangenheit als sehr geeignetes Material für chirurgische Eingriffe etabliert. Es konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass Kollagene eine aktive Rolle bei der Aktivierung der Blutgerinnung und damit in der Entstehung des für die Wundheilung wichtigen Blutkoagulums spielen. Zudem hatte es eine chemotaktische Wirkung auf PDL-Fibroblasten und Gingivafibroblasten und liefert eines der Hauptkomponenten des parodontalen Halteapparates (Postlethwaite et al. 1978; Yaffe et al. 1984; Hutmacher et al. 1996; Locci et al. 1997). Tatsächlich war die Proliferation aller drei Zelllinien auf den getesteten Kollagenen jedoch deutlich geringer als auf den Kontroll-Plastikoberflächen. Dies spricht für eine negative Beeinflussung der initialen Anlagerung und Proliferation der Zellen. Zudem schien die glutaraldehydvernetzte BM eine zytotoxische Wirkung auf die getesteten Zelllinien zu unterhalten. Diese Ergebnisse decken sich jedoch sehr gut mit anderen Studien, die sich ebenfalls mit der Anlagerung und Proliferation von PDL-Fibroblasten und Osteoblasten auf GTR-Membranen beschäftigt haben (Takata et al. 2001a, 2001b; Wang et al. 2002). Takata et al. (2001a) untersuchten Attachment, Proliferation und Differenzierung von PDL-Fibroblasten, welche aus Rattenkiefern gewonnen wurden. Sie fanden heraus, dass das initiale Zellattachment nach eineinhalb Stunden auf BM signifikant geringer war als auf einer anderen bovinen Typ I und III-Kollagenmembran (TissueGuide, TG), Polylactid/Polyglycolid-Membranen, expandiertem Polytetrafluorethylen (e-PTFE) und der Standardplastikoberfläche. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie zeigte jedoch auch BM fünf Stunden nach Inkubation signifikant

höhere Zellzahlen als nach 1,5 Stunden, was für eine Proliferation der PDL-Zellen spricht. Tatsächlich sind die beiden Studien jedoch nur sehr eingeschränkt zu vergleichen, da die geringste Kulturdauer der vorliegenden Arbeit im Falle der PDL-Fibroblasten sieben Tage betrug und daher keine Aussage über initiale Anlagerungsvorgänge getroffen werden können.

Wang et al. (2002) untersuchten in-vitro die initiale Anlagerung und Proliferation von Maus-(MC3T3-E1) Osteoprogenitorzellen auf unterschiedlichen GTR-Membranen aus Kollagen, Polylactid und Polyglycolid. Sie verwendeten eine Celluloseester-Membran der Firma Millipore (MF) als Kontrolle. Als Kulturdauer wurden 1,5 Stunden und 24 Stunden gewählt. Als Ergebnis zeigte MF ebenso wie die Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit statistisch signifikant höhere Werte als alle getesteten GTR-Membranen. So waren auf MF nach 1,5 Stunden 27.5 ± 2.1 und nach 24 Stunden 67.6 ± 3.6 Zellen/mm² nachweisbar. Für BM konnten nach 1,5 Stunden 14.5 ± 1.4 und nach 24 Stunden 15.4 ± 0.9 Zellen/mm² nachgewiesen werden. Die Zellanzahl von BM war nach 24 Stunden nicht signifikant unterschiedlich zu den 1,5 Stunden Ergebnissen. Die ebenfalls getesteten Polylactid/Polyglycolidmembranen zeigten sehr ähnliche Ergebnisse wie BM. Die Autoren folgerten, dass BM die frühe Osteoblastenanlagerung unterstützt. Allerdings musste einschränkend angemerkt werden, dass die Zellen im weiteren Verlauf über 1,5 h hinaus offenbar nicht auf BM proliferieren konnten. Die Zellzahlen blieben auf dem gleichem Level wie nach 1,5 Stunden Kulturdauer, während die Kontrolloberflächen eine deutliche Zunahme bis auf mehr als das Doppelte zeigten. Die fehlende Proliferation mag an der Aufbereitungstechnik des BM-Kollagens gelegen haben, welches zur Verbesserung der Resorptionsstabilität des ansonsten sehr schnell biodegradierbaren Ursprungskollagens eingesetzt wird (Kodama et al. 1989; Minabe et al. 1989; Quteish & Dolby 1992; Brunel et al. 1996; Zahedi et al. 1998; Bunyaratavej & Wang 2001). Gerade das Cross-linking mit Glutaraldehyd zeigte auch in anderen Studien eine Verringerung der Membran-Biokompatibilität bis hin zu zytotoxischen Effekten (Speer et al., 1980; Wiebe et al., 1988).

Takata und Mitarbeiter untersuchten auch den Einfluss der Kollagenmembranen auf die Migration von Maus-Osteoprogenitorzellen (MC3T3-E1). Zellen auf BM, TG und MF zeigten hierbei initial gleiche Migrationsraten wie auf der Zellkulturoberfläche (Takata et al. 2001b). Nach fünf Tagen war die Zellmigration auf BM jedoch signifikant langsamer als bei den anderen Membranen.

Die zu der vorliegenden Arbeit zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse könnten in dem angewandten Studiendesign begründet liegen – so wurden zwar in allen Studien BM und andere Kollagene untersucht, der Unterscheidung nach nativem und nicht-nativem Kollagen wurde jedoch ebenso wenig nachgegangen wie den unterschiedlichen Vernetzungsmethoden. Stattdessen wurden Kollagene stets mit anderen Membranmaterialien wie PLA (Polylactide) und PGA (Polyglycolide) verglichen. Zudem nutzten Takata et al. (2001a) PDL-Fibroblasten aus Ratten und Takata et al. (2001b) und Wang et al. (2002) Maus-Osteoprogenitorzellen (MC3T3-E1). In unserer Studie hingegen wurde darauf geachtet, nur menschliche Zellen wie humane PDL-Fibroblasten, SaOs-2 Osteoblast-like-Zellen und HUVEC-Zellen zu verwenden.

Wenngleich die SaOs-2-Zellen keine primäre Osteoblastenzelllinie sind, sondern aus einem Osteosarkom isoliert wurden, haben verschiedene Arbeiten sie als Zelllinie mit sehr knochenzellähnlichen Eigenschaften charakterisiert (Murray et al., 1987; Rodan et al., 1987). Dennoch muss einschränkend angemerkt werden, dass Versuche mit transformierten Zelllinien eigenen Limitationen unterliegen. So reagierten in Langzeit-Mineralisationsstudien normale humane Osteoblastenlinien in gleicher Weise auf Implantatoberflächen wie SaOs-2-Osteoblasten, allerdings mit 2/3 geringerer Kalzifizierungsrate (Ahmad et al., 1999). In diesem Zusammenhang darf zudem eine weitere Studie angesprochen werden, die in-vitro für BG eine hervorragende Biokompatibilität ebenfalls mit humanen PDL-Fibroblasten und SaOs-2-Osteoblasten aufzeigen konnte (Alpar et al., 2000). Diese Ergebnisse in Verbindung mit den Resultaten der vorliegenden Untersuchung lassen die Vermutung zu, dass die konträren Beobachtungen der anderen Studien (Takata et al. 2001a, 2001b; Wang et al. 2002) unter anderem in der Art der Zelllinie (animal vs. human) begründet liegen könnten. Die Tatsache, dass die mittleren Zellzahlen aller drei Zelllinien deutlich größer auf der Kontrolloberfläche waren als auf den GTR-Membranen, wurde auch in den anderen bereits angesprochenen Publikationen (Takata et al. 2001a; Wang et al. 2002) beobachtet.

Zum Literaturvergleich der Ergebnisse der HUVEC-Zellen existieren im Wesentlichen zwei andere Studien, welche sich mit der Anlagerung und Proliferation von umbilikalen Venenendothelzellen auf Kollagenmembranen beschäftigen. Breithaupt-Faloppa et al. (2004) untersuchten die endotheliale Zellreaktion auf eine nicht-quervernetzte Kollagenmembran (Lycoll, Resorba, Nürnberg) über einen

Zeitraum von einem, sieben und 14 Tagen. Als Kontrolle diente – ebenso wie in der vorliegenden Arbeit – Gelatine-beschichtetes CD-Plastik. Zudem wurden die Zellen auf die Expression von Integrinen ($\alpha 5\beta 1$ und $\alpha(v)\beta 3$) sowie die Synthese von Fibronectin und Vitronectin untersucht. Die Ergebnisse zeigten signifikant geringere Zellzahlen auf der Membran als auf der Kontrolloberfläche, was auch der vorliegenden Beobachtung entspricht. Allerdings war für beide Gruppen eine zum 7. und 14. Tag signifikante Zunahme der Zellzahl zu beobachten (Breithaupt-Faloppa, Kleinheinz et al., 2006), während in unserer Studie weder nach drei, noch nach sieben Tagen eine Proliferation von HUVEC-Zellen auf einer der Membranen festgestellt werden konnte. Diese konträren Ergebnisse könnten in den unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der getesteten Kollagene begründet liegen. Zumindest zeigten die Zellen bei Breithaupt-Faloppa auf dem Lyocoll-Kollagen bei ausgeprägter Expression von $\alpha 5\beta 1$ (24h) und $\alpha(v)\beta 3$ nach 7 und 14 Tagen keine Produktion von Vitronectin. Dieses stellt das ebenfalls einen wichtigen Faktor für die Anlagerung an Oberflächen dar. In einer anderen aktuellen Studie wurde BM auf seine Eignung für den Gefäßersatz untersucht (O'Cearbhaill et al., 2006). Hierfür wurde die Membran neben anderen Experimenten bezüglich mechanischer Festigkeit und enzymatischer Degradation auch einer Inkubation mit HUVEC-Zellen unterzogen. Als Testsystem kam ein Almar-Blue-Proliferationstest über den Zeitraum von einem, drei und sieben Tagen zur Anwendung. Zudem fand ein Live/Dead-Viability/Cytotoxicity-Kit mit Calcein-A-Mand-Ethodium-Homodimer-1 Verwendung. Dieser färbt für die Beurteilung der Vitalität von Zellen lebende Zellen grün und Zellkerne toter Zellen rot. Als Kontrolle diente wiederum CD, allerdings ohne die Angabe einer für Attachment und Proliferation von HUVEC-Zellen eigentlich unabdingbaren vorherigen Gelatinebeschichtung (Muruyama et al., 1963; Jaffe et al., 1973).

Die Ergebnisse der Almar-Blue-Analyse in Abb. 27 zeigen die Ergebnisse der Proliferationstests: Während auf der Zellkulturoberfläche eine hohe Anzahl von Zellen nach einem, drei und sieben Tagen nachweisbar ist, zeigt BM zu keinem der

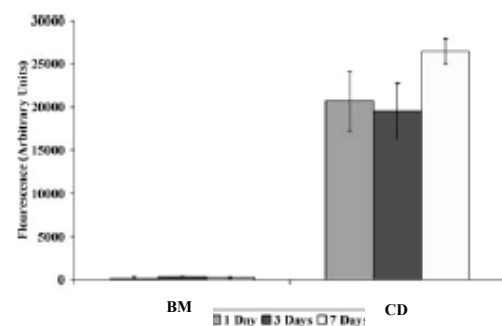


Abb. 27: Ergebnisse O'Cearbhaill et al., 2006

Zeitpunkte eine eindeutige Zellanlagerung oder –proliferation. Die Zellkulturoberfläche offenbarte nach drei Tagen leicht geringere Zellzahlen als nach einem Tag, um dann zum siebten Tag signifikant anzusteigen. Der zudem durchgeführte Live/Dead-Test konnte visualisieren, dass nach einem Tag nur vereinzelt lebende Zellen auf BM nachweisbar waren. Am 3. Tag waren lebende Zellen nur noch sehr selten nachzuweisen, während nach sieben Tagen nur noch tote Zellen beobachtet werden konnten. Diese Ergebnisse entsprechen vollständig den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtung einer Abnahme der Zellzahl auf BM bis auf Null, wenngleich hier die Kontrollgruppe – vermutlich durch die bei O’Cearbhaill fehlende Gelatine-Beschichtung – ein exponentielles Wachstum über die gesamte Studiendauer zeigte. Trotz sehr positiver Einschätzung sowohl der mechanischen Festigkeit als auch der enzymatischen Degradation von BM schlossen die Autoren aufgrund des sehr negativen Einflusses auf die Endothelzellproliferation, dass das BM-Kollagen nicht als resorbierbarer Gefäßersatz eingesetzt werden sollte (O’Cearbhaill et al., 2006).

Neben der chemischen Zusammensetzung von Biomaterialien haben auch physikalische Oberflächeneigenschaften einen wichtigen Einfluss auf Zelladhäsionsvorgänge. Raue und texturierte Oberflächen scheinen im Allgemeinen initiales Zellattachement zu unterstützen (Brunette, 1988). In Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten annähernd glatte oder fein texturierte Oberflächen bevorzugen, während Osteoblast-like-cells besser auf rauen Oberflächen anheften und dort eine höhere Mineralisation zeigen (Bowers et al., 1992; Kononen et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit zeigten PDL-Zellen auf TD, BG, VN und OS eine flache Konfiguration, während die Osteoblast-like-cells eher kugelig erschienen. Hier kann die im Rasterelektronenmikroskop beobachtbare Zellmorphologie als Indikator für die Affinität adhärenter Zellen zum unterliegenden Substrat angesehen werden. So sind flache Zellen über eine hohe Anzahl an Zytoplasmaausstülpungen und Lamellopodien fest mit dem unterliegenden Material verbunden (Trylovich et al., 1992). Für Zellen, die eine kugelförmige Erscheinung auf einer Oberfläche zeigen, wurden geringere Proliferationsraten beschrieben als für Zellen mit flacher Morphologie (Folkman et al., 1978; Archer et al., 1982). Es kann gefolgert werden, dass die getesteten Membranen in-vitro bessere Eigenschaften für das Attachment und die Proliferation von Fibroblasten als für Osteoblasten

aufweisen. Die BM-Oberfläche schien für keine der getesteten Zelllinien geeignet zu sein, hier wurden keine SaOs-2-Osteoblasten und nur einige wenige runde PDL-Fibroblasten beobachtet. Neben physikalischen Eigenschaften könnte auch die Quervernetzung mit Glutaraldehyd eine wesentliche Rolle bei der Verringerung der Biokompatibilität gespielt haben (Speer et al. 1980; Wiebe et al. 1988). Die Membranen VN, TD und OS wurden bisher in keiner veröffentlichten Studie auf ihre Biokompatibilität untersucht. Aus diesem Grund kann hier auch kein Vergleich zu anderen Daten gezogen werden. Im Falle der VN-Membran kann jedoch festgestellt werden, dass die chemische Quervernetzung in-vitro die Biokompatibilität des BG-Kollagens nicht negativ beeinflusst hat. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die in einer in-vitro Untersuchung ermittelten Daten keine allgemeingültige Aussage über die zelluläre Gesamtreaktion auf ein Biomaterial zulassen. In einer in-vitro Situation fehlen die komplexen Interaktionen zwischen einzelnen Zellen und der Interzellulärsubstanz. Um einige weitere Aspekte der Membranen genauer zu betrachten, wurde daher der Tierversuch angeschlossen.

Die in-vivo Anteile der vorliegenden Arbeit hatten zum Ziel, den Einfluss verschiedener Quervernetzungs- und Herstellungsverfahren von GTR/GBR-Membranen auf Biodegradation, Gewebeintegration, zelluläre Reaktion und Vaskularisierung zu untersuchen. Hierbei kam zum Vorschein, dass vor allem die Implantation von nativem Typ I und II (BG) zu einer perfekten Gewebeintegration und Vaskularisierung führt. Es waren keine mehrkernigen Riesenzellen erkennbar. Auf der anderen Seite musste jedoch festgestellt werden, dass diese Membran innerhalb von vier Wochen Heilungsperiode bereits vollständig abgebaut war. Diese Beobachtung deckt sich sehr gut mit einer anderen Tierstudie, in der BG in chirurgisch gebildete Taschen bei Hunden implantiert wurde (Owens and Yukna, 2001). Die Autoren beschrieben eine mittelmäßige bis starke Biodegradation von BG innerhalb von vier bis acht Wochen. Diese recht schnelle Biodegradationszeit mag neben der fehlenden Quervernetzung ein Effekt der nativen Struktur von BG sein, zumal sich in den HUVEC-Präparaten ebenso wie bei den Zwei-Wochen-Histologien des Tierversuches als sehr offenporig darstellte. Die beobachtete kurze Barrierefunktion steht in gewissem Widerspruch zu dem ursprünglich beschriebenen GTR-Prinzip der Einlage einer mechanischen Barriere zur Fernhaltung

unerwünschter Zelltypen (Nyman et al., 1982, Gottlow et al, 1984). Auf der anderen Seite erlaubt die rasche Vaskularisierung und Biodegradation einer offenporigen Membran eine schnelle Wiederherstellung der Ernährungsfunktion von Seiten des aufliegenden Periostes. Dies könnte einen Vorteil für die Hartgewebsheilung nach GTR- und GBR-Eingriffen darstellen (Hurley et al., 1959). Tatsächlich wurden in verschiedenen histologischen Studien nachgewiesen, dass die Anwendung von BG in Verbindung mit porösen Knochenersatzmaterialien zu einer knöchernen oder auch parodontalen Regeneration mit Ausbildung neuer Sharpey'scher Fasern führt (Camelo et al. 1998, 2001; Yamada et al. 2002).

Im Gegensatz zu BG schien die Anwendung von bovinem Kollagen Typ I und Elastin aus Rinderperikard (TD) einer deutlich verzögerten Biodegradation zu unterliegen. Dies mag in der sehr kompakten Struktur von TD begründet liegen, die bereits auf rein physikalischem Wege eine deutlich stärkere Barriere für die Einwanderung von Zellen und subsequente Penetration durch Blutgefäße darstellt. In einer anderen Studie wurde der bindegewebige Ersatz von TD nach subkutaner Implantation in Ratten innerhalb eines Zeitraumes von 42 Tagen beschrieben (Unsal et al., 1997). Hier muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass die Membranen nicht wie in der vorliegenden Arbeit durch Faltung um einen Polycarbonat-Spacer nur zu einer Seite hin offen implantiert wurden. Sie wurde als einfaches Layer eingelegt, so dass die zelluläre Invasion von beiden Seiten stattfinden konnte, was die Resorptionsgeschwindigkeit deutlich beschleunigt. In der klinischen Anwendung liegt die Membran einem erst noch zu organisierenden Augmentat auf, aus dem zumindest in der initialen Heilungsphase keine Resorption der Barriere zu erwarten ist.

In einer Studie zum Abbau von Kollagen nach Exposition zur Mundhöhle konnten Paul et al. (1992) demonstrieren, dass bovines Typ I-Kollagen bei offener Einheilung in der Mundhöhle einer deutlich schnelleren Resorption unterliegt. In dieser bei Menschen durchgeführten Studie waren bereits nach sieben Tagen Heilungsperiode histologisch keine Reste der Membran nachweisbar (Paul et al., 1992). Diese Beobachtung schränkt die Übertragung von subkutan ermittelten Resorptionszeiten in der Ratte zur klinischen Situation beim Menschen weiter ein. Neben der erhöhten Umsatzgeschwindigkeit von Ratten im Vergleich zum Menschen sind bei intraoralen Implantationen gerade nach Exposition verschiedene Paraodontalkeime zu berücksichtigen, denen die Fähigkeit einer Kollagenasebildung

zugeschrieben wird. Eindeutig nachgewiesen wurde dies für *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola*, deren Anwesenheit zu einer frühzeitigen Degradation von Kollagenmembranen führte (Sela et al. 2003).

Die quervernetzten Membranen VN1-3, BM, BME und OS zeigten eine im Vergleich zu BG deutlich verlängerte Biodegradationszeit. Offenbar hatte hier eine chemische und enzymatische Quervernetzung zu einer Resorptionsverlangsamung geführt, was auch bereits in anderen tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte (Pitaru et al. 1988; Paul et al. 1992). Auf der anderen Seite ging diese reduzierte Resorption bei BM, BME und OS mit einer Verringerung der Gewebeintegration einher; diese Implantate zeigten im Gegensatz zu VN1-3 und BG histologisch eine deutliche Spaltbildung um die Membranen. Wenngleich der eigentliche Split vermutlich erst als Artefakt der histologischen Aufarbeitung entstanden ist, so kann eine solche Aufspaltung zweier Gewebe zumindest als Zeichen einer fehlenden zellulären Anheftung angesehen werden. Im Falle von BM und BME kann die schlechte Gewebeintegration unter anderem durch die stark eingeschränkte Biokompatibilität erklärt werden. So zeigte BioMend® in-vitro keine SaOs-2- und HUVEC-Zellen und nur eine minimale Anzahl von primären PDL-Fibroblasten auf der Oberfläche. Die möglicherweise hierfür verantwortlichen zytotoxischen Effekte von Glutaraldehyd-Quervernetzungen wurden auch bereits in anderen Studien beobachtet (Speer et al. 1980; Wiebe et al. 1988). Allerdings konnte histologisch auch gezeigt werden, dass sowohl die Anwendung von BM als auch von BG in-vivo bei periimplantären Dehiszenzen zu einer verbesserten Knochenregeneration führt (Oh et al. 2003).

Die enzymatisch vernetzte Ossix®-Membran zeigte bei der Inkubation mit den drei getesteten Zelllinien vergleichbare Zellzahlen wie BG und TD. Der perimembranöse Spalt als Zeichen einer fehlenden Gewebeintegration steht daher in einem gewissen Gegensatz zum guten in-vitro Attachment. Sie war zudem nach 24 Wochen Heilungsperiode im Tierversuch im Gegensatz zu den anderen Membranen nicht annähernd resorbiert. In diesem Zusammenhang muss angemerkt werden, dass in-vitro Experimente stets nur einen kleinen Teil der tatsächlichen in-vivo Physiologie isoliert betrachten. Sie sind daher nur bedingt mit der tatsächlichen Situation im Organismus zu vergleichen. Die Tatsache, dass nach 24 Wochen nur eine minimale oberflächliche Aufspaltung der Membran zu

beobachten war, stellt eine klinisch akzeptable Biodegradation des OS-Kollagens in Frage. Hier sind die Ergebnisse einer klinisch-histologischen Studie zu berücksichtigen, bei der die Anwendung von OS bei GBR-Eingriffen in Verbindung mit einem deproteinierten bovinen Knochenmineral untersucht wurde (Friedmann et al. 2001). Es wurde beobachtet, dass Anteile von OS auch nach sieben Monaten Heilungsperiode histologisch nachgewiesen werden konnten. Allerdings konnte unter anderem eine direkte Anlagerung von Binde- und Knochengewebe an die Membran beobachtet werden. Zudem wurde von den Autoren betont, dass das Auftreten einer Membranexposition eine sekundäre Epithelialisierung des exponierten Areals vom Randbereich induzierte und zum sekundären Wundverschluss mit unmittelbar unterliegender knöcherner Regeneration geführt hatte (Friedmann et al. 2001, 2002). Klinisch scheint somit auch OS als Membran für GTR- und GBR-Eingriffe geeignet zu sein, auch wenn es eine frühzeitige Angiogenese des Wundareals unterbindet.

Die Tatsache, dass diese Studie die erste Untersuchung des neu entwickelten, chemisch quervernetzten porkinen Typ I und III-Kollagens (VN1-3) ist, erschwert den Vergleich zu anderen Studien. Es konnte jedoch sehr eindeutig festgestellt werden, dass die Resorptionszeit sich proportional zum Vernetzungsgrad verhielt: je stärker die Quervernetzung, desto langsamer die Biodegradation. Es war zudem um keine der VN-Membranen ein periimplantärer Spalt als Zeichen einer durch die Quervernetzung eingeschränkten Gewebeintegration ersichtlich. Dies bestätigt die zu BG vergleichbaren Ergebnisse der in-vitro Experimente. Vernetzungsgradabhängig war jedoch eine verstärkte Invasion von mehrkernigen Riesenzellen im Sinne einer Fremdkörperreaktion zu beobachten. Gerade im Fall von VN2 und VN3 schien der Kollagenabbau durch die Einwanderung von Entzündungszellen dominiert zu werden. Hier muss berücksichtigt werden, dass auch eine Fremdkörperreaktion die Gewebeintegration eines Materials beeinflusst. Die Interaktion der Entzündungszellen schränkt die Anlagerung und Proliferation von Fibroblasten ein und kompromittiert über eine verringerte Kollagenproduktion die Festigkeit des Gewebeverbundes (Somerman et al. 1991). Entzündungszellen waren in geringerem Maße allerdings auch am Abbau von BM und BME und der eigentlich nativen TD-Membran beteiligt.

In der immunhistochemischen Auswertung der transmembranösen Angiogenese wurde deutlich, dass sich das Wachstumsmuster von Blutgefäßen innerhalb der Membrankörper deutlich unterscheidet. BG und VN1-3 zeigten eine homogene und nahezu vollständige Einsprossung von Blutgefäßen in den gesamten Membrankörper bereits nach zwei Wochen Heilungsperiode. Im Gegensatz dazu offenbarten BM, BME und TD eine deutlich verzögerte Angiogenese. Hier waren nach zwei Wochen nur im äußeren Layer Blutgefäße nachweisbar. Für BM, BME und TD war ein signifikantes Ansteigen der Gesamt-Blutgefäßquerschnittsfläche erst nach vier bis acht Wochen Implantationszeit festzustellen. Allerdings fiel für BM und BME dieser Anstieg, wie in der histomorphometrischen Analyse der Biodegradation deutlich wurde, mit einer maximalen Abnahme des ursprünglichen Membrandurchmessers zusammen. Nach acht Wochen waren BM und BME auf eine dünne Kapsel um den Spacer zusammengefallen, so dass die hohen Blutgefäßwerte dem offenbar stattgefundenen Membrankollaps und nicht der Neubildung von Blutgefäßen zugeschrieben werden muss. Aus diesem Grund waren die Acht-Wochen-Werte von BM und BME nicht mit der sukzessiven angiogenetischen Erschließung der anderen untersuchten Membranen vergleichbar.

OS zeigte keine Blutgefäße im Membrankörper über den gesamten Studienzeitraum. Diese Beobachtung mag auf zwei synergistischen Effekten beruhen: Wie sich bereits in den HUVEC-Histologien herausstellte, unterschieden sich die Membranen sehr deutlich hinsichtlich ihres morphologischen Aufbaus. OS erschien am kompaktesten und zeigte im Gegensatz zu allen anderen Membranen keine Zwischenräume innerhalb des Membrankörpers, in die die HUVEC-Zellen ohne Resorption des Materials hätten einwachsen können. BG, VN und TD zeigten hingegen eine offenporige Struktur und erlaubten zumindest oberflächlich das Einwachsen der endothelialen Zellen. Die fehlende Zellinvasion bei BM trotz vorhandener Membranzwischenräume wurde bereits an anderer Stelle diskutiert (Speer et al. 1980; Wiebe et al. 1988). Wie zudem deutlich wurde, wurde das OS-Kollagen über den gesamten Studienzeitraum von 24 Wochen nicht resorbiert. Durch diese fehlende Biodegradation blieb die Membran auch über den gesamten Studienzeitraum kompakt und verhinderte die Einsprossung von Blutgefäßen nicht nur initial, sondern über die gesamte Implantationszeit.

Entsprechend der aktuellen Ergebnisse scheint das Angiogenesemuster stark von der spezifischen Struktur der jeweiligen Membranen abhängig zu sein. Eine biokompatible Membran konnte nur dann schnell angiogenetisch erschlossen werden, wenn sie sehr offenporig war, was die primäre Einwanderung von Gefäßen begünstigte (BG, VN1-3). Oder die Membran war zwar kompakt, wurde aber zeitgerecht resorbiert, um Platz für einwachsende Kapillaren zu schaffen (TD). Die offenporigsten Membranen BG und VN1-3 schienen am besten eine frühzeitige transmembranöse Angiogenese zu gewährleisten. Innerhalb dieser Gruppe schien zudem der Grad der Quervernetzung positiv mit der Blutgefäßdichte korreliert, so dass die VN3-Membran die höchsten Blutgefäßdichten nach zwei Wochen zeigte. Andererseits war in der Histologie auch die entzündliche Reaktion um die VN3-Implantate am größten und ebenfalls vom Grad der Quervernetzung abhängig. Dabei erscheint es offensichtlich, dass gerade entzündliche Reaktionen und die damit verbundene Hyperämie eine verbesserte Angiogenese begünstigen, zumal die Rötung eines der Grundsymptome von entzündlichen Vorgängen darstellt. Bei allen Kollagen Typ I und III-Membranen war bereits nach zwei Wochen Implantationszeit das innere Layer von Blutgefäßen erreicht und somit die transmembranöse Angiogenese abgeschlossen. Dies erschwert die Beurteilung, ob die vermehrte Invasion von Entzündungszellen mit der Angiogenese in einen zeitlichen Zusammenhang gebracht werden kann. Hier wäre die Untersuchung auch früherer Zeitpunkte wünschenswert, um den genauen Ablauf der initialen Blutgefäßeinsprossung und Entzündungszellinvasion genauer zu untersuchen.

Es bleibt anzumerken, dass sich die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung nicht vollständig mit den Beobachtungen aus der konventionellen Histologie decken. In beiden Ansätzen wurde eine komplette Vaskularisierung von BG nach zwei Wochen und von BM, BME und TD nach vier bis acht Wochen beobachtet. Es erschien in der konventionellen Histologie jedoch der Anschein, dass die VN-Membranen erst zu einem späteren Zeitpunkt (vier bis acht Wochen) als in der Immunhistochemie (zwei Wochen) vollständig angiogenetisch erschlossen waren. Hierbei ist anzumerken, dass das verwendete Protokoll mit primären monoklonalen Mäuseantikörpern gegen Transglutaminase II ein sehr weit verbreitetes und akzeptiertes Protokoll zum Nachweis der

Angiogenese darstellt (Haroon, Hettasch et al., 1999; Buemi, Galeano et al., 2004). Demnach zeigen die Daten aus der Immunhistochemie verlässlicher das tatsächliche Bild der Angiogenesestruktur an.

Wie bereits erwähnt wurde, soll eine Membran, die eine frühzeitige Angiogenese und Anschluss der Blutgefäße des Wundgebietes zum gebildeten Mukoperiostlappen erlaubt, die Geweberegeneration bei oral- und parodontalchirurgischen Eingriffen positiv beeinflussen (Hardwick et al. 1994). Diese Hypothese wird durch die Grundlagen der Knochenentstehung unterstützt. Es wurde berichtet, dass sich osteogenetische Zellen aus undifferenzierten mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmarkstroma und aus Perizyten kleinerer Blutgefäße des Bindegewebes entwickeln können (Long et al. 1995; Rickard et al. 1996; Reilly et al. 1998). Zudem besteht eine enge räumliche und zeitliche Verbindung zwischen der Neubildung von Blutgefäßen und extraskelettaler Knochenneubildung (Schmid et al. 1997). Aus klinischer Sicht wird die Perforierung der unterliegenden kompakten Knochenstruktur bei GTR/GBR-Eingriffen empfohlen. Die Eröffnung der Knochenmarkräume soll über eine beschleunigte Vaskularisation eine verbesserte Knochenregeneration ermöglichen (Buser et al. 1990; Schmid et al. 1994, Rompen et al. 1999). Eine schnelle vaskuläre Erschließung eines resorbierbaren Implantates mag jedoch auch eine beschleunigte Biodegradation zu bedingen, da im Blutstrom enthaltene Monozyten vermehrt aus den Blutgefäßen austreten und sich zu Makrophagen ausdifferenzieren können. So könnte die schnelle transmembranöse Angiogenese von BG auch dazu geführt haben, dass die Biodegradation der Membran bereits nach zwei bis vier Wochen eintrat. Im Falle der VN-Membranen wurde ebenfalls eine sehr frühzeitige Erschließung durch Blutgefäße festgestellt. Hier waren die Membranen jedoch vermutlich durch die chemische Quervernetzung vor einer sehr frühzeitigen Resorption geschützt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Membraneigenschaften an sich. Eine Aussage über die Beeinflussung Knochenregeneration kann anhand der vorliegenden Daten nur hypothetisch getroffen werden. Daher bleibt zu diskutieren, welche Ergebnisse durch Anwendung unterschiedlicher Kollagenmembranen nach tierexperimenteller und klinischer GTR- und GBR-Therapie mit oder ohne Verwendung von Füllkörpern zur Membran-

unterstützung erzielt wurden. Dabei ist sehr auffällig, dass die überwiegende Mehrheit der Studien mit dem Material BG beschäftigt – TD, OS und BM/BME sind in der Literatur nur völlig unzulänglich auf ihre Eignung für GBR/GTR-Verfahren untersucht.

Yamada et. al. untersuchten den Einfluss einer Membran bei der GTR-Therapie tierexperimentell im Hundemodell. Hierbei wurde BG entweder alleine oder in Kombination mit einem xenogenen Knochenersatzmaterial bovinen Ursprungs (BDX, BioOss[®], Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) bei der Behandlung intraossärer parodontaler Defekte eingesetzt. Hierbei ist anzumerken, dass auf Grund ihrer reduzierten Formstabilität insbesondere native Kollagenmembranen häufig mit Knochenersatzmaterialien kombiniert werden, um einen Kollaps der Membran in das Wundgebiet zu verhindern. In beiden Behandlungsgruppen konnte acht Wochen nach Therapie histologisch eine signifikante Neubildung von Wurzelzement mit inserierenden Kollagenfasern sowie Alveolarknochen beobachtet werden. Die Kombinationstherapie BDX + BG führte jedoch zu einer signifikant größeren Knochenneubildung als BG allein (Yamada et al., 2002). Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in humanhistologischen Untersuchungen gemacht. So führten sowohl BG allein als auch die Kombination BDX + BG neun Monate nach GTR Therapie am Menschen zu einem signifikanten Attachmentgewinn, sowie histologisch zu einer Neubildung von Alveolarknochen und Wurzelzement mit inserierenden Kollagenfasern (Camelo et al., 1998). Die Kombination BDX + BG führte jedoch histologisch zu einer besseren Knochenregeneration als BDX allein (Camelo, Nevins et al., 1998). Diese Ergebnisse konnten durch die Kombination von autologem Knochen + BDX + BG zusätzlich verbessert werden (Camelo et al., 2001). In einem humanhistologischen Fallbericht führte auch die Kombination von BG mit einem Kollagen beschichteten BDX (BDX-C, BioOss[®] Collagen, Geistlich Pharma AG) zu einer parodontalen Regeneration (Nevins et al., 2003). Im Vergleich zu der Kombination BDX + BG (n=5 Patienten) führte der Einsatz von BDX-C + BG (n=3 Patienten) jedoch zu keiner zusätzlichen Verbesserung der Heilung. In beiden Gruppen konnte sechs Monate postoperativ histologisch eine vergleichbare Neubildung von Wurzelzement mit inserierenden Kollagenfasern sowie neuem Alveolarknochen beobachtet werden (Sculean et al., 2004). In einer tierexperimentellen Untersuchung an Affen (n=8 Tiere) konnte beobachtet werden, dass bei der

Behandlung intraossärer parodontaler Defekte die Kombinationstherapie BG + humaner, demineralisierter, gefriergetrockneter Knochen (DFDBA) zu einer statistisch signifikant besseren klinischen und histologischen Heilung führte als BG alleine (Blumenthal et al. 2003).

In einer ersten klinischen Re-Entry Studie wurde die Behandlung intraossärer parodontaler Defekte (n=22 Defekte) 6 Monate nach Applikation von BDX + BG im Vergleich zur Lappenoperation untersucht (Camargo et al., 2000). Die Testbehandlung führte zu einem signifikant größeren Attachmentgewinn als die Kontrollgruppe. Beim Re-Entry zeigte die Kombination BDX + BG eine ebenfalls signifikant grössere Defektauffüllung (Differenz: $2,67 \pm 0,91$ mm an bukkalen Stellen sowie $2,54 \pm 0,87$ mm an lingualen Stellen) (Camargo, Lekovic et al., 2000). In weiteren kontrollierten klinischen Studien konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Sculean et al., 2003; Zitzmann et al., 2003). Der klinische Einsatz der Kombination BDX + BG führte bei der Behandlung intraossärer parodontaler Defekte 12 Monate postoperativ zu einem signifikant höheren klinischen Attachmentgewinn als die konventionelle Lappenoperation (Sculean, Berakdar et al., 2003). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Behandlung angulärer Knochendefekte (n=22 Defekte) über einen Beobachtungszeitraum von 2 Jahren beobachtet (Zitzmann, Rateitschak-Pluss et al., 2003). Beim klinischen Vergleich von BDX + BG und BDX + PLA/PGA konnten bei der Behandlung intraossärer parodontaler Defekte (n=28 Patienten) statistisch signifikante Attachmentgewinne jeweils 12 Monate postoperativ gemessen werden. Da die Unterschiede zwischen beiden Gruppen statistisch nicht signifikant waren, wurde von der Autoren geschlussfolgert, dass das Membranmaterial per se kein kritischer Faktor für den Ausgang der Heilung im Rahmen von GTR-Verfahren mit resorbierbaren Membranen darstellt (Stavropoulos et al., 2004). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach der Behandlung intraossärer parodontaler Defekte (n=19 Patienten) mit BM oder PGA/PLA beobachtet. Beide Membrantypen führten beim Re-Entry nach 6 Monaten zu einem vergleichbaren Attachmentgewinn (MATTSON et al. 1999). In einer kürzlich veröffentlichten multizentrischen Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass 12 Monate nach der Behandlung intraossärer parodontaler Defekte die Kombinationstherapie BDX + BG zu einem signifikant höheren Attachmentgewinn führte, als die Lappenoperation allein (Tonetti et al., 2004).

Erste klinische Ergebnisse bei der Behandlung mandibulärer Grad-II Furkationen deuten auch darauf hin, dass die Kombination BDX + BG zu einer signifikant höheren Reduktion der horizontalen Sondierungstiefen führte als die Lappenoperation allein (Houser et al., 2001). Kontroverse Ergebnisse wurden nach dem Einsatz von BM im Vergleich zur Lappenoperation alleine bei der Behandlung von Grad-II-Furkationen im Unterkiefer beschrieben (Wang et al., 1994). Während sich zwischen beiden Behandlungsgruppen nach einer Heilungsphase von 6 Monaten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der klinischen Parameter ergaben, war beim Re-Entry jedoch eine signifikant größere knöcherne Defektauffüllung nach dem Einsatz von BM erkennbar.

Bisher existieren keine Daten aus histologischen oder kontrollierten klinischen Studien, die eine Aussage über die parodontale Regeneration nach Einsatz von BME, TD oder OS zulassen. Grundsätzlich sollte jedoch bei der Augmentation sowohl von intraossären als auch von Furkationsdefekten hervorgehoben werden, dass eine Reduktion der Sondierungstiefe auch durch ein Auffüllen mit Knochenersatzmaterialien möglich ist, was über den klinischen Erfolg hinwegtäuschen könnte.

Die Arbeitsgruppe Zitzmann et al. konnte in einer ersten humanhistologischen Untersuchung (n= 6 Patienten) für die GBR-Therapie zeigen, dass mit Hilfe der Kombinationstherapie BDX + BG eine vorhersagbare Augmentation von Kieferkammdefekten im Oberkiefer (OK) möglich ist. Die histologische Untersuchung der im Rahmen von Implantatinserktionen gewonnenen Biopsien nach 6-7 Monaten zeigte einen aktiven Remodellierungsprozess mit Ausbildung von Geflechtknochen sowie Anzeichen einer Resorption von BDX (Zitzmann et al., 2001). Eranli und Mitarbeiter untersuchten in einem vergleichbaren Studiendesign die Remodellierungsprozesse im Ober- und Unterkiefer (UK) nach Applikation von BDX + BG (n=11 Patienten). Während einer durchschnittlichen postoperativen Wundheilungsperiode von sieben Monaten konnte in drei Fällen eine Membranexposition beobachtet werden, welche jedoch nach acht Tagen komplikationslos über freie Granulation ausheilte (Eranli et al., 2004). Die histomorphometrische Analyse ergab eine mittlere Knochenneubildung von 46 % im OK sowie 75% im UK. Von Norton und Kollegen wurde mit durchschnittlich 27 % jedoch eine geringere Knochenneubildung nach dem Einsatz von BDX + BG beschrieben (Norton et al., 2003). In einer vergleichenden tierexperimentelle Untersuchung wurden individuell hergestellte gitterförmige

subperiostale Titanimplantate beidseitig an der Tibia im Kaninchenmodell befestigt (Aaboe et al., 2000). Der angrenzende kortikale Knochen wurde jeweils punktförmig perforiert und mit BDX bedeckt. Die Abdeckung der Implantate erfolgte mittels BG, ePTFE oder PLA. Nach einer Heilungsperiode von 12 Wochen zeigte die histologische Untersuchung, dass alle Implantate vergleichbar osseointegriert waren. Im Vergleich zur ePTFE-Membran wiesen sowohl die BG- als auch PLA-Membranen einen gering ausgeprägten Kollaps in das Wundgebiet auf. In beiden Fällen waren geringe Resorptionszeichen des neu gebildeten Knochens nachweisbar (Aaboe, Schou et al., 2000). Der alleinige Einsatz von BG führte in einer histologischen Untersuchung nach GBR um dehiszente Implantate in *Macaca fascicularis*-Affen zu einer signifikant geringeren Knochenneubildung als die Kombinationen BG + BDX oder ePTFE + BDX. Die Unterschiede zwischen BG + BDX und ePTFE + BDX waren statistisch nicht signifikant (Hurzeler et al., 1998). Der Einfluss einer Membranunterstützung von BG auf die periimplantäre Knochenneubildung wurde auch in einer tierexperimentellen Studie im Hundemodell (n=3 Tiere) untersucht (Hockers et al., 1999). Hierzu erfolgte eine standardisierte Präparation knöcherner Defekte nach Implantatinserion im Unterkiefer unter Verwendung des Split-mouth-Designs (n=6 Implantate pro Tier). Diese Defekte wurden mit nachfolgenden Therapieformen behandelt: BDX + BG, autologer Knochen (AB) + BG, unbehandelte Kontrolldefekte. Nach einer Heilungsperiode von 16 Wochen ergab die histomorphometrische Analyse eine vergleichbare horizontale und vertikale Knochenneubildung für die Kombinationen BDX + BG (81 %, 78 %) und AB + BG (82 %, 69 %). Im Gegensatz hierzu war die horizontale und vertikale Knochenneubildung nach Einsatz von BG alleine (78%, 45%) sowie in der unbehandelten Kontrollgruppe (21 %, 22 %) reduziert. Der direkte Knochen-Implantat-Kontakt war mit 17-20 % jedoch in allen Testgruppen vergleichbar und höher als in der Kontrollgruppe (12%) (Hockers, Abensur et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden nach regenerativen Therapieverfahren Ligatur-induzierter periimplantärer Infektionen im Hundemodell beobachtet. Nach einer Beobachtungszeit von 5 Monaten zeigte die histomorphometrische Auswertung die größte vertikale Knochenneubildung für BDX + BG (27,77 %), gefolgt von BG alleine (21,78 %), BDX alleine (21,26 %), ePTFE + BDX (19,57 %) und ePTFE alleine (18,86 %). Die alleinige Defektreinigung führte zu einer vertikalen Knochenneubildung von 14,03 %. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch jedoch

nicht signifikant (Nociti et al., 2001). Auch der direkte Knochen-Implantat-Kontakt (Reosseointegration) war zwischen allen Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Nociti et al., 2001). In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung im Hundemodell wurde ebenfalls beobachtet, dass der zusätzliche Einsatz von BG zu BDX zu keiner signifikanten Verbesserung der knöchernen Regeneration bukkaler Dehiszenzdefekte führte als BDX alleine (Botticelli et al., 2004). In einer erst kürzlich erschienenen Untersuchung, die BG in Verbindung mit BDX oder einem neuartigen Knochenersatzmaterial (Straumann BoneCeramic[®], Straumann, Waldenström) bei bukkalen Dehiszenzdefekten an Implantaten im Hundemodell einsetzte, zeigten beide Materialien eine gute Osseointegration der Knochenersatzmaterialien und subsequekte knöcherne Auffüllung der Defekte (Schwarz et al., 2007).

Die Kombination BDX + OS wurde ebenfalls mit der Standardtherapie BDX + ePTFE im Rahmen von GBR-Verfahren in Menschen verglichen. Die histomorphometrische Analyse zeigte 7 Monate postoperativ eine vergleichbare Knochenneubildung in beiden Behandlungsgruppen. Die Struktur von OS war jedoch nach diesem Zeitraum ebenso wie nach 24 Wochen maximaler Heilungsperiode in der vorliegenden Arbeit noch deutlich erkennbar (Friedmann, Strietzel et al., 2002). Bisher existiert nur eine tierexperimentelle Untersuchung, die BG und BME bei der Behandlung periimplantärer Dehiszenzdefekte miteinander verglichen haben (Oh et al., 2003). Beide Membranen führten nach 16 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Membran) zu einer statistisch signifikant höheren Knochenneubildung sowie einem größeren Knochen-zu-Implantat-Kontakt.

In ersten klinischen Fallstudien wurde der Einsatz von BDX + BG bei der Therapie periimplantärer Dehiszenzdefekte untersucht. Hürzeler und Mitarbeiter beobachteten beim Re-Entry nach einer Heilungsphase von 6 Monaten (n=15 Patienten) eine komplette knöcherne Defektauffüllung bei 22 von 35 Implantaten (Hürzeler et al., 1996). Vergleichbare Ergebnisse wurden von Hämmerle et al. (2001) nach dem Einsatz von BDX + BG bei der Behandlung von bukkalen Dehiszenzdefekten nach Implantatinserktion (n=10 Patienten) im Rahmen einer transgingivalen Einheilung beschrieben (Hämmerle and Lang, 2001). Beim Re-Entry ebenfalls nach 6 Monaten stellten die Unterucher fest, dass sich die mittlere Defektausdehnung von $3,6 \pm 1,6$ mm zu Beginn auf $2,5 \pm 0,6$ mm statistisch

signifikant verringert hatte. Die knöcherne Bedeckung ehemals exponierter Implantatanteile betrug im Mittel 86 % (Hämmerle and Lang, 2001). Tawil und Mitarbeiter (2001) beobachteten beim Re-Entry (n=17 Patienten) nach 16-32 Wochen ebenfalls eine knöcherne Defektausheilung von 87,6 % nach dem Einsatz von BDX + BG an ehemals dehiszenten Titanimplantaten (Tawil et al., 2001). In einer ersten kontrollierten klinischen Untersuchung zur Behandlung periimplantärer Dehissenzdefekte im Menschen wurden die Kombinationen BDX + BG und BDX + ePTFE im Split-mouth-Design miteinander verglichen (Zitzmann et al., 1997). Beim Re-Entry wurde in der Gruppe BDX + BG eine knöcherne Defektauffüllung von 92 % und in der Kontrollgruppe von 78 % beobachtet. Insgesamt führte der Einsatz der ePTFE-Membran in 44 % der Fälle zu einer Membranexposition, welche mit einer frühzeitigen Entfernung der Membran verbunden war (Zitzmann, Naef et al., 1997). Nach einer Beobachtungszeit von 5 Jahren betrug das mittlere marginale Knochenniveau in der BDX + BG-Gruppe 1,83 mm sowie 2,21 mm in der BDX + ePTFE-Gruppe. Die Überlebensrate der augmentierten Implantate war mit 93-97 % in beiden Gruppen vergleichbar (Zitzmann et al., 2001). Erste humanhistologische und klinische Untersuchungen von Jung et al. (2003) konnten weiterhin zeigen, dass eine Augmentation mit BDX + BG im Bereich vestibulärer Dehissenzdefekte zu einer signifikanten Reduktion der vertikalen Defekthöhe von $5,8 \pm 1,81$ mm zu Beginn auf $0,4 \pm 0,66$ mm nach 6 Monaten führte. Dies entsprach einer vertikalen Defektauffüllung von 91 %. Die Beschichtung von BDX mit rekombinant hergestelltem humanen Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2) und zusätzlicher Applikation von BG führte zu einer vertikalen Defektauffüllung von $7,0 \pm 2,67$ mm zu Beginn auf $0,2 \pm 0,35$ nach 6 Monaten, entsprechend 96 %. Im Vergleich zu BDX ergab die histomorphometrische Untersuchung entnommener Gewebeproben eine signifikant größere Knochenanlagerung an rhBMP-2 + BDX (30 % vs. 57 %) (Jung et al., 2003).

Bisher existieren keine Daten aus histologischen oder kontrollierten klinischen Studien, die eine Aussage über den Einsatz von TD im Rahmen von GBR-Verfahren zulassen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse darf nicht unberücksichtigt bleiben, dass auch der Raumerhalt nach Augmentation als ein wichtiger Faktor für den Erfolg einer GTR/GBR-Therapie anzusehen ist (Hardwick et al. 1994). Unser Experiment vermochte einen solchen Ansatz nicht zu überprüfen, da die

Implantate rein subkutan inseriert wurden. Zudem stellt sich die Frage, in wie weit der Abbau in einem Rattenmodell auf die Situation in der Mundhöhle übertragen werden kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf die Beurteilung des generellen Abbaus der Membranstruktur. Eine Aussage, in wie weit sich die ermittelten Ergebnisse auf die tatsächliche Knochenneubildung auswirken, kann anhand dieses Modells nicht getroffen werden. Hier sind weitere in-vivo Untersuchungen notwendig, die vor allem den klinischen Effekt der Biodegradationszeit und transmembranösen Angiogenese auf die Knochenneubildung untersuchen. Hier wäre auch eine Beurteilung des Effektes der Riesenzell-Invasion einiger Membranen auf unmittelbar angrenzenden präexistenten Knochen von Interesse. Zudem erscheint der Vergleich zu vollständig okklusiven ePTFE-Membranen sinnvoll, da diese eine transmembranöse Angiogenese vollständig unterbinden. Ihre Anwendung führt aber dennoch zu einer vorhersagbaren Knochenregeneration (Gottlow, Nyman et al., 1986), so dass ePTFE-Membranen aus historischer Sicht bis heute als Goldstandard für GTR/GBR-Eingriffe angesehen werden.

SCHLUSSFOLGERUNG

Durch die Quervernetzung von bovinem und porkinem Typ I und III-Kollagen kann die Biodegradationszeit von nativem Kollagen deutlich gesteigert werden. Dabei beeinflusst der chemische Aufbau des Kollagens vor allem die bei jeder Membran mehr oder weniger stark nachweisbare Entzündungsreaktion, während das strukturelle Erscheinungsbild das Abbau- und Vaskularisierungsmuster determiniert (TD). Eine Vernetzung mit Glutaraldehyd reduziert die Biokompatibilität und Angiogenese deutlich (BM, BME), während die Anwendung von enzymatisch gesteuerter Polysaccharidinsertion ein sehr stabiles Kollagen mit fragwürdiger Biodegradation und fehlender transmembranöser Angiogenese erzeugt (OS). Die experimentelle chemische Quervernetzung von nativem porkinen Typ I und III-Kollagen konnte die gute Biokompatibilität, Gewebeintegration und Vaskularisation des Ursprungskollagens (BG) erhalten und dessen Resorptionsstabilität vernetzungsgradabhängig steigern. Ihr Abbau war jedoch auch mit einer verstärkten Entzündungsreaktion vergesellschaftet (VN1-3).

LITERATURVERZEICHNIS

Aaboe, M., S. Schou, E. Hjorting-Hansen, M. Helbo and D. Vikjaer (2000). Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes. Clin Oral Implants Res 11: 51-8.

Ahmad, M., M. B. McCarthy and G. Gronowicz (1999). An in-vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. Biomaterials 20: 211-20.

Al-Omiri, M., R. A. Hantash and A. Al-Wahadni (2005). Satisfaction with dental implants: a literature review. Implant Dent 14: 399-406.

Alpar, B., G. Leyhausen, H. Gunay and W. Geurtsen (2000). Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. Clin Oral Investig 4: 219-25.

Araujo, M. G., M. Sonohara, R. Hayacibara, G. Cardaropoli and J. Lindhe (2002). Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. J Clin Periodontol 29: 1122-31.

Archer, C. W., P. Rooney and L. Wolpert (1982). Cell shape and cartilage differentiation of early chick limb bud cells in culture. Cell Differ 11: 245-51.

Blumenthal NM, Alves ME, Al-Huwais S, Hofbauer AM, Koperski RD. Defect-determined regenerative options for treating periodontal intrabony defects in baboons. J Periodontol. 2003 Jan;74(1):10-24.

Botticelli, D., T. Berglundh and J. Lindhe (2004). The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res 15: 285-92.

Bowers, K. T., J. C. Keller, B. A. Randolph, D. G. Wick and C. M. Michaels (1992). Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in-vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 302-10.

Breithaupt-Faloppa, A. C., J. Kleinheinz and O. Crivello, Jr. (2006). Endothelial cell reaction on a biological material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 76: 49-55.

Brunel, G., P. Piantoni, F. Elharar, E. Benque, P. Marin and S. Zahedi (1996). Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *Journal of Periodontology* 67: 1342-8.

Brunette, D. M. (1988). The effects of implant surface topography on the behavior of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3: 231-46.

Buemi, M., M. Galeano, A. Sturiale, R. Ientile, C. Crisafulli, A. Parisi, M. Catania, G. Calapai, P. Impala, C. Aloisi, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, G. Tuccari and N. Frisina (2004). Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 22: 169-73.

Bunyaratavej, P. and H. L. Wang (2001). Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology* 72: 215-29.

Buser, D., U. Bragger, N. P. Lang and S. Nyman (1990). Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res* 1: 22-32.

Camargo, P. M., V. Lekovic, M. Weinlaender, M. Nedic, N. Vasilic, L. E. Wolinsky and E. B. Kenney (2000). A controlled re-entry study on the effectiveness of bovine porous bone mineral used in combination with a collagen membrane of porcine origin in the treatment of intrabony defects in humans. *J Clin Periodontol* 27: 889-96.

Camelo, M., M. L. Nevins, S. E. Lynch, R. K. Schenk, M. Simion and M. Nevins (2001). Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21: 109-19.

Camelo, M., M. L. Nevins, R. K. Schenk, M. Simion, G. Rasperini, S. E. Lynch and M. Nevins (1998). Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *Int J Periodontics Restorative Dent* 18: 321-31.

Chen, Y. T., S. L. Hung, L. W. Lin, L. Chi and L. J. Ling (2003). Attachment of periodontal ligament cells to chlorhexidine-loaded guided tissue regeneration membranes. *J Periodontol* 74: 1652-9.

Cortellini, P., C. Clauser and G. P. Prato (1993). Histologic assessment of new attachment following the treatment of a human buccal recession by means of a guided tissue regeneration procedure. *J Periodontol* 64: 387-91.

Dahlin, C., A. Linde, J. Gottlow and S. Nyman (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* 81: 672-6.

Dahlin, C., A. Linde, J. Gottlow and S. Nyman (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 81: 672-6.

Dahlin, C., L. Sennerby, U. Lekholm, A. Linde and S. Nyman (1989). Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 4: 19-25.

Del Fabbro, M., T. Testori, L. Francetti and R. Weinstein (2004). Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *Int J Periodontics Restorative Dent* 24: 565-77.

Ersanli, S., V. Olgac and B. Leblebicioglu (2004). Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *J Periodontol* 75: 750-6.

Folkman, J. and A. Moscona (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345-9.

Friedmann, A., F. P. Strietzel, B. Maretzki, S. Pitaru and J. P. Bernimoulin (2001). Observations on a new collagen barrier membrane in 16 consecutively treated patients. Clinical and histological findings. J Periodontol 72: 1616-23.

Friedmann, A., F. P. Strietzel, B. Maretzki, S. Pitaru and J. P. Bernimoulin (2002). Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. Clin Oral Implants Res 13: 587-94.

Gottlow, J., S. Nyman, T. Karring and J. Lindhe (1984). New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J Clin Periodontol 11: 494-503.

Gottlow, J., S. Nyman, J. Lindhe, T. Karring and J. Wennstrom (1986). New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. Journal of Clinical Periodontology 13: 604-16.

Greenstein, G. and J. G. Caton (1993). Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. Periodontol 2000 1: 36-45.

Hallman, M., L. Sennerby and S. Lundgren (2002). A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. Int J Oral Maxillofac Implants 17: 635-43.

Hämmerle, C. H. and T. Karring (1998). Guided bone regeneration at oral implant sites. Periodontology 2000 17: 151-75.

Hämmerle, C. H. and N. P. Lang (2001). Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. Clinical Oral Implants Research 12: 9-18.

Haney, J. M., R. E. Nilveus, P. J. McMillan and U. M. Wikesjö (1993). Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration. J Periodontol 64: 883-90.

Hanft, J. R., R. W. Sprinkle, M. S. Surprenant and M. B. Werd (1995). Implantable bone substitute materials. *Clin Podiatr Med Surg* 12: 437-55.

Hardwick, R., T. V. Scantlebury, R. Sanchez, N. Whitley and J. Ambruster (1994). Guided bone regeneration in implant dentistry. Quintessenz Pub.

Haroon, Z. A., J. M. Hettasch, T. S. Lai, M. W. Dewhirst and C. S. Greenberg (1999). Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *Faseb J* 13: 1787-95.

Hockers, T., D. Abensur, P. Valentini, R. Legrand and C. H. Hammerle (1999). The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 10: 487-98.

Houser, B. E., J. T. Mellonig, M. A. Brunsvold, D. L. Cochran, R. M. Meffert and M. E. Alder (2001). Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21: 161-9.

Hurley, L. A., F. E. Stinchfield, A. L. Bassett and W. H. Lyon (1959). The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am* 41-A: 1243-54.

Hürzeler, M. B., R. J. Kohal, J. Naghshbandi, L. F. Mota, J. Conradt, D. Hutmacher and R. G. Caffesse (1998). Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27: 315-20.

Hürzeler, M. B., D. Weng and D. Hutmacher (1996). Knochenregeneration um Implantate - eine klinische Studie mit einer neuen resorbierbaren Membran. *Dtsch Zahnärztl Z* 51: 298-303.

Hutmacher, D., M. B. Hurzeler and H. Schliephake (1996). A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11: 667-78.

Hutmacher, D., M. B. Hurzeler and H. Schliephake (1996). A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 11: 667-78.

Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-56.

Jovanovic S A, Schenk R K, Orsini M, Kenney E B. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10:23-31.

Jung, R. E., R. Glauser, P. Scharer, C. H. Hammerle, H. F. Sailer and F. E. Weber (2003). Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin Oral Implants Res* 14: 556-68.

Karring, T., S. Nyman, J. Gottlow and L. Laurell (1993). Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontology* 2000 1: 26-35.

Kodama, T., M. Minabe, T. Hori and Y. Watanabe (1989). The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology* 60: 205-10.

Kohal, R. J., P. Mellas, M. B. Hurzeler, P. M. Trejo, E. Morrison and R. G. Caffesse (1998). The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *J Periodontol* 69: 927-37.

Kononen, M., M. Hormia, J. Kivilahti, J. Hautaniemi and I. Thesleff (1992). Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 26: 1325-41.

Locci, P., M. Calvitti, S. Belcastro, M. Pugliese, M. Guerra, L. Marinucci, N. Staffolani and E. Becchetti (1997). Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology* 68: 857-63.

- Long, M. W., J. A. Robinson, E. A. Ashcraft and K. G. Mann (1995). Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 95: 881-7.
- Lundgren, A. K., D. Lundgren, C. H. Hammerle, S. Nyman and L. Sennerby (2000). Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. *Clin Oral Implants Res* 11: 99-106.
- Magnusson, I., C. Batich and B. R. Collins (1988). New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J Periodontol* 59: 1-6.
- Mailhot, J. M., G. S. Schuster, J. J. Garnick, P. J. Hanes, C. A. Lapp and J. B. Lewis (1995). Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. *J Clin Periodontol* 22: 679-85.
- Maruyama, Y. (1963). The human endothelial cell in tissue culture. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 60: 69-79.
- Minabe, M., T. Kodama, T. Kogou, T. Tamura, T. Hori, Y. Watanabe and T. Miyata (1989). Different cross-linked types of collagen implanted in rat palatal gingiva. *Journal of Periodontology* 60: 35-43.
- Murray, E., D. Provvedini, D. Curran, B. Catherwood, H. Sussman and S. Manolagas (1987). Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res* 2: 231-8.
- Nevins, M. L., M. Camelo, S. E. Lynch, R. K. Schenk and M. Nevins (2003). Evaluation of periodontal regeneration following grafting intrabony defects with bio-oss collagen: a human histologic report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23: 9-17.
- Nociti, F. H., Jr., M. A. Machado, C. M. Stefani and E. A. Sallum (2001). Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs: a histometric investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16: 646-52.

- Norton, M. R., E. W. Odell, I. D. Thompson and R. J. Cook (2003). Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res* 14: 775-83.
- Nyman, S., J. Lindhe, T. Karring and H. Rylander (1982). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 9: 290-6.
- O'Cearbhaill, E. D., V. Barron and P. E. McHugh (2006). Characterisation of a collagen membrane for its potential use in cardiovascular tissue engineering applications. *J Mater Sci Mater Med* 17: 195-201.
- Oh, T. J., S. J. Meraw, E. J. Lee, W. V. Giannobile and H. L. Wang (2003). Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Implants Res* 14: 80-90.
- Owens, K. W. and R. A. Yukna (2001). Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent* 10: 49-58.
- Paul, B. F., J. T. Mellonig, H. J. Towle, 3rd and J. L. Gray (1992). Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 12: 123-31.
- Paul, B. F., J. T. Mellonig, H. J. Towle, 3rd and J. L. Gray (1992). Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 12: 123-31.
- Pihlstrom, B. L., R. B. McHugh, T. H. Oliphant and C. Ortiz-Campos (1983). Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 61/2 years. *Journal of Clinical Periodontology* 10: 524-41.
- Pitaru, S., H. Tal, M. Soldinger, A. Grosskopf and M. Noff (1988). Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *Journal of Periodontology* 59: 380-6.
- Pontoriero, R., J. Lindhe, S. Nyman, T. Karring, E. Rosenberg and F. Sanavi (1988). Guided tissue regeneration in degree II furcation-involved mandibular molars. A clinical study. *J Clin Periodontol* 15: 247-54.

- Pontoriero, R., S. Nyman, I. Ericsson and J. Lindhe (1992). Guided tissue regeneration in surgically-produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. *J Clin Periodontol* 19: 159-63.
- Postlethwaite, A. E., J. M. Seyer and A. H. Kang (1978). Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 871-5.
- Proussaefs, P. and J. Lozada (2005). The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 25: 351-63.
- Quteish, D. and A. E. Dolby (1992). The use of irradiated-crosslinked human collagen membrane in guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* 19: 476-84.
- Reilly, T. M., R. Seldes, W. Luchetti and C. T. Brighton (1998). Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop* 95-103.
- Rickard, D. J., M. Kassem, T. E. Hefferan, G. Sarkar, T. C. Spelsberg and B. L. Riggs (1996). Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11: 312-24.
- Rodan, S. B., Y. Imai, M. A. Thiede, G. Wesolowski, D. Thompson, Z. Bar-Shavit, S. Shull, K. Mann and G. A. Rodan (1987). Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 47: 4961-6.
- Romeis, B. (1968). *Mikroskopische Technik*, 16. Aufl., Oldenbourg-Verlag, München.
- Rompen E H, Biewer R, Vanheusden A, Zahedi S, Nusgens B. The influence of cortical perforations and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone generation. A comparative histometric study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10:85-94.
- Schmid, J., C. H. Hammerle, A. J. Olah and N. P. Lang (1994). Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 5: 125-30.

Schmid, J., B. Wallkamm, C. H. Hammerle, S. Gogolewski and N. P. Lang (1997). The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. Clin Oral Implants Res 8: 244-8.

Sculean, A., M. Berakdar, G. C. Chiantella, N. Donos, N. B. Arweiler and M. Brecx (2003). Healing of intrabony defects following treatment with a bovine-derived xenograft and collagen membrane. A controlled clinical study. J Clin Periodontol 30: 73-80.

Schwarz F., M. Hertel, D. Ferrari, M. Wieland, L. Schmitz, E. Engelhardt, J. Becker (2007). Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite+beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic[®]) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen[®]): an immunohistochemical study in dogs. Int J Oral Maxillofac Surg. 2007 Sep 7; [Epub ahead of print]

Sela, M. N., D. Kohavi, E. Krausz, D. Steinberg and G. Rosen (2003). Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria. Clin Oral Implants Res 14: 263-8.

Sela, M. N., D. Steinberg, A. Klinger, A. A. Krausz and D. Kohavi (1999). Adherence of periodontopathic bacteria to bioabsorbable and non-absorbable barrier membranes in-vitro. Clin Oral Implants Res 10: 445-52.

Selvig, K. A., B. G. Kersten, A. D. Chamberlain, U. M. Wikesjö and R. E. Nilveus (1992). Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing. Journal of Periodontology 63: 974-8.

Selvig, K. A., B. G. Kersten and U. M. Wikesjö (1993). Surgical treatment of intrabony periodontal defects using expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes: influence of defect configuration on healing response. J Periodontol 64: 730-3.

Sethi, A. and T. Kaus (2001). Ridge augmentation using mandibular block bone grafts: preliminary results of an ongoing prospective study. Int J Oral Maxillofac Implants 16: 378-88.

Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14:496-511.

Somerman, M. J., J. J. Sauk, R. A. Foster, K. Norris, K. Dickerson and W. S. Argraves (1991). Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res* 26: 10-6.

Speer, D. P., M. Chvapil, C. D. Eskelson and J. Ulreich (1980). Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 14: 753-64.

Stavropoulos, A., A. Sculean and T. Karring (2004). GTR treatment of intrabony defects with PLA/PGA copolymer or collagen bioresorbable membranes in combination with deproteinized bovine bone (Bio-Oss). *Clin Oral Investig* 8: 226-32.

Strietzel, F. P. (2004). Sinusbodenelevation und -augmentation. Evidenzgestutzte Aussagen zu Prognose und Risikofaktoren. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8: 93-105.

Takata, T., H. L. Wang and M. Miyauchi (2001). Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *Journal of Periodontal Research* 36: 322-7.

Takata, T., H. L. Wang and M. Miyauchi (2001). Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clinical Oral Implants Research* 12: 332-8.

Tatakis, D. N., A. Promsudthi and U. M. Wikesjo (1999). Devices for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 19: 59-73.

Tawil, G., G. El-Ghoule and M. Mawla (2001). Clinical evaluation of a bilayered collagen membrane (Bio-Gide) supported by autografts in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16: 857-63.

Tawil, G. and M. Mawla (2001). Sinus floor elevation using a bovine bone mineral (Bio-Oss) with or without the concomitant use of a bilayered collagen barrier (Bio-Gide): a clinical report of immediate and delayed implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16: 713-21.

Tempo, P. J. and J. Nalbandian (1993). Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: morphological and microbiological observations. *Journal of Periodontology* 64: 162-8.

Tonetti, M. S., P. Cortellini, N. P. Lang, J. E. Suvan, P. Adriaens, D. Dubravec, A. Fonzar, I. Fourmoussis, G. Rasperini, R. Rossi, M. Silvestri, H. Topoll, B. Wallkamm and M. Zybutz (2004). Clinical outcomes following treatment of human intrabony defects with GTR/bone replacement material or access flap alone. A multicenter randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 31: 770-6.

Trylovich, D. J., C. M. Cobb, D. J. Pippin, P. Spencer and W. J. Killoy (1992). The effects of the Nd:YAG laser on in-vitro fibroblast attachment to endotoxin-treated root surfaces. *J Periodontol* 63: 626-32.

Unsal, B., B. Kurtis, G. Ozcan, A. Ozdemir and E. Karaoz (1997). An investigation of resorption and tissue reaction after subcutaneous implantation of collagen based membrane materials in rats. *J Marmara Univ Dent Fac* 2: 609-15.

von Arx, T., N. Broggini, S. S. Jensen, M. M. Bornstein, R. K. Schenk and D. Buser (2005). Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20: 843-53.

Wang, H. L., M. Miyauchi and T. Takata (2002). Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in-vitro study. *J Periodontal Res* 37: 340-4.

Wang, H. L., R. B. O'Neal, C. L. Thomas, Y. Shyr and R. L. MacNeil (1994). Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating Class II furcation defects. *J Periodontol* 65: 1029-36.

Wiebe, D., J. Megerman, G. J. L'Italien and W. M. Abbott (1988). Glutaraldehyde release from vascular prostheses of biologic origin. *Surgery* 104: 26-33.

Wikesjö, U. M., N. Claffey and J. Egelberg (1991). Periodontal repair in dogs. Effect of heparin treatment of the root surface. *J Clin Periodontol* 18: 60-4.

Wikesjö, U. M., C. J. Kean and G. J. Zimmerman (1994). Periodontal repair in dogs: supraalveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol* 65: 1151-7.

Wikesjö, U. M. and R. Nilveus (1990). Periodontal repair in dogs: effect of wound stabilization on healing. *J Periodontol* 61: 719-24.

Yaffe, A., J. Ehrlich and S. Shoshan (1984). Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *Journal of Periodontology* 55: 623-8.

Yamada, S., N. Shima, H. Kitamura and H. Sugito (2002). Effect of porous xenographic bone graft with collagen barrier membrane on periodontal regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent* 22: 389-97.

Zahedi, S., R. Legrand, G. Brunel, A. Albert, W. Dewe, B. Coumans and J. P. Bernard (1998). Evaluation of a diphenylphosphorylazide-crosslinked collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats. *Journal of Periodontology* 69: 1238-46.

Zhao, S., E. M. Pinholt, J. E. Madsen and K. Donath (2000). Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *J Craniomaxillofac Surg* 28: 116-22.

Zide, M. F. (2000). Autogenous bone harvest and bone compacting for dental implants. *Compend Contin Educ Dent* 21: 585-90; quiz 592.

Zitzmann, N. U., R. Naef and P. Scharer (1997). Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12: 844-52.

Zitzmann, N. U., E. Rateitschak-Pluss and C. P. Marinello (2003). Treatment of angular bone defects with a composite bone grafting material in combination with a collagen membrane. *J Periodontol* 74: 687-94.

Zitzmann, N. U., P. Scharer and C. P. Marinello (2001). Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16: 355-66.

Zitzmann, N. U., P. Scharer, C. P. Marinello, P. Schupbach and T. Berglundh (2001). Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21: 288-95.

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1	Anforderungen an Membranen für GBR/GTR-Verfahren	11
Tabelle 2	Untersuchte Kollagenmembranen	18
Tabelle 3	Deskriptive Statistik der SaOs-2 Zellzahlen	32
Tabelle 4	Deskriptive Statistik der PDL-Zellzahlen	35
Tabelle 5	Deskriptive Statistik der HUVEC-Zellzahlen über die Zeit	38
Tabelle 6	Deskriptive Statistik der histomorphometrischen Daten	52
Tabelle 7	Deskriptive Statistik der Blutgefäßdichten der einzelnen Membranschichten	60
Tabelle 8	Deskriptive Statistik Blutgefäßdichten gesamt	61
Abbildung 1	Prinzip GTR/GBR	7
Abbildung 2	Histologie einer GTR-Therapie	7
Abbildung 3	Klinische Anwendung von Kollagenmembranen	9
Abbildung 4	Minusheet-Ringe und 24-Well-System	20
Abbildung 5	Vorbereitung der Implantate	26
Abbildung 6	Chirurgisches Prozedere	27
Abbildung 7	Morphometrische Auswertung des Membrandurchmessers	29
Abbildung 8	Morphometrische Auswertung der Blutgefäßdichte	30
Abbildung 9	Boxplots der ermittelten SaOs-2 Zellzahlen nach 7 Tagen Kulturdauer	32
Abbildung 10	Morphologische Beurteilung der SaOs-2-Zellen im REM	34
Abbildung 11	Boxplots der ermittelten PDL-Zellzahlen nach 7 Tagen Kulturdauer	35
Abbildung 12	Morphologische Beurteilung der PDL-Fibroblasten im REM	36
Abbildung 13	Boxplot der ermittelten HUVEC-Zahlen/Well in Abhängigkeit der Kulturdauer	38
Abbildung 14	Einzelboxplots der HUVEC-Zellzahlen/Well nach 1, 3 und 7 Tagen	39
Abbildung 15	HE-gefärbte Histologien zur Beurteilung des Wachstumsmusters	41
Abbildung 16	Histologische Beurteilung von BG nach unterschiedlichen Heilungsperioden	43

Abbildung 17	Histologische Beurteilung von VN1 nach unterschiedlichen Heilungsperioden	44
Abbildung 18	Histologische Beurteilung von VN2 nach unterschiedlichen Heilungsperioden	45
Abbildung 19	Histologische Beurteilung von VN3 nach unterschiedlichen Heilungsperioden	46
Abbildung 20	Histologische Beurteilung von BM nach unterschiedlichen Heilungsperioden	47
Abbildung 21	Histologische Beurteilung von BME nach unterschiedlichen Heilungsperioden	48
Abbildung 22	Histologische Beurteilung von OS nach unterschiedlichen Heilungsperioden	49
Abbildung 23	Histologische Beurteilung von TD nach unterschiedlichen Heilungsperioden	50
Abbildung 24	Grafische Darstellung der mittleren Membrandurchmesser	53
Abbildung 25	Immunhistologische Beurteilung der Blutgefäßinvasion	55
Abbildung 26	Grafische Darstellung der mittleren Blutgefäßdichten der verschiedenen Layer	58
Abbildung 27	Ergebnisse O’Cearbhaill et al., 2006	67

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Herstellung von Kollagenmembranen für die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration finden vor allem bovine und porkine Kollagene vom Typ I und III Verwendung. Diese werden je nach Hersteller unterschiedlich für die klinische Anwendung aufgereinigt. Zudem werden zur Erhöhung der Resorptionsdauer verschiedene Quervernetzungsverfahren eingesetzt, deren Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der Membranen häufig weitestgehend unbekannt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss unterschiedlicher Morphologien und Quervernetzungsarten verschiedener im Handel erhältlicher und experimentell quervernetzter Membranen auf die Aspekte morphologischer Aufbau, Biokompatibilität, Gewebeintegration, Biodegradation, zelluläre Reaktion und transmembranöse Angiogenese zu untersuchen.

Hierzu wurden fünf verschiedene im Handel erhältliche Kollagenmembranen (BioGide® [BG] Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz; Tutodent [TD] Tutogen Medical, Neunkirchen a.B.; BioMend® und –Extend® [BM/BME], Zimmer Dental GmbH, Freiburg und Ossix® [OS] 3i, Colbar R&D Ltd., Ramat Husharon, Israel) und drei experimentelle Membranvarianten ([VN1-3] ein-, drei- und vierfach chemisch quervernetztes BG-Material, Geistlich Pharma AG) mit humanen SaOs-2-Osteoblasten, parodontalen Ligamentfibroblasten und Umbilikalvenen-Endothelzellen inkubiert und subkutan in Wistar-Ratten für 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen implantiert. In-vitro kamen zellquantitative, histologische sowie rasterelektronenmikroskopische Verfahren zum Einsatz. Die in-vivo Experimente wurden histologisch, immunhistochemisch und histomorphometrisch ausgewertet.

Wie sich zeigen ließ, scheint eine Kollagenvernetzung mit Glutaraldehyd (BM und BME) einen negativen Einfluss auf die Biokompatibilität zu unterhalten. Eine Vernetzung mit Polysacchariden (OS) lieferte eine sehr kompakte Kollagenstruktur hoher Biokompatibilität, welche jedoch auch nach 24 Wochen Implantationszeit nicht von Zellen oder Blutgefäßen durchdrungen wurde. Ebenso schien die Kompaktheit des Ursprungsgewebes einen wesentlichen Faktor für die Resorptionsstabilität darzustellen (TD). Die experimentelle chemische Quervernetzung (VN1-3) der BG-Membranen konnte die hohe Biokompatibilität und frühzeitige transmembranöse Angiogenese von BG erhalten und führte zu einer vernetzungsgradabhängigen deutlichen Verlängerung der Barrierefunktion. Ihr Abbau war jedoch mit einer verstärkten Entzündungsreaktion vergesellschaftet.

DANKSAGUNG

Der größte Dank gilt meinem Kollegen, Oberarzt und Freund PD Dr. Frank Schwarz für die hervorragende langjährige wissenschaftliche Ausbildung, Unterstützung und fruchtbare Zusammenarbeit ebenso wie die erstklassige Betreuung dieser Arbeit und vieler weiterer Publikationen.

Vielen Dank auch meinem langjährigem Chef Prof. Dr. Jürgen Becker für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung sowie oralchirurgische Ausbildung und seine stets kreativen Ideen, die uns auf unserem gemeinsamen Weg eng verbunden haben.

Auch den anderen Mitarbeitern unseres Teams und hier insbesondere Frau Dr. Monika Herten und Frau Brigitte Hartig ein ganz besonderer Dank für die geduldige Unterstützung bei den Zellkultur- und Tierexperimenten und der histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung der Proben.

Zudem ein herzlicher Dank an Herrn Prof. Dr. Hans Zoellner der Universität Sydney für die Zusammenarbeit bei den HUVEC-Experimenten und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Bereitstellung des für dieses Projekt gewährten Stipendiums.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Dr. Martin Sager, Frau Dr. Annemarie Treiber, Frau Eva Engelhardt und Frau Iris Schrey der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf für die Unterstützung bei den Tierversuchen ebenso wie Herrn Prof. Dr. Scherbaum, Deutsches Diabetes Zentrum Düsseldorf, für die Bereitstellung des Zellkulturlabors.

LEBENS LAUF

Dr. med. dent. Daniel Stefan Rothamel

01.02.1977	geboren in Kleve, NRW Eltern: Heinz-Gerd Rothamel, Dipl. Ing. Coralia Georgeta Rothamel, geb. Trifu, Dipl. Ing.
1983-87	Besuch der Wilhelm-Busch-Grundschule Ratingen-Hösel
1987-96	Besuch des Kopernikus-Gymnasiums Ratingen-Lintorf
1996-2001	Studium der Zahnmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Okt. 2001	Zahnmedizinisches Staatsexamen, Abschlussnote: sehr gut
Nov. 2001	Zahnärztliche Approbation
Jan. 2004	Promotion zum Dr. med. dent., magna cum laude Titel: Etablierung einer neuen Methode zur thermisch-energetischen Quantifizierung von Hypersensibilität
2001-2007	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2002 – 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Westdeutsche Kieferklinik, Abteilung für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme, Prof. Dr. Jürgen Becker
Feb. 2007	Anerkennung des Fachzahnarztes für Oralchirurgie
Mai 2007	Medizinisches Staatsexamen, Abschlussnote: sehr gut
Juni 2007	Ärztliche Approbation
Juni - Nov. 2007	Auslandsstipendiat des DAAD an der Universität Sydney, Institut für Molekularwissenschaft und Oralpathologie, Prof. Dr. Hans Zöllner
Seit Feb. 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Universitätsklinikums der Universität zu Köln, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Orale Chirurgie und Implantologie, Prof. Dr. Dr. Joachim Zöller

ANHANG: VERÖFFENTLICHUNGEN

Maßgebliche Anteile dieser Dissertation wurden im Rahmen von drei Originalarbeiten und einer Übersichtsarbeit im Peer-Review-Verfahren veröffentlicht:

Clinical Oral Implants Research (2004, 15: 443-449)

Rothamel D., Schwarz F., Sculean A., Herten M., Scherbaum W., Becker J.

Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and osteoblast-like cells.

Clinical Oral Implants Research (2005, 16: 369-378)

Rothamel D., Schwarz F., Sager M., Herten M., Sculean A., Becker J.

Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes. An experimental study in the rat.

Clinical Oral Implants Research (2006, 17: 403-409)

Schwarz F., Rothamel D., Herten M., Sager M., Becker J.

Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes. An immunhisto-chemical study in the rat.

Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin (2006, 11:1112-1123)

Schwarz F, Sager M, Rothamel D, Herten M, Sculean A, Becker J.

Einsatz nativer und quervernetzter Kollagenmembranen für die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration