

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. dent. J. Becker

Einfluss einer nativen Kollagenmatrix porcinen
Ursprungs in Kombination mit verschiedenen
Wachstumsfaktoren auf die Weichgewebsregeneration im Rattenmodell

Dissertation

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

vorgelegt von

Thomas Kaiser

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Frank Schwarz

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Handschel

Meinen Eltern gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schwarz, F., John, G., Kaiser, T., Mihatović, I., Golubović, V., Becker, J., (2014),
Impact of proangiogenic factors on organization and biodegradation of a collagen
matrix. An immunohistochemical study in rats.
Clinical Oral Implants Research, (25) S. 530–538

Zusammenfassung:

Die Behandlung von Weichgewebsdefiziten nimmt heutzutage in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde einen herausragenden Stellenwert ein. Häufige Indikationen sind die plastische Deckung und Rekonstruktion von chirurgischen Exzisionsstellen, sowie Weichgewebsrezessionen an Zähnen oder zahnärztlichen Implantaten. Der Goldstandard ist gegenwärtig die Verwendung von autogenen Weichgewebstransplantaten vom Gaumen, welche allerdings zu den komplikationsreichsten oralchirurgischen Eingriffen mit einer hohen Entnahmemorbidität zählt. Zur Umgehung dieser klinischen Nachteile wurde in den vergangenen Jahren an alternativen Fremdmaterialien geforscht. Zu guten Ergebnissen führte die Verwendung einer dermalen Matrix von Leichenspendern, welche allerdings aufgrund seiner allogenen Herkunft in Europa und weiten Teilen der Welt nicht zugelassen wurde. Alternativ wurde eine xenogene Kollagenmembran porcinen Ursprungs entwickelt, welche sich bisher aufgrund ihrer spezifischen physikochemischen Eigenschaften als langzeitstabile und wenig resorbierbare Membran in der gesteuerten Knochenregeneration bewährt hat. Die biologischen Eigenschaften zur Weichgewebsregeneration erfordern jedoch ihre rasche Integration sowie gute Substituierbarkeit. Speziell zu diesem Zweck entwickelte Matrixkörper zeigten jedoch eine Abnahme der Integration bei zunehmender Größe, bedingt durch eine Abnahme der Vaskularisation. Mit Hilfe der angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren EPO, HGH, FGF und PDGF könnte die Gewebeintegration durch beschleunigte Vaskularisation vorhersehbar verbessert werden und somit auch die klinische Effektivität der Deckung größerer Defekte maßgeblich gesteigert werden.

Bis heute existieren jedoch noch keine Untersuchungen, die eine Aussage über eine Gewebereaktion und Effektivität der Kollagenmatrix in Verbindung mit diesen Wachstumsfaktoren für die Weichgewebsaugmentation ermöglichen. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den konzentrationsabhängigen Einfluss dieser bioaktiven (pro-angiogenetischen) Wachstumsfaktoren auf die Gewebeintegration und Angiogenese einer porcinen Kollagenmatrix in einer präklinischen Studie an Ratten zu untersuchen. Zudem sollen im Hinblick auf die Unbedenklichkeit in weiteren (prä-)klinischen Studien mögliche Komplikationen (Wundheilungsstörungen, Fremdkörperreaktionen) untersucht werden.

Hierzu wurden Proben einer Kollagenmatrix porcinen Ursprungs entweder mit EPO, HGH, FGF oder PDGF, jeweils in drei unterschiedlichen Konzentrationen (*high, middle, low*) getränkt und randomisiert subkutan in getrennten Taschen auf dem Rücken von 112 Ratten des Wistar Stamms implantiert. Es wurden vier Untersuchungsgruppen festgelegt: 4, 7, 14 und 60 Tage Einheilungszeit. Anschließend wurden die Gewebeproben entnommen und zur histologischen (Dicke der Kollagenmatrix – TH, Gewebekontaktzone – TC) bzw. immunhistochemischen Untersuchung (Kollagen Typ 3 – C3) gefärbt.

Im Ergebnis zeigten die Kollagenmatrizes der Kontrollgruppe ein Einwachsen von C3 Fasern, anschließend eine Zunahme der TH nach 7 (11%), 14 (20%) und 60 Tagen (21%). Die durch Zugabe von pro-angiogenetischen Faktoren in unterschiedlichen Konzentrationen biologisierte Kollagenmatrix zeigte im Ergebnis eine schnellere Organisation der Kollagenmatrix, aber auch einen rascheren Abbau nach 7 (PDGF-M, FGF-M, HGH-H) und 14 Tagen (EPO-H, HGH-L). Alle untersuchten Gruppen zeigten im Verlauf eine ähnliche Zunahme des mittleren TC. Komplikationen (Entzündungen, Schwellungen, Abstoßung) waren nicht feststellbar.

Unter Berücksichtigung der Einschränkungen dieser vorliegenden Studie am Rattenmodell kann zusammengefasst werden, dass alle untersuchten pro-angiogenetischen Faktoren ohne Komplikationen zu einer gesteigerten Integration der hiermit biologisierten Kollagenmatrix durch das Einwachsen von C3-Fasern führten und die Biodegradation der Matrix beschleunigten.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Biodegradation und Organisation können dabei letztendlich nur in Tendenzen auf den Menschen übertragen werden. Das Rattenmodell bot die Möglichkeit, bei größtmöglicher Sicherheit jene Tendenzen in den Ergebnissen zu erkennen und abzuleiten. Die Abwesenheit von Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen zeigt, dass der Einsatz der in Wachstumsfaktoren getränkten Kollagenmatrizes in Zukunft auch in weiteren (prä-)klinischen Studien im Hinblick auf ihre klinische Relevanz bei Weichgewebsaugmentationen unbedenklich erprobt werden könnte.

Abstract:

Nowadays, soft tissue management at implant sites has become a topic of major interest in oral and maxillofacial surgery. Frequent indications are the plastic covering and reconstruction of surgical excision sites and the covering of gingival recessions at teeth or dental implants. Gold standard is currently the transplantation of autogenous palatal soft tissue, which is one of the most complicated oral surgical interventions with high morbidity at extraction site. To bypass these clinical disadvantages, alternative foreign materials were developed and researched on in the last years. The use of a dermal matrix of body donors revealed good results, but because of its allogenic origin it has not been approved in Europe and the most part of the world yet. Alternatively, a xenogeneic porcine-derived collagen membrane has been developed, which has proved as long-term stable in guided bone regeneration (GBR) because of its slow resorption due to its physicochemical qualities. For soft tissue augmentation, the biological qualities need to be fast tissue integration and good convertibility. Purpose-built matrix bodies revealed a reduction in tissue integration when increasing their size, due to a reduced vascularization. By adding proangiogenic growth factors like EPO, HGH, FGF and PDGF, the tissue integration could be improved predictably by faster vascularization and so the clinical outcome of covering of larger defects could be increased significantly.

Until today there are no studies that allow a statement about a tissue reaction and the effectiveness of the collagen matrix in conjunction with these growth factors for soft tissue augmentation. One aim of this study is to investigate the concentration-dependent influence of these bioactive (proangiogenic) growth factors on tissue integration and angiogenesis of a porcine-derived collagen matrix in a preclinical study in rats. In addition, with regard to safety in further (pre-) clinical trials possible complications (wound healing disorders, foreign body reactions) should be investigated.

For this purpose, samples of a collagen matrix of porcine origin with either EPO, HGH, FGF or PDGF, each in three different concentrations (*high, middle, low*) were soaked and randomly subcutaneously implanted in separate pouches on the back of 112 rats of the Wistar strain. Four study groups were established: 4, 7, 14 and 60 days of healing time. Subsequently, the tissue samples were removed and stained for histological (thickness of collagen matrix - TH, tissue contact zone - TC) or immunohistochemical examination (collagen type 3 - C3).

As a result, the collagen matrices of the control group showed an ingrowth of C3 fibers, followed by an increase in TH after 7 (11%), 14 (20%), and 60 days (21%). The collagen matrix biologized by addition of proangiogenic factors at different concentrations resulted in a faster collagen matrix organization, but also a faster degradation after 7 (PDGF-M, FGF-M, HGH-H) and 14 days (EPO-H, HGH-L). All groups studied showed a similar increase in mean TC throughout. Complications (inflammation, swelling, rejection) were not detectable.

Taking into account the limitations of this study on the rat model, it can be summarized that all investigated proangiogenic factors without complications led to an increased integration of the biologized collagen matrix by the ingrowth of C3 fibers and accelerated the biodegradation of the matrix.

The results in terms of biodegradation and organization can ultimately be transferred only in tendencies to humans. The rat model offered the opportunity to identify and derive the tendencies in the results with the greatest possible certainty. The absence of inflammatory and foreign body reactions indicates that the use of growth factor-impregnated collagen matrices in future could be safely tested in further (pre-) clinical trials for their clinical relevance in soft tissue augmentation.

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
BGT	Bindegewebstransplantat
C3	Kollagen Typ III
CAF	<i>coronally advanced flap</i> , koronal verschobener Lappen
CM	Kollagenmatrix (Mucograft® Geistlich Pharma)
EPO-H	Erythropoetin 120units/ml
EPO-L	Erythropoetin 30units/ml
EPO-M	Erythropoetin 60units/ml
e-PTFE	expandiertes Polytetrafluorethylen
FGF-H	<i>fibroblast growth factor</i> 12µg/ml
FGF-L	<i>fibroblast growth factor</i> 3µg/ml
FGF-M	<i>fibroblast growth factor</i> 6µg/ml
FST	freies Schleimhauttransplantat
GBR	<i>guided bone regeneration</i> , (durch Barrieremembran) gesteuerte Knochenregeneration
GTR	<i>guided tissue regeneration</i> , (durch Kollagenmatrix) gesteuerte Geweberegeneration
HGH-H	<i>human growth hormone</i> 8units/ml
HGH-L	<i>human growth hormone</i> 2units/ml

HGH-M	<i>human growth hormone</i> 4units/ml
IL-1	Interleukin 1
MG	Masson-Goldner-Trichrom Färbung
MMA	Methylmethacrylat
mod.	modifizierte
MT	<i>matrix thickness</i> , Matrixdicke
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF(-BB)	<i>platelet derived growth factor</i> (Homodimer Typ B)
PDGF-H	<i>platelet derived growth factor</i> 0,15mg/ml
PDGF-L	<i>platelet derived growth factor</i> 0,0375mg/ml
PDGF-M	<i>platelet derived growth factor</i> 0,075mg/ml
PDL	Parodontalligament
TC	<i>tissue contact</i> , Gewebekontakt
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Grundlagen	1
1.2 Periimplantäres Weichgewebsmanagement: Chirurgische Techniken	2
1.2.1 Freies Schleimhauttransplantat	3
1.2.2 Bindegewebsstransplantat	4
1.3 Alternative: Xenogene Kollagenmatrix	6
1.4 Pro-angiogenetische Wachstumsfaktoren	9
1.4.1 Erythropoetin (EPO)	9
1.4.2 Somatotropin (<i>Human Growth Hormone</i> /HGH)	10
1.4.3 Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i> /FGF) und <i>platelet derived growth factor</i> (PDGF-BB)	11
1.5 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere	13
2.2 Studiendesign	13
2.3 Tränken der Matrices mit den pro-angiogenetischen Faktoren	14
2.4 Chirurgisches Vorgehen	16
2.4.1 Entnahme der Proben	20
2.4.2 Histologische Aufbereitung	23
2.4.3 Masson-Goldner-Trichrom Färbung	23
2.4.4 Immunhistochemische Markierung	25

2.5 Histologische Auswertung.....	25
2.6 Statistische Auswertung.....	26
2.7 Zusammenfassung der Anteile des Doktoranden.....	27
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Zellviabilitätsassay.....	28
3.2 Histologische und Immunhistochemische Analyse.....	29
3.2.1 Zeitpunkt 4 Tage.....	33
3.2.2 Zeitpunkt 7 Tage.....	37
3.2.3 Zeitpunkt 14 Tage.....	42
3.2.4 Zeitpunkt 60 Tage.....	46
4 Diskussion.....	51
4.1 Autologe Transplantate als bisheriger Goldstandard in der Weichgewebsaugmentation.....	52
4.2 Mucograft als Alternative zum autologen Transplantat.....	55
4.3 Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren auf die Biodegradation und Organisation der xenogenen Kollagenmatrices.....	57
4.4 Schlussfolgerung.....	61
5 Literaturverzeichnis.....	62
6 Anhang.....	72

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen

Die Insertion dentaler Implantate gilt als weitverbreitete und zuverlässige Methode, um fehlende Zähne zu ersetzen. Doch der Erfolg einer Implantation misst sich nicht nur an der Stabilität und Osseointegration eines Implantates, sondern gleichermaßen an dem ästhetischen Ergebnis, welches nicht zuletzt von dem Verlauf, der Form und der Struktur des an das Implantat angelagerten Weichgewebes abhängig ist. Als ästhetisch ideal gilt ein harmonischer Mukosaverlauf, welcher sich an den Verlauf und das Volumen der Gingiva der vorhandenen Restbezahnung anpasst. Idealerweise sollten die Zahnzwischenräume durch Interdentalpapillen aufgefüllt sein. Dieses ästhetische Ergebnis ist gefährdet, wenn sich das Zahnfleisch um das Implantat zurückzieht und es zu sogenannten Rezessionen kommt. Diese verursachen die Freilegung von Kronenrändern, prothetischen *Abutments* oder die Entstehung schwarzer Dreiecke in den Zahnzwischenräumen durch den Abbau der Interdentalpapillen (*black triangle disease*). Potenzielle Risikofaktoren für das Auftreten von Rezessionen an Implantaten sind zum einen ungünstige biologische Gegebenheiten, wie zu wenig oder nicht vorhandene keratinisierte Gingiva im Bereich des Implantationsortes (Bengazi et al. 1996; Zigon & Machtei, 2008), der physiologische Umbauprozess des Knochens nach Implantation und/oder Fixation des *Abutments* oder zu weit vestibuläre Positionierung des Implantates (Wennström, 1996). Des Weiteren können mukosale Rezessionen durch periimplantäre Infektionen begünstigt werden. Grundsätzlich kann zwischen der periimplantären Mukositis, einer reversiblen Entzündung des Weichgewebes, und der Periimplantitis, einer zusätzlichen progressiven Entzündung des Hartgewebes, unterschieden werden (Albrektsson et al., 1994). Ätiologisch liegt beiden Fällen eine Besiedlung mit bakterieller Plaque zugrunde, wobei der Verlauf durch individuelle anamnestische Risikofaktoren, wie zum Beispiel Nikotinkonsum, Diabetes Mellitus oder IL-1 Polymorphismus ungünstig beschleunigt werden kann. Der Zusammenhang zwischen der Entstehung periimplantärer Infektionen oder der

Überlebensrate von Implantaten und der Breite der keratinisierten Gingiva ist Gegenstand zahlreicher Studien und wurde häufig diskutiert. Verschiedene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einem ausreichend breiten Band an keratinisierter Schleimhaut und höheren Überlebensraten von Implantaten, Gesundheit der periimplantären Mukosa und verbesserten ästhetischen Ergebnissen (Thoma et al., 2009; Adell et al. 1986; Artzi et al., 1993; Langer 1996). Eine aktuell ausgearbeitete S3-Leitlinie über die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten von der Autorengruppe um Schwarz und Becker zeigt auf, dass alle gängigen chirurgischen Therapieansätze zur Eliminierung periimplantärer Entzündungen und Mukosataschen ein Risiko für die postoperative Entstehung mukosaler Rezessionen bergen, weshalb auch zur Stabilisierung der periimplantären Mukosa nach chirurgischer Periimplantitis-Therapie eine Weichgewebsaugmentation erwogen werden kann (Schwarz, Becker et al., 2016).

Nach den Anforderungen der biologischen Breite ist periimplantär etwa ein Band von 2mm Breite an befestigter Gingiva anzustreben (Lang & Loe, 1972). Die keratinisierte Gingiva gilt als fest und widerstandsfähig gegen mechanische Beanspruchung (Schroeder et al., 1992) und hat positiven Einfluss auf die Hygienefähigkeit von Implantat und prothetischem Aufbau (Lang & Loe, 1972). Generell hat heutzutage das periimplantäre Weichgewebsmanagement, speziell bei der Implantation in dem ästhetisch sensiblen Frontzahnbereich, stark an Bedeutung gewonnen und hat den Nutzen, das Band der keratinisierten Gingiva zu verbreitern oder das Volumen des Weichgewebes aufzupolstern (Cairo et al., 2008; Palmer & Cortellini, 2008).

1.2 Periimplantäres Weichgewebsmanagement: Chirurgische Techniken

In der Mukogingivalchirurgie haben sich zahlreiche Techniken etabliert, welche indikationsabhängig die Deckung von Rezessionen oder den Gewinn an Gewebenvolumen und keratinisierter Schleimhaut ermöglichen. Hier sind zum einen die Lappenplastiken zu nennen, welche durch das Prinzip der Schleimhautmobilisation und Verschiebung eine Deckung von Rezessionen ermöglichen können. Bekannte Beispiele hierfür sind der koronal verschobene

Lappen (Norberg 1926, Allen & Miller Jr. 1989) oder der apikal verschobene Lappen (Nabers 1954).

Das Band an keratinisierter Gingiva kann durch eine sogenannte Vestibulumplastik verbreitert werden. Dabei wird ein Mukosalappen präpariert, nach apikal verschoben und dort auf dem Periost fixiert. Die Periostwundfläche heilt dann mittels freier Granulation aus. Ursprünglich diente die Vestibulumplastik im Rahmen der präprothetischen Chirurgie der Vergrößerung des Mundvorhofes zur Gestaltung eines adäquaten Ventilrandes. In der modernen Zahnheilkunde findet die Vestibulumplastik aber auch im Bereich der periimplantären Mukogingivalchirurgie Anwendung, um den Bereich der keratinisierten Gingiva zu verbreitern.

Weitere bedeutende Techniken sehen die Transplantation von autologem Weichgewebe zur Therapie oben genannter Indikationen vor. Transplantiert werden Bindegewebstransplantate (BGT) oder freie Schleimhauttransplantate (FST).

BGT und FST können als alleinige chirurgische Maßnahme eingesetzt werden, oder in Kombination mit anderen Techniken angewandt werden. Beispielsweise kann die freiliegende Periostfläche bei einer Vestibulumplastik mit einem FST abgedeckt werden, was den Vorteil hat, dass die zu erwartende Wundkontraktion, welche eine Narbenbildung infolge der sekundären Epithelialisierung hervorrufen kann, verringert wird. Aufgrund ihrer klinischen und histologischen Charakteristiken sind autologe, keratinisierte Transplantate vom harten Gaumen für eine Transplantation zur Rezessionsdeckung oder zur Verbreiterung des Bandes an keratinisierter Gingiva besonders gut geeignet (Cawood, J.I. & Stoelinga, P.J. 2000), da diese der unbeweglichen Schleimhaut des Alveolarkamms am ähnlichsten sind (Metin, M. et al., 2003; Schroeder, H.E., 1987; Schultze-Mosgau, S. et al., 2003).

1.2.1 Freies Schleimhauttransplantat

Die Entnahme von Gingivatransplantaten zur Deckung dentaler Rezessionen wurde erstmals von Bjorn im Jahr 1963 beschrieben (Bjorn, H., 1963). Nabers setzte freie Schleimhauttransplantate Mitte der 60er Jahre dann bei

Vestibulumplastiken ein und beschrieb die Möglichkeit der Verbreiterung der keratinisierten Gingiva mit Hilfe von transplanterter Gingiva (Nabers, 1966)

Gewöhnlich werden FST am Gaumen entnommen, wo mit Hilfe eines *Split-flaps* ein ausreichend großes Stück epithelisierter Gingiva mitsamt darunterliegendem Bindegewebe entnommen wird. Das Periost verbleibt auf dem Knochen und heilt über freie Granulation. Zum Schutz der Wunde und zur Vorbeugung eventueller Nachblutungen empfiehlt sich die Abdeckung der Wundfläche mit einer eigens für diesen Eingriff auf vorher hergestellten Modellen angefertigten Wundschutzplatte (Tiefziehfolie aus Kunststoff). Die Vorteile freier Schleimhauttransplantate sind eine hohe Vorhersagbarkeit und gute Planbarkeit, sowie eine relativ einfache chirurgische Technik (Rucha et al., 2015). Dennoch birgt die Anwendung freier Schleimhauttransplantate auch einige Nachteile, wie beispielsweise ästhetische Einschränkungen beim Vergleich mit der Gingiva in der Empfängerregion. So erscheint die Farbe eines eingeweilten FST häufig blasser und die Oberfläche etwas wulstiger als die angrenzende Gingiva (Rucha et al., 2015).

1.2.2 Bindegewebestransplantat

Wie auch die freien Schleimhauttransplantate erfolgt die Entnahme von Bindegewebe in der Regel vom Gaumen, weitere Spenderregionen können der *Tuber maxillae* oder zahnlose Kieferkammabschnitte darstellen (Kumar et al., 2013).

Bei der Entnahme von Bindegewebestransplantaten wird das subepitheliale Bindegewebe entnommen und die Spenderregion mit Hilfe des gestielten epithelisierten Lappens verschlossen. Subepitheliale Bindegewebestransplantate eignen sich besonders zur Verdickung des Weichgewebevolumens (Thoma et al., 2009). Ebenso wie die freien Schleimhauttransplantate gelten BGT als vielversprechende Methode, um gingivale Rezessionen auch an Implantaten zu decken.

Laut dem aktuellen Konsensus Bericht des 10. *European Workshop on Periodontology* gelten BGT und FST als Standardtherapie bei der Verdickung des Weichgewebevolumens und in Kombination mit einem Apikalen Verschiebelappen als Mittel der Wahl bei der Verbreiterung des Bandes an keratinisierter Gingiva (Hämmerle und Giannobile, 2014, Vignoletti et al., 2014).

Dennoch ist der Einsatz autologer Transplantate assoziiert mit nicht zu vernachlässigenden intra- und perioperativen Risiken und Nachteilen. Hier sind zum einen gewisse Limitationen bei der Quantität und Qualität des entnommenen Gewebes in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht des Patienten, sowie die Anatomie des Gaumens (u. a. Grad der Wölbung, Verlauf der *A. palatina* und des *N. palatinus major*) zu nennen. Zum anderen ist die langwierige Wundheilung in der Spenderregion einhergehend mit einer hohen Entnahmemorbidität für den Patienten ein nicht zu vernachlässigender Nachteil, den die Entnahme autologer Transplantate mit sich bringt (Thoma et al., 2011; Roccuzzo et al., 2012; Griffin et al., 2006; Mc Guire et al., 2008). So beklagen viele Patienten häufig postoperativ über mehrere Wochen anhaltendes Taubheitsgefühl und Schmerzen im Bereich der Entnahmestelle (Del Pizzo et al., 2002; Soileau & Brannon, 2006).

Um diese nicht unerheblichen Nachteile zu überwinden, wurde als Alternative zu autologen Transplantaten eine azelluläre dermale Matrix vorgestellt (Park, 2006; Yan et al., 2006). Der Ursprung solcher allogenen Gewebe ist Haut, entnommen von menschlichen Leichen. Trotz vielversprechender histologischer und klinischer Ergebnisse im Hinblick auf die Verbreiterung der keratinisierten Schleimhaut, haben diese Materialien den Nachteil, dass sie nicht von jedem Empfänger uneingeschränkt akzeptiert werden (Schwarz et al., 2012). Des Weiteren sind allogene Transplantate assoziiert mit ethischen und moralischen Bedenken und einem möglichen Risiko der Übertragung von Krankheiten und der Abstoßung durch den Empfänger (Sanz et al., 2009). Somit wurde zur Vermeidung dieser Nachteile und Risiken eine xenogene Matrix, basierend auf porcinem Kollagen, entwickelt, welche sich bereits bei diversen klinischen Studien durch eine mit Bindegewebs-transplantaten vergleichbare Zunahme an keratinisierter Gingiva bewährt hat (Sanz et al., 2009; Lorenzo et al., 2012).

1.3 Alternative: Xenogene Kollagenmatrix

Durch den Einsatz xenogener Materialien soll die Entnahme autologer Transplantate vermieden werden, um die damit verbundenen intra- und postoperativen Risiken und Nachteile zu umgehen (Herford, A.S. et al., 2010; Werhahn, F. et al., 2010).

Als xenogen bezeichnet man im Rahmen des *Tissue Engineering* Materialien, welche von einer anderen Spezies als dem Empfänger entnommen wurden. So wird zum Beispiel ein aus Rinderspongiosa gewonnenes Hydroxylapatit, welches durch aufwändige Pyrolyse chemisch und thermisch von allen organischen Bestandteilen gereinigt wurde, als xenogenes Knochenersatzmaterial eingesetzt (Schlegel, K.A. et al., 2003). Dieses Material dient als Gerüst für sich anlagernde Zellen und einsprossende Blutgefäße, wodurch sich neuer Knochen bilden kann. Es ist allerdings heutzutage nicht nur möglich, Knochen durch spezie fremde Materialien zu ersetzen, sondern auch Weichgewebe zu generieren.

Um eine realistische Alternative zu autologen Weichgewebstransplantaten darzustellen, muss das xenogene Material spezifische klinische und histologische Kriterien erfüllen (Thoma et al., 2011):

- erfolgreiche Integration in das umliegende Gewebe
- Fähigkeit zur Biodegradation und letztendlich Ersetzung durch körpereigenes Weichgewebe
- dreidimensionale Volumenstabilität auch bei physiologischen Belastungen, wie Druck und Zug im Augmentationsbereich

Der Einsatz von Kollagenmembranen porcinen Ursprungs wird bereits standardmäßig im Bereich der oralen Wundheilung bei Knochenaugmentationen, der sogenannten *Guided bone regeneration* (gesteuerte Knochenregeneration, GBR) oder der *Guided tissue regeneration* (gesteuerte Geweberegeneration, GTR) eingesetzt (Hämmerle et al., 2002; Wallace & Froum, 2003).

Die Technik der GBR und GTR basiert auf dem Konzept, die unerwünschte Wanderung epithelialer Zellen in den Bereich der ossären Wundheilung zu verhindern, indem die Membran durch zellokklusive Eigenschaften als Barriere fungiert, welche ausschließlich die Knochenregeneration fördernde Zellen passieren können. Neben der Zellokklusivität sind wichtige Anforderungen, die

Materialien zur Herstellung von Membranen in dieser Indikation erfüllen sollen, eine hohe Biokompatibilität, Gewebeintegrativität, Platzhalterfunktion, Nährstoffaustausch und natürlich eine leichte Handhabung (Schwarz et al., 2012; Hardwick et al., 1994). Zunächst eingesetzte nicht resorbierbare Materialien, wie expandiertes Polytetrafluorethylen (ePTFE), konnten sich aufgrund der Notwendigkeit eines zweiten Eingriffs zur Entfernung des Materials und häufiger Komplikationen, wie eine frühzeitige Exposition im Wundgebiet oder bakterielle Besiedlung, nicht langfristig durchsetzen (Hardwick et al., 1994; Selvig et al., 1992; Temprow & Nalbandian, 1993).

Als Alternative wurden Membranen aus resorbierbaren Materialien, wie zum Beispiel Polylactid- oder Polyglykolsäure eingeführt. Heutzutage werden Membranen häufiger aus fibrillärem Kollagen (Typ I und III) porcinen oder bovinen Ursprungs hergestellt.

Kollagen bietet dabei eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Materialien. Zum einen spielt es eine aktive Rolle bei der Blutkoagulation und ist ein wichtiger natürlicher Bestandteil des parodontalen Ligamentes (PDL), zum anderen wirkt es chemotaktisch auf PDL- und Gingiva-Fibroblasten (Schwarz et al., 2012). Im Rahmen der GBR und GTR eingesetzte Kollagenmembranen sind durch ein natürlich quervernetztes Kollagengerüst (native Kollagenmembranen) charakterisiert. Sie zeigten in zahlreichen Studien erfolgreiche und überzeugende Ergebnisse im Hinblick auf die Ausheilung ossärer und parodontaler Läsionen (Becker et al., 1992; Pitaru 1988).

In weiteren klinischen und präklinischen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass durch den Einsatz nativer Kollagenmembranen die Breite an keratinisierter Gingiva vergrößert werden kann und sie somit eine Alternative zu autologen Transplantaten darstellen könnten (Sanz et al., 2009; Jung et al., 2011).

Dennoch ist der Einsatz nativer Kollagenmembranen im Bereich der Weichgewebsaugmentation eingeschränkt, da sie relativ schnell durch die enzymatische Aktivität von Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten abgebaut werden, somit einer raschen Biodegradation unterliegen, instabil werden und kollabieren (Thoma et al., 2011; Tatakis et al., 1999). Sie verfügen also über eine nur sehr geringe Volumenstabilität, was die Indikationen im Bereich der Weichgewebsaugmentationen streng limitiert. Aus diesem Grunde wurden im Hinblick auf die Indikation zur Weichgewebsaugmentation Kollagenmatrices

entwickelt, welche die Biodegradation verzögern und dadurch über einen längeren Zeitraum als die nativen Membranen Volumenstabilität bieten können. Dies kann mittels chemisch modifizierter dreidimensionaler Quervernetzung erreicht werden (Rothamel et al., 2005), welche zum Beispiel durch den Einsatz von ultraviolettem Licht, Glutaraldehyd oder diversen Acylsäuregruppen, welche an methylierte Carboxylgruppen des Kollagens binden und diese somit dreidimensional vernetzen (Kodama et al., 1989; Brunel et al., 1996; Zahedi et al., 1998), erfolgt. Das sogenannte chemische *cross-linking* kollagenbasierter Biomaterialien erhöht deren Stabilität und Beständigkeit *in vivo* (Petite, H. et al., 1994).

Im Hinblick auf die Biodegradation konnte in verschiedenen Tierversuchen nachgewiesen werden, dass sie bei den quervernetzten Kollagenmatrices im Vergleich zu nativen, nicht quervernetzten Membranen deutlich verzögert erfolgte (Pitaru et al., 1988; Paul et al., 1992).

Ein Beispiel für solch eine chemisch modifizierte, volumenstabile Kollagenmatrix ist das Produkt Mucograft®, entwickelt von der Geistlich Pharma AG (Wolhusen, Schweiz), eine 2-3mm dicke, hochgereinigte Matrix auf porciner Basis. Sie besteht aus einer kompakten Schicht, welche mit dem umliegenden Gewebe vernäht werden kann und durch ihre dichte, aber gleichzeitig elastische Struktur das Anhaften von Gewebe ermöglicht, und aus einer zweiten Schicht, welche aus einer dicken und porösen Kollagenmatrix besteht und dem Gewebe am Transplantationsort aufliegen sollte. Die poröse Struktur dieser Schicht erleichtert die Aufnahme von Flüssigkeit, was eine gute Adhäsion an das Transplantatlager ermöglicht, sowie die Bildung eines Blutkoagulums, was letztendlich das Einwachsen neuer Gefäße in die Matrix fördert.

Es konnte bereits in diversen Studien gezeigt werden, dass diese Matrix mit autologen Schleimhauttransplantaten vergleichbare Ergebnisse bei der Gewinnung an keratinisierter Schleimhaut an Implantaten zeigte (Sanz et al., 2009; Lorenzo et al., 2012).

Des Weiteren konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass das poröse Kollagengeflecht dieser Matrix homogen von einem dichten, gut vaskularisierten Bindegewebe durchwachsen wurde (Thoma et al., 2011; Schwarz et al., 2012), was mit einer Zunahme des Weichgewebsvolumens in der Empfängerregion assoziiert ist.

Die Limitation der Anwendung der Kollagenmatrix besteht jedoch in einer Abnahme der Gewebeintegration mit zunehmender Größe (Herford et al., 2010; McGuire et al., 2010). Diese Einschränkung ist primär auf eine Abnahme der Vaskularisation der spezifischen interkonnektierenden Porenstruktur der Kollagenmatrix aus dem angrenzenden Gewebe zurückzuführen. Da einerseits die Kollagenproduktion selbst und die Angiogenese durch den Einfluss bioaktiver Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem potenten Glykoprotein EPO, speziellen Peptidhormonen (z.B. Somatotropin) oder Mitogenen (z.B. PDGF), nachweislich gesteigert werden kann (Caperna et al., 1994; Throckmorton et al., 1995; Yamabe et al., 200; Haroon et al., 2003), könnten diese Faktoren die Gewebeintegration fördern, die Organisation und Substitution von Kollagenmatrices durch Bindegewebe begünstigen, die Vaskularisation des Matrixkörpers steigern und somit möglicherweise die Techniken und Möglichkeiten der Weichgewebsaugmentation zur Abdeckung auch größerer Weichgewebsdefekte vorhersagbar verbessern. Der Einsatz von Mucograft® als xenogene Alternative zu freien Schleimhauttransplantaten ist in Deutschland mit CE-Zertifizierung zugelassen – der additive Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Biologisierung dieser Matrix in diesem Zusammenhang hingegen europaweit bisher nicht. Auch liegen keine Studien aus dem Tierversuch vor.

1.4 Pro-angiogenetische Wachstumsfaktoren

Als Angiogenese bezeichnet man die Aussprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen in ein Zielgewebe, basierend auf der Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen (Carmeliet, 2000; Risau, 1997). Dies ist Voraussetzung für eine gute Gewebeintegration und Wundheilung, auch bei der Biodegradation und Organisation von xenogenen Kollagenmatrices. Dabei stellt die Angiogenese ein komplexes Zusammenspiel von Aktivatoren (pro-angiogenetische Faktoren) und Inhibitoren (anti-angiogenetische Faktoren) dar (Conway, E.M. et al., 2001). Überwiegt der Einfluss der Angiogenese-stimulierenden Faktoren, wird die Angiogenese und somit die Gewebe(um)organisation induziert. Die pro-angiogenetischen Faktoren, welche in dieser Studie auf ihren potenziellen Einfluss auf die Biodegradation und Organisation xenogener Kollagenmatrices untersucht werden, sind Erythropoetin

(EPO), Somatotropin (HGH), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF).

1.4.1 Erythropoetin (EPO)

Erythropoetin ist ein hitzestabiles Glykoprotein-Hormon aus 165 Aminosäuren, welches durch peritubuläre interstitielle Fibroblasten in der Niere und zu einem kleinen Anteil auch durch parenchymale Leberzellen, Astrozyten und Makrophagen (Jelkmann, W., 1982; Koury, S.T. et al., 1988; Brines, M.L. et al., 2000; Lippi et al., 2000) bei sinkendem Sauerstoffpartialdruck im Gewebe (Hypoxie), sinkenden Erythrozytenzahlen (Bondurant, M.C. et al., 1982) oder Hämoglobinkonzentrationen $<12\text{g/dl}$ (Finch, C.A., 1982), zum Beispiel in Folge einer Anämie, ausgeschüttet wird. Die Funktion innerhalb des menschlichen Organismus liegt in der Stimulation zur Proliferation und Differenzierung erythrozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark. Somit steigert EPO die Anzahl hämoglobinbildender Erythroblasten und letztendlich die Sauerstofftransportkapazität des Blutes. Zudem wirkt es gleichzeitig antiapoptotisch auf diese Zellen (Koury, M.J. & Bondurant, M.C., 1991). Bei steigender EPO-Konzentration im Blut, sinkt die Dauer der Erythropoese. Die physiologische Plasmakonzentration von EPO liegt bei 10-25U/l. Neben den blutbildenden Zellen im Knochenmark exprimieren auch andere Zellarten, wie Endothelzellen (Yamaji, R. et al., 1996), glatte Muskelzellen (Morakkabati, N et al., 1996) und Zellen neuralen Ursprungs (Masuda, S. et al., 1993) Erythropoetin-Rezeptoren, wobei der Einfluss von EPO auf diese Zellen bis heute nur in Ansätzen erforscht und bekannt ist. Erythropoetin als Wachstumsfaktor ist besonders in der Fetalperiode von Bedeutung, in welcher EPO-Rezeptoren über den ganzen Körper verteilt in den Geweben exprimiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass Erythropoetin während des fetalen Wachstums als Wachstumshormon und Differenzierungsfaktor fungiert (Juul, S.E. et al., 1998). EPO konnte im Mausmodell allerdings auch ein positiver Einfluss auf Wundheilungsprozesse nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Einzeldosis von EPO die Epithelisation und Differenzierung des mikrovaskulären Gefäßsystems beschleunigt (Sorg, H. et al., 2009). Die Frage nach der Übertragbarkeit dieses

Effekts auf die Einheilung xenogener Kollagenmatrices ist für die vorliegende Arbeit interessant.

1.4.2 Somatotropin (*Human Growth Hormone*/HGH)

Das Wachstumshormon Somatotropin ist ein Proteohormon welches in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird. Seine stimulierende Wirkung auf die Kollagensynthese wurde vor allem im Zusammenhang mit der Krankheit Akromegalie bekannt, bei welcher es zu einer pathologischen Bindegewebszunahme und damit Vergrößerung der Organe kommt. Die Erkrankung wird durch einen Hypophysentumor ausgelöst, welcher die Ausschüttung von Somatotropin steigert. Im Zusammenhang mit der GTR wäre eine gesteigerte Kollagensynthese wünschenswert, weshalb der Einfluss von lokal angewandtem Somatotropin auf die Degeneration einer porcinen Kollagenmatrix in dieser Arbeit untersucht werden soll.

1.4.3 Fibroblasten Wachstumsfaktor (*Fibroblast Growth Factor*/FGF) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF-BB)

FGF und PDGF gehören als Wachstumsfaktoren zu der Gruppe der Zytokine und besitzen mitogene Eigenschaften. FGF wirkt stimulierend auf die Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen und neuroektodermalen Zellen und fördert somit die Differenzierung und Proliferation neuen Bindegewebes und neuer Blutgefäße. Zudem gelten Subtypen der FGF-Familie als Schlüsselmoleküle bei der intrazellulären Kommunikation während der Embryogenese (Naski et al., 1996; Martin, 1998). Auch die Mitogene der PDGF-Familie sind an der Embryogenese beteiligt. Sie werden von Granulozyten und Makrophagen freigesetzt um die Gewebereparation und Regeneration zu stimulieren, indem sie die Angiogenese, Zellmigration und Proliferation fördern (Heldin et al., 1981; Shimokado et al., 1985; Ross et al., 1986).

1.5 Ziele der Arbeit

Es ist gängige Technik in der Mukogingivalchirurgie an Implantaten, zur Deckung von Rezessionen oder zur Optimierung des Angebotes an keratinisierter Schleimhaut, autologe Schleimhaut- oder Bindegewebstransplantate zu entnehmen und zu verpflanzen. Auch im Management chirurgisch therapierter periimplantärer Infektionen wird laut aktueller S3-Leitlinie der Einsatz von Weichgewebsaugmentationen im Falle von postchirurgisch aufgetretenen mukosalen Rezessionen an Implantaten empfohlen (Schwarz, Becker et al., 2016). Die Entnahme autologer Transplantate geht dabei häufig mit einer hohen Entnahmemorbidität einher und birgt intraoperative Risiken. Als Alternative bietet sich zur Vermeidung dieser Nachteile der Einsatz xenogener Kollagenmatrices an, welche aus porcinem Gewebe gewonnen werden.

Ziel dieser Studie ist es, den konzentrationsabhängigen Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren (Erythropoetin, Somatotropin, Fibroblasten Wachstumsfaktor und *Platelet Derived Growth Factor*) auf die Organisation und Biodegradation einer porcinen Kollagenmatrix in einer präklinischen Studie an Ratten zu untersuchen. Die Kernfrage ist dabei, ob die Applikation eines der oben genannten Wachstumsfaktoren die Organisation und Biodegradation der Kollagenmatrix verbessern könnte und somit den Erfolg eines mukogingivalchirurgischen Einsatzes solcher Membranen auch am Menschen erhöhen könnte. Des Weiteren sollen in diesem Zusammenhang eventuell auftretende Komplikationen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In dieser Studie wurden insgesamt 112 Albino Ratten des Wistar Stammes eingesetzt. Sie waren zwischen 63-77 Wochen alt und wogen durchschnittlich 412 ± 38 g. Die Ratten wurden während der gesamten Studie nach Bedarf mit den in Labors üblichen Futterpellets und Wasser *ad libitum* gefüttert.

Das Studienprotokoll wurde bei der zuständigen Behörde (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Recklinghausen, Deutschland) geprüft und gem. §8 Abs. 1 TierSchG genehmigt (Az.: 87-51.04.2010.A367, siehe Anhang). Die versuchstierkundliche Einführung zum Erwerb des Fachkundenachweises gem. §9 TierSchG fand am 08.10.2010 statt (Anhang).

2.2 Studiendesign

Die Versuchstiere wurden nach Heilungsperioden in vier Gruppen aufgeteilt (4 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 60 Tage), wobei je 28 Tiere einer Gruppe angehörten. Jeder Ratte wurden chirurgisch jeweils vier nicht miteinander verbundene Taschen auf dem Rücken präpariert, was folglich $n=112$ Taschen pro Heilungsperiode ergab.

Proben einer Kollagenmatrix porcinen Ursprungs (Mucograft®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) wurden entweder in drei verschiedenen Konzentrationen (hoch, mittel, niedrig) mit EPO, HGH, FGF bzw. PDGF-BB getränkt oder als Kontrollgruppe ohne Zusatz eines Wachstumsfaktors nur mit 0,9% NaCl-Lsg. (B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) getränkt und zufällig auf die Taschen der verschiedenen Untergruppen aufgeteilt. Die Verteilung wurde mithilfe einer Randomisierungssoftware mittels Block-Randomisierung ermittelt (Randlist®, DatInf GmbH, Tübingen, Deutschland).

Dementsprechend behandelt die vorliegende Studie $n=12$ Testgruppen (z.B. EPO-M, HGH-L etc.) und $n=1$ Kontrollprobe, welche jeweils achtfach pro Heilungsperiode vorkommen.

2.3 Tränken der Kollagenmatrices mit den pro-angiogenetischen Faktoren

Während der chirurgischen Phase wurden 20x10mm große Proben der Kollagenmatrices (Abb. 1 und 2) in den jeweiligen pro-angiogenetischen Faktoren getränkt, welche zuvor in sterilem Wasser gelöst wurden (0,5 ml pro Probe). Jeder Faktor wurde dabei in hohen (H=high), mittleren (M=medium) und niedrigen (L=low) Konzentrationen geliefert:

- rhPDGF-BB (XFBZ02, Osteohealth®, Shirley, NY, USA)
L: 0,0375mg/ml; M: 0,075mg/ml; H: 0,15mg/ml
- FGF-2 (SRP4037, Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, USA)
L: 3µg/ml; M: 6µg/ml; H: 12µg/ml
- EPO (Epoetin beta, NeoRecormon®, Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)
L: 30units/ml; M: 60units/ml; H: 120units/ml
- HGH (S8648, Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, USA)
L: 2units/ml; M: 4units/ml; H: 8units/ml

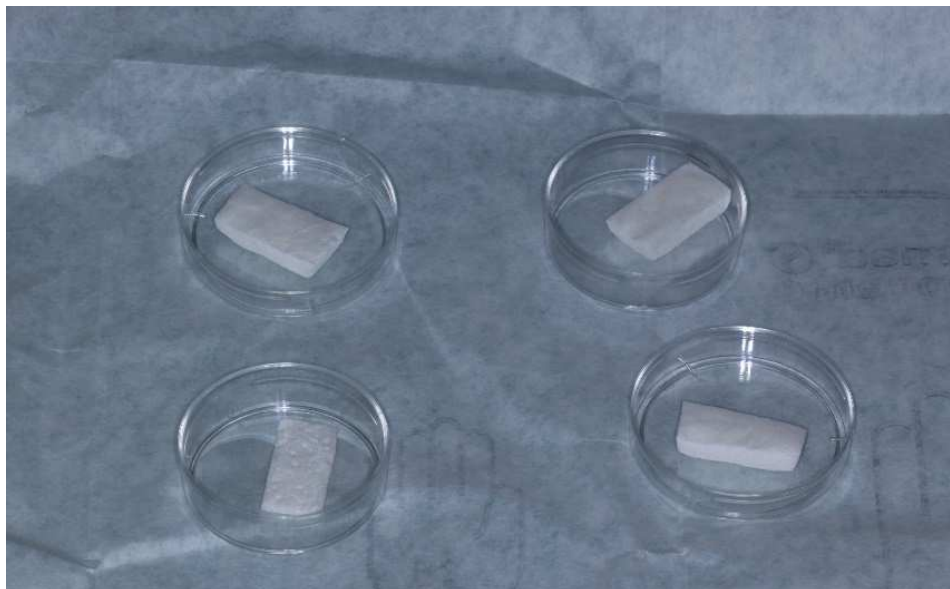


Abb. 1: Kollagenmatrices in sterilen Glasschalen

Die Kontrollproben wurden ausschließlich mit 0,5ml steriler Kochsalzlösung befeuchtet.



Abb. 2: **Großansicht zweier 10x20mm Kollagenmatrices**

Nach einer Einwirkzeit von 15min in den jeweiligen Lösungen, wurden die einzelnen Matrixproben in die präparierten subkutanen Taschen auf dem Rücken der Ratten implantiert (Abb. 5-8). Die Bioaktivität der Testgruppen (n=5 pro Gruppe) wurde nach einer dreitägigen Inkubationszeit mit humanen Gingivafibroblasten (HFIB-G, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland) (fünfte Passage, 5×10^4 Zellen kultiviert in 2ml von Dulbeccos modifiziertem Medium, DMEM-*high Glucose*, Glutamax; Sigma-Aldrich, Schnelldorf ergänzt mit 1% Penicillin/Streptomycin und 15% fetalem bovines Serum) unter Verwendung eines Zellviabilitätstests zur quantitativen Bestimmung des Stoffwechselmetaboliten Adenosintriphosphat (CellTiter-Glo®, Promega, Mannheim, Deutschland) in einem Luminator gemessen (Victor 2030, PerkinElmer, Rodgau, Deutschland). Das luminometrische Signal wurde in *Counts per Second* (CPS) gemessen. Die unbenetzten Kollagenmatrices dienten als jeweilige Kontrollgruppe.

2.4 Chirurgisches Vorgehen

Die experimentelle Phase wurde gemäß einem bewährten chirurgischen Protokoll durch auf dem Gebiet der Tierversuchskunde erfahrenen Experimentatoren und dem Doktoranden als Assistenz durchgeführt. Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 7,5mg/kg Ketamin (Ketanest®, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in Kombination mit 5mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Ein Bereich von circa 8cm Länge und circa 4cm Breite wurde auf dem Rücken jeder Ratte mit einem Elektrorasierer und einer Rasierklinge enthaart. Anschließend erfolgte eine Desinfektion mit Polyvidon-Jod (Betaisodona®, Mundipharma, Limburg an der Lahn, Deutschland) (Abb. 5). Dann wurde paramedian entlang der Wirbelsäule inzidiert (Abb. 6) und vier nicht miteinander in Verbindung stehende subkutane Taschen präpariert, auf welche die Proben mittels Block-Randomisierung verteilt wurden (Abb. 7). Die Applikationen wurden einzeln im OP-Protokoll (Abb. 3) dokumentiert.

Die Randomisierung war weder den Operateuren direkt, noch dem Doktoranden als histologischen Untersucher, sondern lediglich dem vorbereitenden Assistenz-Team während der OP bekannt. Insgesamt wurden 448 Proben auf ebenso viele subkutane Taschen verteilt ($n_1=4$ Hauttaschen; $n_2=28$ Ratten pro Beobachtungsperiode; 4 Beobachtungsperioden).

Projekt Nr.: G/367/2010	Tier Nr.: ____ / ____	Gewicht: _____ g
OP-Gruppe: ____ Tage		
Datum der OP: _____	OP Beginn: _____	OP Ende: _____
Operator: _____ Assistenz: _____		
Datum der Entnahme: _____		

Med: _____ ml Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100mg/ml)
 _____ ml Rompun®-Lsg. (2% Xylazinhydrochlorid)
 _____ ml Rimadyl® (Carprofen 50mg/ml)
 _____ ml _____

cranial	Pouch 1	Pouch 3
	Pouch 2	Pouch 4

[] Post OP:	Datum:	Datum:
	Datum:	Datum:
Nahtdehiszenz (J/N):		
Wundheilung (<u>R</u> egelrecht / <u>K</u> omplikation):		
Besonderheiten:		

Abb. 3: **OP-Protokoll zur Dokumentation**

Für jedes Tier wurde erneut steril aufgedeckt, um Übertragungen von Pathogenen zu vermeiden (Abb. 4). Für jede Taschenapplikation wurde eine eigene Pinzette verwendet.



Abb. 4: Steriles OP-Setup je Tier



Abb. 5: Desinfektion des rasierten OP-Bereichs

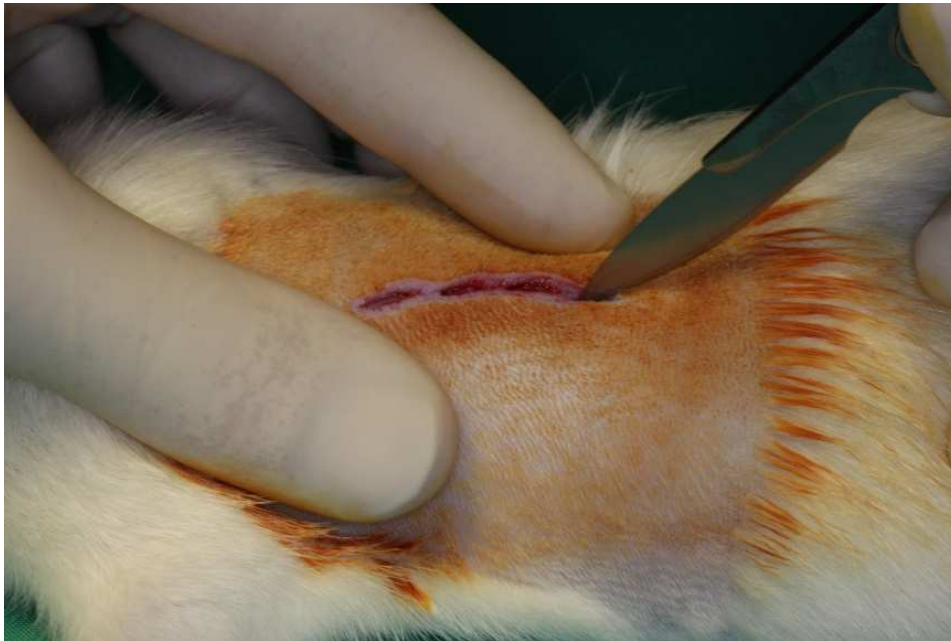


Abb. 6: **Kutane Inzision paravertebral**



Abb. 7: **Platzierung in *Pouch* 1 mit neuer, steriler Pinzette**

Der primäre Wundverschluss wurde mit einer subkutanen horizontalen 5-0 Matratzennaht und einer nachfolgenden 3-0 kutanen Naht mittels resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl®, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Deutschland) ausgeführt (Abb. 8). Die postoperative Analgesie wurde mittels 4,5mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Pharma GmbH) subkutan direkt postoperativ, sowie am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Operation durchgeführt.



Abb. 8: Hautnähte (Einzelknopf) Vicryl® 3-0

2.4.1 Entnahme der Proben

Die Tiere wurden in der Pathologie der Tierversuchsanlage (Az. des ZETT, ehem. TVA: G/367/2010) in einer Kohlendioxid-Kammer nach 4, 7, 14 oder 60 Tagen Einheilungszeit getötet. Reste der Proben wurden mitsamt dem umliegenden Bindegewebe entfernt (Abb. 9-11) und bei Raumtemperatur in einer 10% gepufferten (pH=6,9) Formalinlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 4-7 Tage fixiert (Abb. 12).



Abb. 9: Freilegung der Entnahmestelle, Tier 6, Zeitpunkt 4 Tage



Abb. 10: *Pouch* 2 und 4; Zeitpunkt 4 Tage



Abb. 11: Entnommene Probe; *Pouch 1*, Zeitpunkt 4 Tage

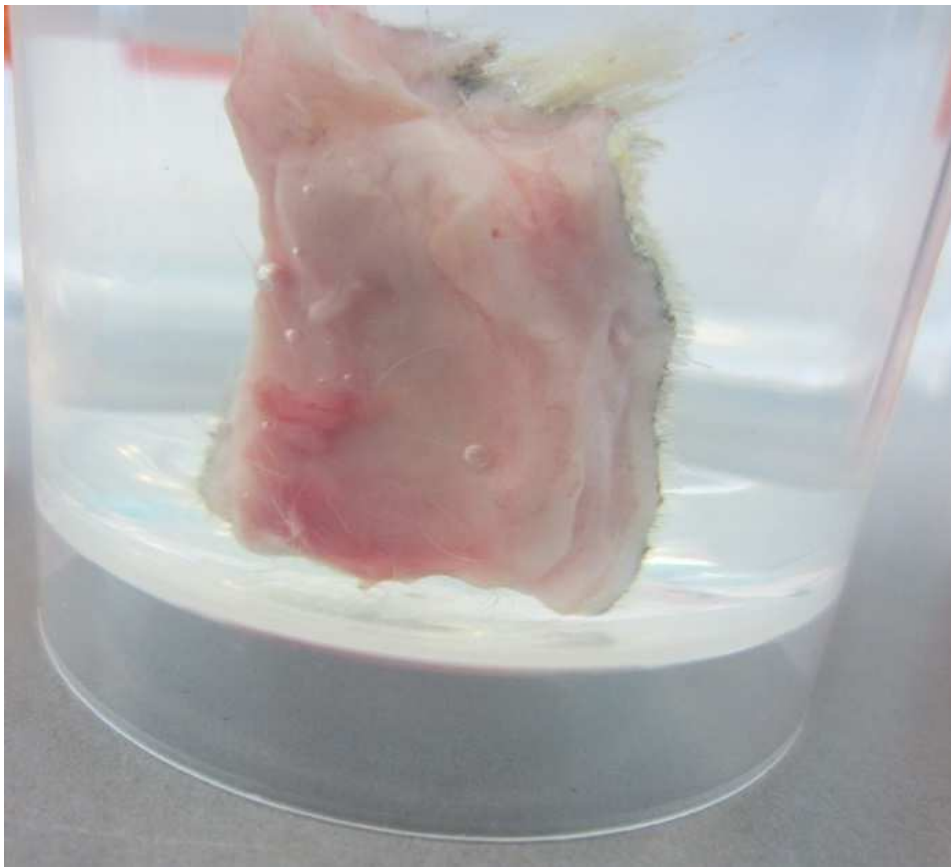


Abb. 12: Fixierung in 10% gepuffertem Formalin

2.4.2 Histologische Aufbereitung

Die entnommenen Proben wurden von den MTA des histologischen Forschungslabors mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Serienschnitte wurden parallel entlang der Längsachse der Proben mit einem Mikrotom auf eine Breite von 5µm angefertigt. Insgesamt wurden aus jeder Biopsie acht Schnitte histologisch aufbereitet und vom Doktoranden gefärbt (Teil 1, Masson Goldner Trichrom Färbung), zwei weitere wurden zur immunhistochemischen Markierung genutzt (Teil 2).

2.4.3 Masson-Goldner-Trichrom Färbung (MG)

Die Masson-Goldner-Trichrom Färbung dient hauptsächlich der Bindegewebedarstellung in der humanmedizinischen Zelldiagnostik. Durch den kombinierten Einsatz unterschiedlicher Färbelösungen erfolgt eine selektive Darstellung von Muskelfasern, Kollagenfasern, Fibrin und Erythrozyten. Im Ergebnis werden Zytoplasma und Muskelfasern ziegelrot, Zellkerne schwarz, Bindegewebe und saure Mukosubstanzen grün und Erythrozyten leuchtend orange dargestellt.

Die Färbelösungen wurden vom Doktoranden jeweils frisch angesetzt und mehrfach filtriert (alle Chemikalien von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland außer Aqua dest. von B. Braun, Melsungen, Deutschland).

Es erfolgten zunächst mehrere Testfärbungen an Gewebestücken ohne Matrix. Das Färbeprotokoll wurde mehrfach durch den Doktoranden modifiziert, mikroskopisch kontrolliert und im Ergebnis optimal an das Rattenmodell angepasst.

Labor-Protokoll: mod. Masson-Goldner-Färbung

<u>200ml Weigert-Eisenhämatoxylin-Lösung (frisch ansetzen):</u> Hämatoxylin A 100ml Hämatoxylin B 100ml	<u>200ml Ponceau-Säurefuchsin:</u> Ponceau S 0,14g Eisessig 0,4ml Aqua dest. 200ml
<u>200ml Phosphorwolframsäure-Orange G Gemisch:</u> Phosphorwolframsäure 8g Orange G 4g Aqua dest. 200ml	<u>200ml Lichtgrün-Lösung:</u> Lichtgrün SF 0,4g Eisessig 0,4ml Aqua dest. 200ml
<u>Ethanol 70-99%:</u> nach jeder Schaukel auszutauschen.	<u>6x250ml=1,5l Essigsäure 1%:</u> 15ml Eisessig auf 1,5l Aqua dest. Nach jeder Schaukel auszutauschen.

Ergebnis: Kerne *schwarz* ; Muskulatur, Zytoplasma, Keratin *rot* ; Kollagen *grün*

Dauer: 2:42h (Gesamt + Eindecken = circa 3h pro 17 Schnitte)

	[min.]	Schritt	Restdauer
	30	Brutschrank ca. 64°C	2:42
1	20	Xylol	2:12
2	20	Xylol	1:52
3	3	Ethanol 99%	1:32
4	3	Ethanol 96%	1:29
5	3	Ethanol 90%	1:26
6	3	Ethanol 80%	1:23
7	3	Ethanol 70%	1:20
8	3	Aqua dest.	1:17
9	2	Weigert Eisenhämatoxylin	1:14
10	10	Bläuen unter fließendem Leitungswasser	1:12
11	3	Aqua dest.	1:02
12	5	Ponceau-Säurefuchsin	0:59
13	5	Essigsäure 1%	0:54
14	5	Essigsäure 1%	0:49
15	10	Orange G	0:44
16	5	Essigsäure 1%	0:34
17	5	Essigsäure 1%	0:29
18	5	Lichtgrün	0:24
19	5	Essigsäure 1%	0:19
20	5	Essigsäure 1%	0:14
21	3	Ethanol 99%	0:09
22	3	Ethanol 99%	0:06
23	1	Xylol	0:03
24	2	Xylol	0:02
		SOFORT feucht eindecken (Entellan®)	

2.4.4 Immunhistochemische Markierung

Für die Immunhistochemie wurden die Gewebeproben 2x30 Minuten in Xylen entplastet und anschließend mit 2-Methoxyethylacetat für 2x20 Minuten sowie mit Aceton für 2x5 Minuten behandelt (Schwarz et al., 2007). Nach Rehydrierung in PBS (Phosphat-Salzpufferlösung) wurde die Antigen-Demaskierung durchgeführt, indem die Schnittproben bei 37°C für 15 Minuten mit Trypsin (0,05% in PBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) inkubiert wurden.

Nach Waschen mit PBS wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase durch 10-minütiges Eintauchen in eine Lösung aus 0,9% Wasserstoffperoxid (in PBS gelöst, bei Raumtemperatur) ausgelöscht. Danach wurden die Proben wieder gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch ein 30minütiges Bad in einer Blockierlösung (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) blockiert.

Die primären monoklonalen Mausantikörper gegen Kollagen Typ III (C3) (Verdünnung 1:100, Anti-Kollagen-Antikörper col-29 (ab82354), Abcam, Cambridge, UK) und die entsprechenden unspezifischen Antikörper als Negativkontrolle wurden den Gewebeschnitten in einer befeuchteten Kammer zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend in PBS gewaschen und mit einer zweiten biotinylierten Anti-Maus Antikörper Lösung (Verdünnung 1:60, Dako Cytomation) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen in PBS wurde die Anwesenheit der Antikörper-Antigen-Komplexe mittels einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Verdünnung 1:3000, Dako Cytomation) und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Chromogen (Dako Cytomation) sichtbar gemacht.

2.5 Histologische Auswertung

Für die Bilderfassung wurde eine Farb-CCD-Kamera (Color View III, Olympus, Hamburg, Deutschland) auf einem binokularen Lichtmikroskop (Olympus BX 50, Olympus) verwendet. Die digitalen Bilder (Originalvergrößerung x 200) wurden vom Doktoranden mit einem Software-Programm (analySIS FIVE docu®, Soft Imaging System, Münster, Germany) ausgewertet. Die Dicke der Matrixproben

(MT) wurde auf 9 Feldern linear vermessen, welche automatisch randomisiert ausgewählt wurden (analySIS FIVE docu®).

Die Quantität des Gewebekontaktes (TC) mit der Kollagenmatrix (CM) wurde als prozentualer Anteil des jeweiligen Umfanges (gilt als 100%) gemessen. Zudem wurden die folgenden Parameter deskriptiv ausgewertet: Muster der Gewebeintegration (z.B. C3), Angiogenese (z.B. Blutgefäßformation), Fremdkörperreaktionen (z.B. die Anwesenheit von multinukleären Riesenzellen) (Rothamel, 2006; Herten et al., 2009; Schwarz et al., 2006).

Die histologische Auswertung und Kalibrierung wurde vom Doktoranden – bis zum Abschluss der Studie – ohne Kenntnis der Verteilung der Test- und Kontrollgruppen vorgenommen. Durch mehrjährige Ausbildung und Tätigkeit im histologischen Forschungslabor verfügt er über sehr gute Kenntnisse in der Histologie. Die Messungen wurden vom Doktoranden einzeln fotografiert, ausgewertet, dokumentiert und vom Versuchsleiter Prof. Schwarz überprüft.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung führte der Versuchsleiter durch. Dafür verwendete er ein Softwarepaket (SPSS 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Für jede Gruppe wurden Mittelwerte (z.B. aus 9 Messungen pro Probe) und Standardabweichungen für die Membrandicke errechnet. One-Way Analyse der Varianz (one-way ANOVA) und post hoc Test mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche wurde für jeden gruppeninternen Vergleich mit der Nulllinie (Woche 1) verwendet.

Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesetzt.

2.7 Zusammenfassung der Anteile des Doktoranden:

Vorbereitung des Versuchs im ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben): steriles Vorbereiten des OP-Saals, Aufdecken der Instrumente, Abwiegen des Körpergewichts der Ratten, Assistenz beim Zuschneiden der Matrices, Assistenz während der gesamten Implantationen der Matrices.

Nachbereitung der Versuche: Assistenz bei der Ohrtätowierung der Ratten, mehrfache Nachsorgebesuche im ZETT zur Kontrolle und Dokumentation der Wundheilung, sowie Assistenz bei der Analgesie der Ratten.

Probengewinnung: Assistenz bei der Entnahme der Proben in der Pathologie des ZETT und deren Protokollierung sowie Fotodokumentation.

Histologische Vorbereitung: Assistenz bei den Probenschnitten, Färbeversuche und mikroskopische Kontrollen nach mehrfacher Abwandlung einer Standard-Masson-Goldner Färbung zur optimalen Anpassung an das Rattenmodell. Ansetzen der Lösungen und Färbung aller Proben mit dem modifizierten Färbeprotokoll, sowie anschließendes Eindecken.

Histologische Analyse: histomorphometrische Untersuchung und Fotografie aller Schnittproben (Olympus Cell^d), Messen der Matrixdicke (TH) und des prozentualen Gewebekontakts (TC) und Dokumentation der Werte (Microsoft Excel).

3 Ergebnisse

Die postoperative Heilungsphase verlief bei allen Tieren unauffällig. Es traten keine Komplikationen, wie allergische Reaktionen, Schwellungen, Abszedierungen oder Wundinfektionen, während der gesamten Studiendauer auf.

3.1 Zellviabilitätsassay

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays humaner Gingivafibroblasten nach dreitägiger Kultivierung zur Untersuchung der in vitro-Aktivität verschiedener pro-angiogenetischer Faktoren, welche auf Kollagenmatrices appliziert wurden. Das Lumineszenzsignal quantifiziert anhand der mittleren CPS (*counts per second*, Anzahl pro Sekunde) die Zahl gesunder Zellen innerhalb der Kultur.

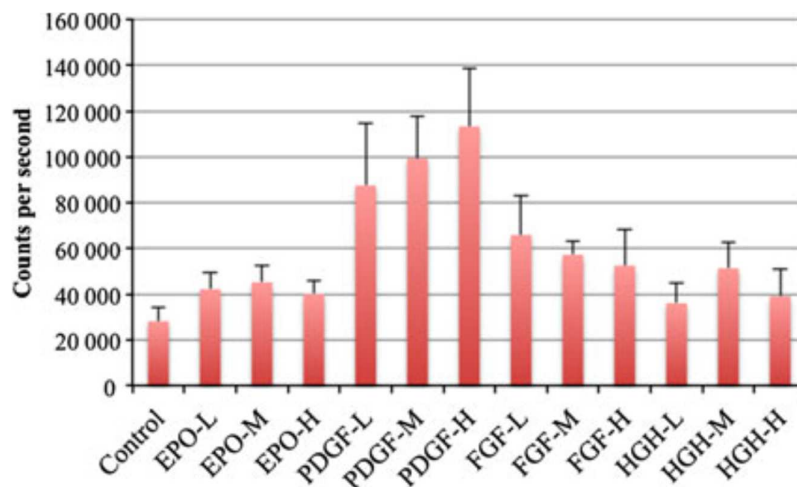


Abb. 13: Zellviabilitätsassay humaner Gingivafibroblasten

Nach einer dreitägigen Inkubation zeigte sich eine signifikante Steigerung der CPS-Werte innerhalb der PDGF-BB (H>M>L) ($p=0,000$; ANOVA) und der FGF-L ($p=0,003$; ANOVA) Gruppen. EPO und HGH zeigten lediglich eine geringere, nicht signifikante ($p>0,05$; ANOVA) Zellaktivitätssteigerung, verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.2 Histologische und immunhistochemische Analyse

Die Mittelwerte und Mediane der Matrixdicke (TH), sowie des prozentualen Gewebekontaktes (TC) verglichen mit der Kontrollgruppe nach 4, 7, 14 und 60 Tagen Einheilungszeit werden in den Tabellen 1 und 2 dargestellt (n=112 Taschen).

Tabelle 1a: **Matrixdicke in µm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : rhPDGF-BB**

Tag	CM			rhPDGF-L				rhPDGF-M				rhPDGF-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	658,3	0,03	647,5	702,8	105,7	682,0	n.s.	715,7	122,3	706,0	0,039	636,5	64,9	625,5	n.s.
7	742,2	0,04	742,0	621,1	59,4	621,1	n.s.	490,6	91,6	516,0	0,038	691,4	328,8	688,0	n.s.
14	823,0	0,04	834,0	670,7	109,9	654,2	n.s.	680,6	175,4	654,0	n.s.	738,8	191,4	762,0	n.s.
60	828,3	0,02	864,0	339,5	99,7	309,1	n.s.	484,0	164,8	565,0	n.s.	527,6	100,2	513,0	n.s.

Tabelle 1b: **Matrixdicke in µm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : FGF**

Tag	CM			FGF-L				FGF-M				FGF-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	658,3	0,03	647,5	832,0	241,5	781,9	n.s.	747,5	298,8	738,5	n.s.	757,6	122,5	694,0	n.s.
7	742,2	0,04	742,0	605,8	119,7	582,1	n.s.	665,3	48,0	664,0	0,032	691,2	161,4	653,0	n.s.
14	823,0	0,04	834,0	670,7	109,9	654,2	n.s.	680,6	175,4	654,0	n.s.	738,8	191,4	762,0	n.s.
60	828,3	0,02	864,0	509,0	135,3	500,2	n.s.	759,0	—*	759,0	n.s.	540,0	127,6	476,0	n.s.

* 7 von 8 Proben zeigten eine beinahe vollständige Degeneration der Matrix und wurden in der histomorphometrischen Auswertung nicht berücksichtigt

Tabelle 1c: **Matrixdicke in μm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : EPO**

Tag	CM			EPO-L				EPO-M				EPO-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	658,3	110,8	647,5	704,0	116,5	723,7	n.s.	882,4	224,5	770,0	0,033	959,6	264,0	864,0	0,05
7	742,2	101,6	742,0	884,4	475,4	622,0	n.s.	725,6	164,6	681,0	n.s.	745,0	236,2	736,0	n.s.
14	823,0	134,3	834,0	817,8	188,0	773,9	n.s.	834,2	160,0	857,0	n.s.	540,6	100,3	553,0	0,05
60	828,3	205,8	864,0	504,7	108,5	594,8	n.s.	403,0	84,0	440,0	n.s.	440,2	79,3	466,0	n.s.

Tabelle 1d: **Matrixdicke in μm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : HGH**

Tag	CM			HGH-L				HGH-M				HGH-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	658,3	110,8	647,5	767,9	74,6	736,0	n.s.	662,0	86,5	658,0	n.s.	721,0	199,8	695,0	n.s.
7	742,2	101,6	742,0	668,0	51,0	675,2	n.s.	676,0	103,2	676,0	n.s.	500,0	120,2	500,0	0,047
14	823,0	134,3	834,0	610,3	96,0	593,3	0,013	810,6	57,6	805,0	n.s.	629,6	232,2	515,0	n.s.
60	828,3	205,8	864,0	641,0	207,7	666,2	n.s.	447,0	135,5	432,0	n.s.	519,0	155,5	512,0	n.s.

Tabelle 2a: **Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : rhPDGF-BB**

Tag	CM			rhPDGF-L				rhPDGF-M				rhPDGF-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	14,2	17,9	4,0	3,0	4,7	1,0	n.s.	0,7	0,9	0,5	n.s.	6,7	13,5	0,0	n.s.
7	21,2	42,5	0,0	16,5	23,3	16,5	n.s.	46,3	7,0	47,0	n.s.	51,4	26,8	56,0	n.s.
14	60,5	26,1	61,0	32,6	11,2	30,0	n.s.	56,8	15,8	51,5	n.s.	62,0	11,4	62,5	n.s.
60	65,6	19,8	74,0	63,3	8,1	67,0	n.s.	43,3	24,5	46,5	n.s.	48,2	11,4	54,0	n.s.

Tabelle 2b: **Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : FGF**

Tag	CM			FGF-L				FGF-M				FGF-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	14,2	17,9	4,0	2,6	5,8	0,0	n.s.	3,1	5,5	0,0	n.s.	9,5	12,0	0,0	n.s.
7	21,2	42,5	0,0	23,5	13,4	23,5	n.s.	26,0	30,7	18,0	n.s.	9,1	14,3	0,0	n.s.
14	60,5	26,1	61,0	52,2	31,7	45,0	n.s.	67,0	17,5	62,0	n.s.	50,8	24,2	58,0	n.s.
60	65,6	19,8	74,0	39,6	9,2	43,5	n.s.	98,0	—*	98,0	n.s.	78,6	15,1	76,0	n.s.

* 7 von 8 Proben zeigten eine beinahe vollständige Degeneration der Matrix und wurden in der histomorphometrischen Auswertung nicht berücksichtigt

Tabelle 2c: Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : EPO

Tag	CM			EPO-L				EPO-M				EPO-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	14,2	17,9	4,0	3,3	8,1	0,0	n.s.	14,7	20,8	1,0	n.s.	22,0	18,5	25,0	n.s.
7	21,2	42,5	0,0	59,7	49,1	69,5	n.s.	8,2	16,7	0,0	n.s.	24,2	21,3	22,5	n.s.
14	60,5	26,1	61,0	67,0	14,5	62,5	n.s.	70,1	19,4	75,5	n.s.	83,6	22,5	100,0	n.s.
60	65,6	19,8	74,0	71,4	8,5	75,0	n.s.	70,6	15,6	63,0	n.s.	75,8	21,3	88,0	n.s.

Tabelle 2d: Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : HGH

Tag	CM			HGH-L				HGH-M				HGH-H			
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert	Mean	SD	Median	p-Wert
4	14,2	17,9	4,0	7,6	8,0	7,0	n.s.	0,0	0,0	0,0	n.s.	8,7	17,5	0,0	n.s.
7	21,2	42,5	0,0	44,8	31,1	45,0	n.s.	31,0	43,8	31,0	n.s.	54,5	41,7	54,5	n.s.
14	60,5	26,1	61,0	70,4	16,4	68,0	n.s.	50,4	11,3	45,0	n.s.	60,5	22,2	55,0	n.s.
60	65,6	19,8	74,0	55,8	7,5	58,0	n.s.	58,0	27,7	51,0	n.s.	78,7	16,0	80,0	n.s.

3.2.1 Zeitpunkt 4 Tage:

Die histologische Analyse nach vier Tagen Einheilungszeit ergab, dass durch das chirurgische Vorgehen weitestgehend eine erfolgreiche Einbringung der Matrices in das subkutane Gewebe erzielt werden konnte. Nur in Einzelfällen kam es zur Faltung oder Faltenbildung der Matrices. Bei der histomorphometrischen Analyse konnte eine signifikante Steigerung der mittleren TH-Werte bei den rhPDGF-M, EPO-M und EPO-H Proben festgestellt werden ($p=0,39$, $p=0,33$, $p=0,05$; ungepaarter T-Test) (Tabelle 1). Die Gewebeintegration nach 4 Tagen war eher gering, was man anhand eines peripheren Spalts zwischen den Proben und dem umliegenden Bindegewebe über nahezu die gesamte Kontaktzone erkennen kann (Abb. 14 und 15).

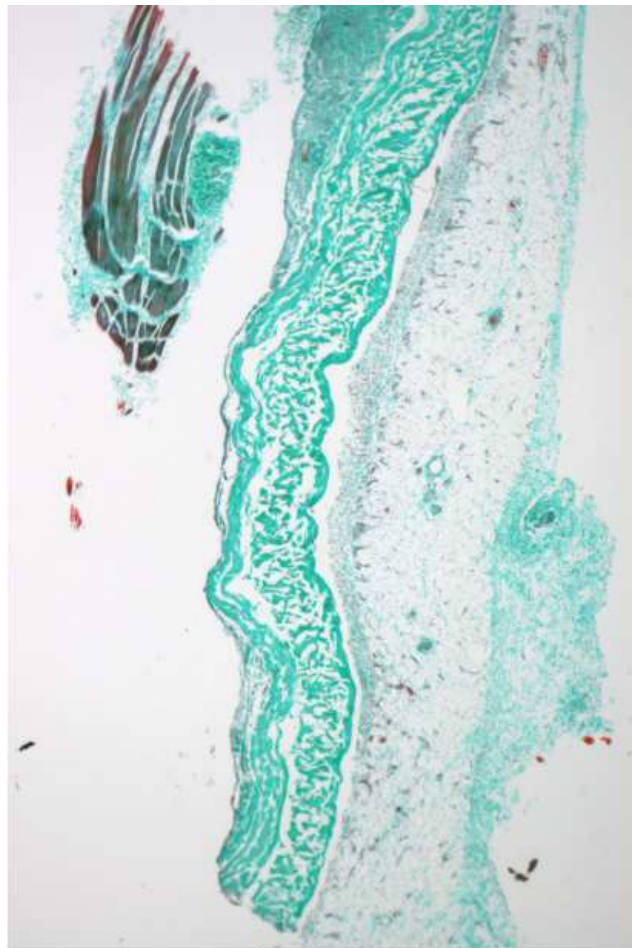


Abb. 14: CM, MG, 4 Tage, x25

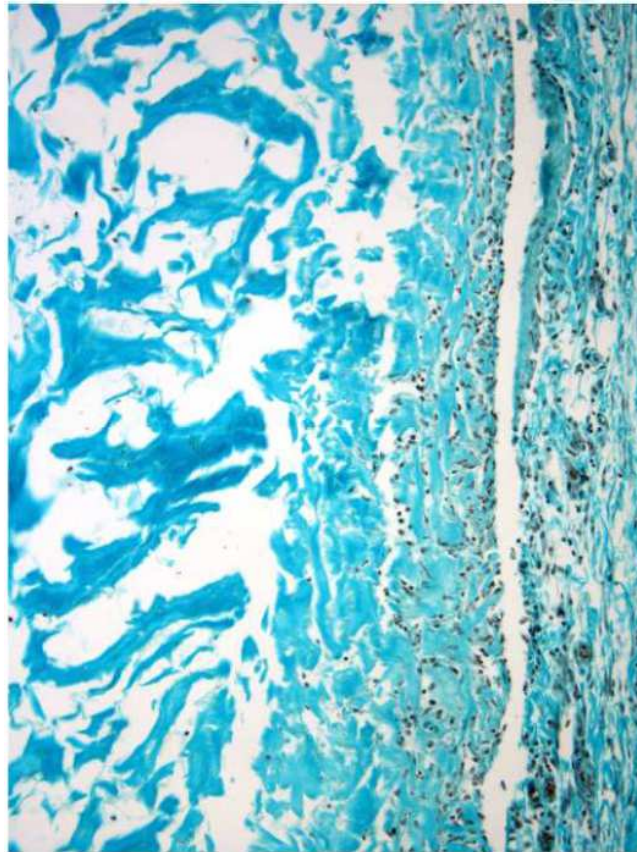


Abb. 15: **CM, MG, 4 Tage, x200**

Generell konnte nach 4 Tagen histologisch kein Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren auf die Gewebeintegration der Kollagenmatrices festgestellt werden (Abb. 16-19).

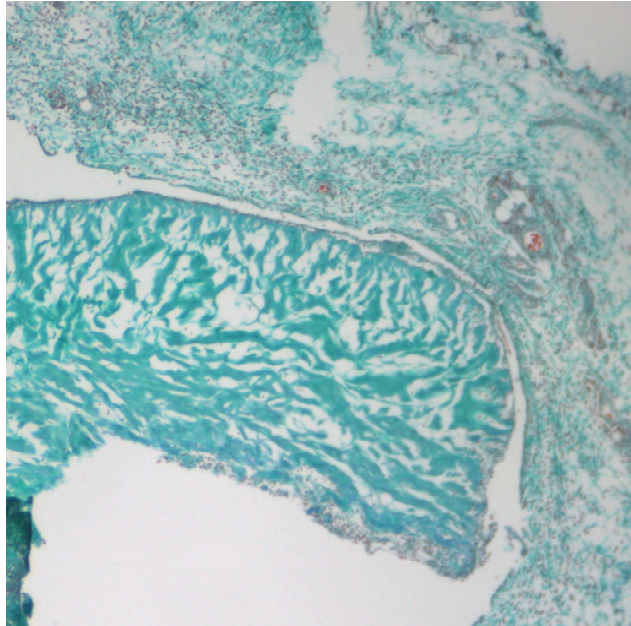


Abb. 16: **CM+PDGF-M, MG, 4 Tage, x40**

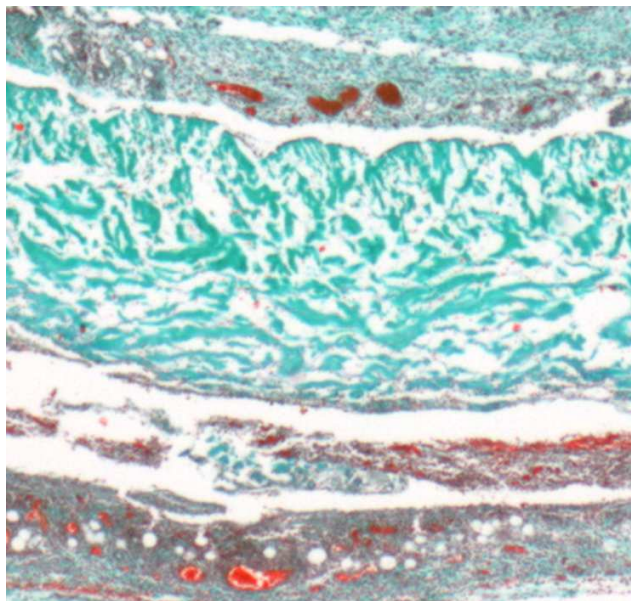


Abb. 17: **CM+FGF-L, MG, 4 Tage, x40**

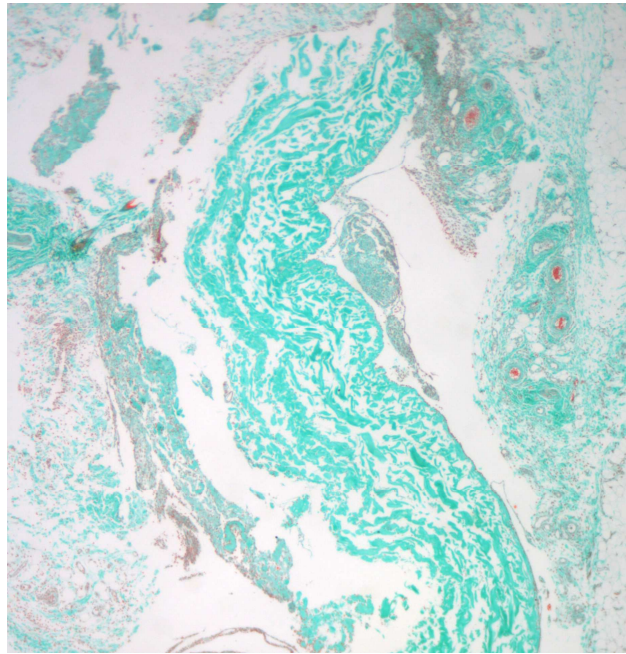


Abb. 18: **CM+EPO-M, MG, 4 Tage, x25**

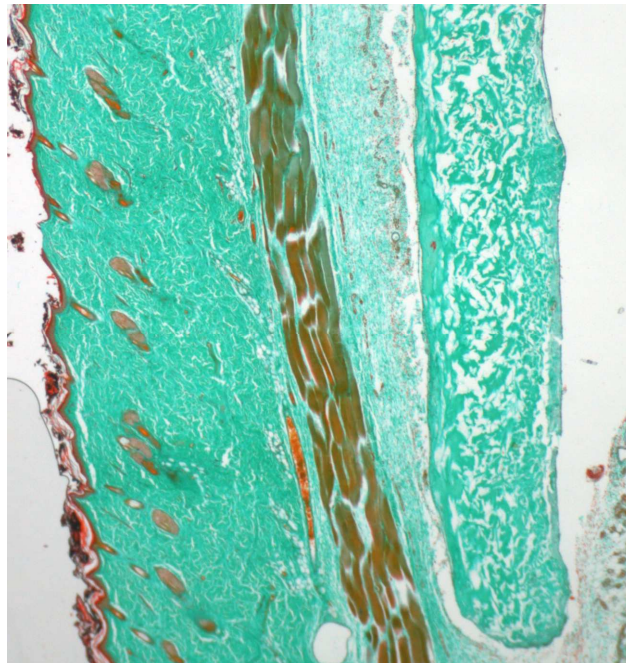


Abb. 19: **CM+HGH-M, MG, 4 Tage, x25**

Eine positive C3 Antigenreaktivität in den peripheren Anteilen der Kollagenmatrices konnte nur in Einzelfällen beobachtet werden (Abb. 20).

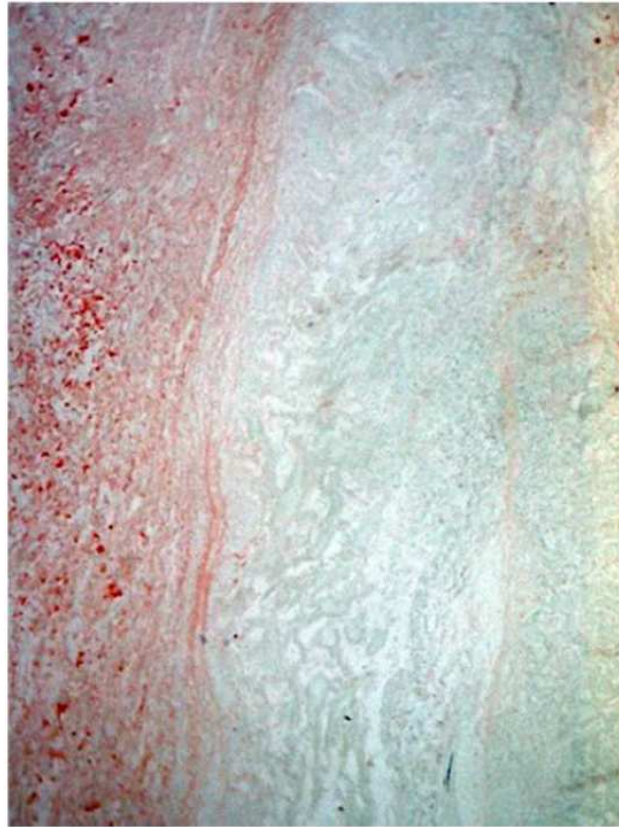


Abb. 20: **CM, C3 Antigen, 4 Tage, x40**

Tendenziell zeigten die EPO-H Proben erhöhte TC-Werte, verglichen mit der Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz konnte aber auch hier nicht festgestellt werden ($p > 0,05$, ungepaarter T-Test) (Tabelle 2).

3.2.2 Zeitpunkt 7 Tage:

Nach einer Einheilungszeit von sieben Tagen konnte histologisch das Einwachsen gefäßartigen Gewebes, eingebettet in Bindegewebe, sowie die Anlagerung von C3-Fasern in den peripheren Anteilen der Kollagenmatrices festgestellt werden (Abb. 21-23).

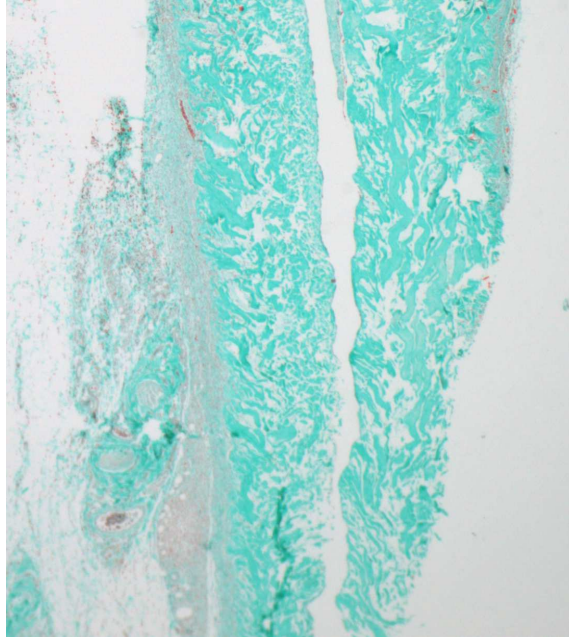


Abb. 21: **CM, MG, 7 Tage, x25**



Abb. 22: **CM, MG, 7 Tage, x200**

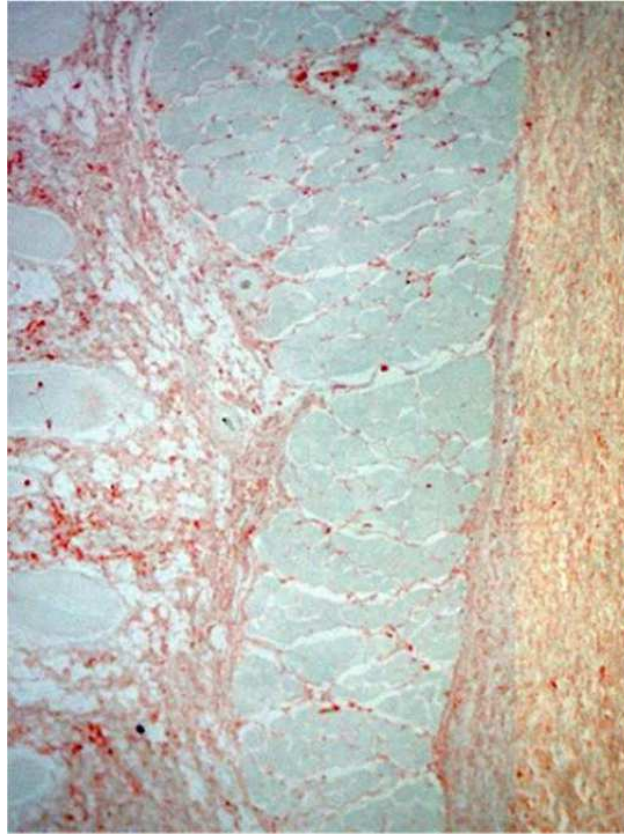


Abb. 23: **CM, C3 Antigen, 7 Tage, x40**

Während diese Zellaktivitäten mit einem Anstieg der mittleren TH-Werte von über 11% innerhalb der Kontrollgruppe einhergingen, war die Zugabe von rhPDGF-BB, FGF-2 oder HGH mit einer Abnahme der mittleren TH-Werte, aber einer Zunahme der mittleren TC-Werte, verglichen mit der Kontrollgruppe, assoziiert. Dabei erzielten die Ergebnisse der rhPDGF-M, FGF-M und HGH-H Gruppen statistische Signifikanz ($p=0,038$, $p=0,032$, $p=0,047$; ungepaarter T-Test) (Abb. 24 und 25).

Im Gegensatz dazu zeigten die mittleren TH-Werte eine tendenzielle Zunahme für die EPO-Gruppen, insbesondere in den verabreichten L-Konzentrationen ($p>0,05$; ungepaarter T-Test) (Abb. 24-27, Tabelle 1 und 2).

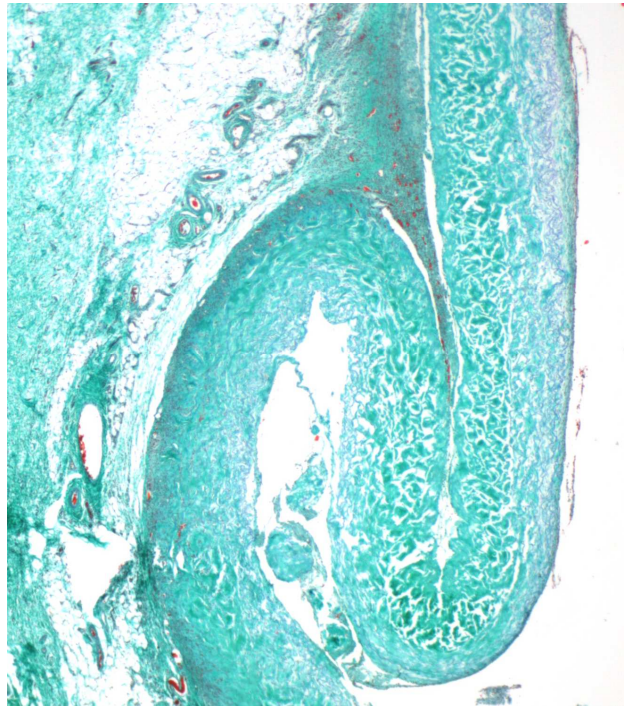


Abb. 24: **CM+PDGF-H, MG, 7 Tage, x25**

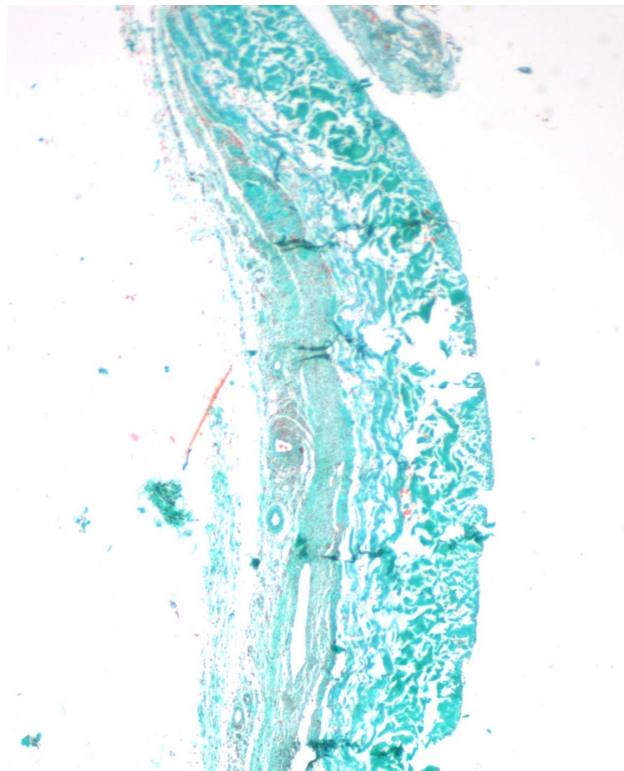


Abb. 25: **CM+FGF-H, MG, 7 Tage, x25**

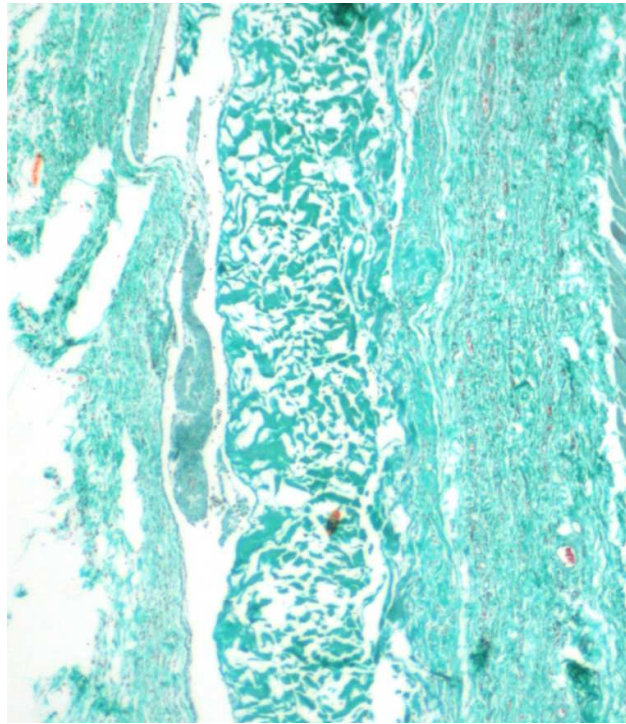


Abb. 26: **CM+EPO-M, MG, 7 Tage, x25**

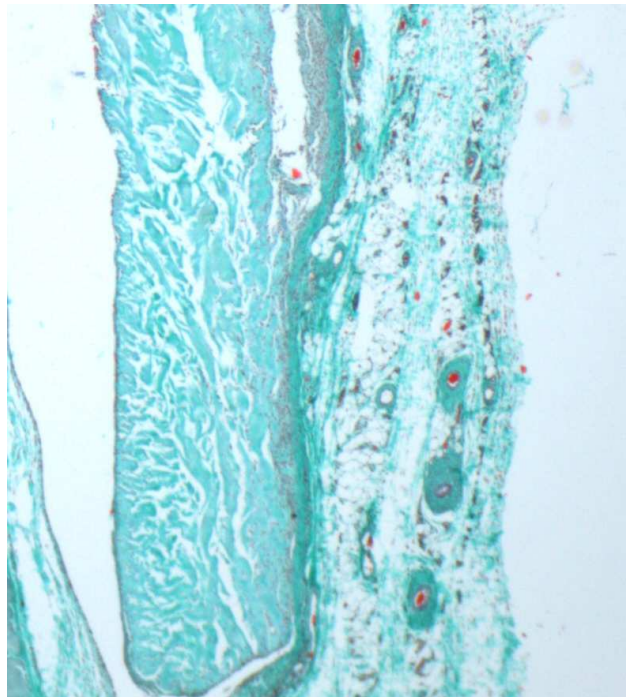


Abb. 27: **CM+HGH-L, MG, 7 Tage, x25**

3.2.3 Zeitpunkt 14 Tage:

Nach einer Einheilungszeit von 14 Tagen war histologisch eine Zunahme der mittleren TH-Werte innerhalb der Kontrollgruppe von über 20% ersichtlich, verglichen mit den Werten nach vier Tagen. Histologisch kann man zudem anhand einer intensiven Färbung der C3 Fasern erkennen, dass die Proben der Kontrollgruppe von homogenen dichten Bindegewebsfasern durchwachsen wurden (Abb. 28-30).

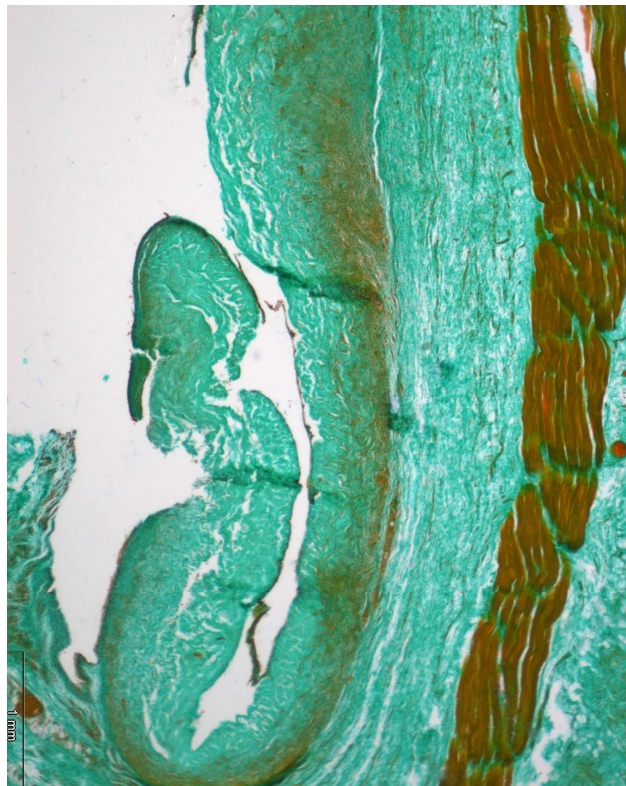


Abb. 28: CM, MG, 14 Tage, x25



Abb. 29: **CM, MG, 14 Tage, x200**

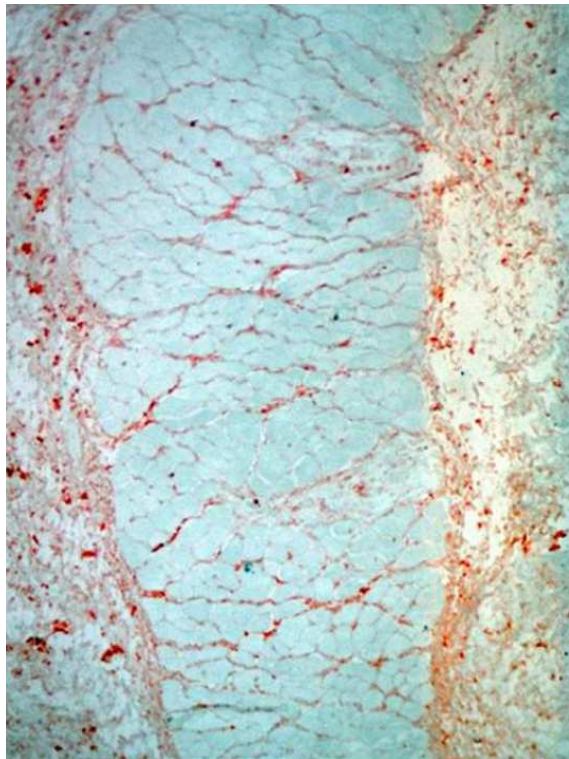


Abb. 30: **CM, C3 Antigen, 14Tage, x40**

Die histologische Untersuchung der Testgruppen ergab geringere TH-Werte, wobei die Werte für die EPO-H und HGH-L-Proben statistische Signifikanz erreichten ($p=0,05$, $p=0,013$; ungepaarter T-Test) (Tabelle 1). Trotz einer ungleichen Verteilung der mittleren TC-Werte, kann die qualitative und quantitative Untersuchung der Gewebeintegration zwischen den Test- und Kontrollgruppen als vergleichbar angesehen werden ($p>0,05$; ungepaarter T-Test) (Abb. 31-34) (Tabelle 2).

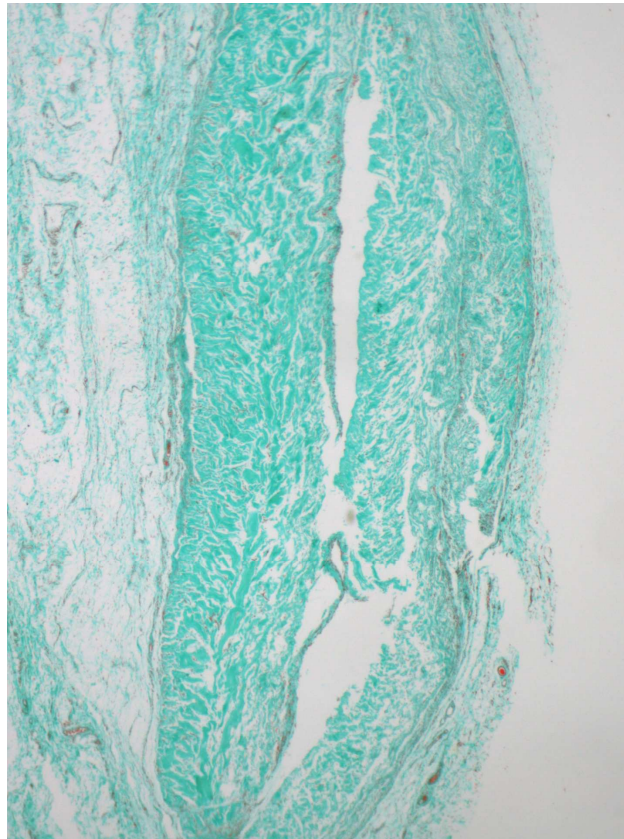


Abb. 31: **CM+PDGF-M, MG, 14 Tage, x25**

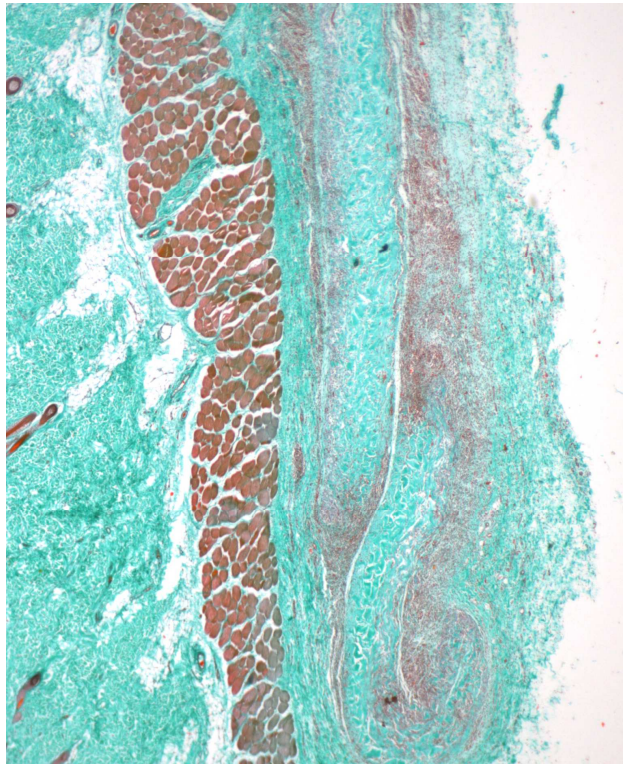


Abb. 32: CM+FGF-M, MG, 14 Tage, x25

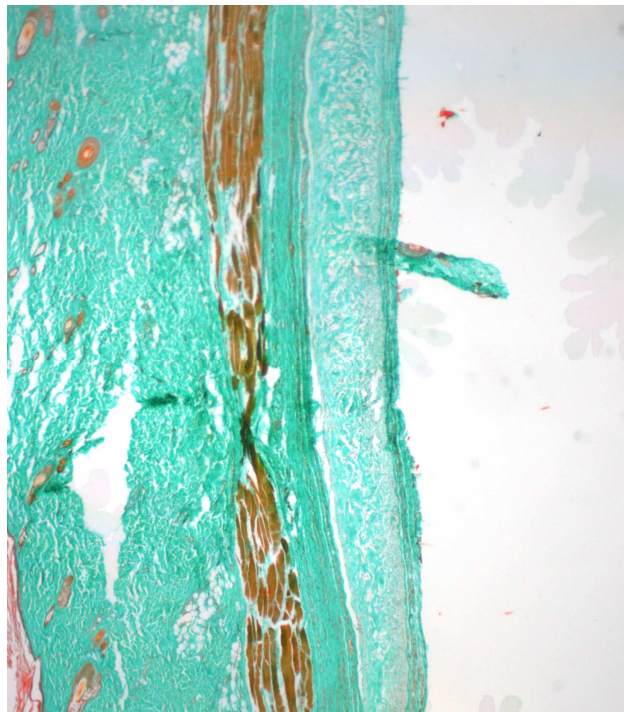


Abb. 33: CM+EPO-H, MG, 14 Tage, x25

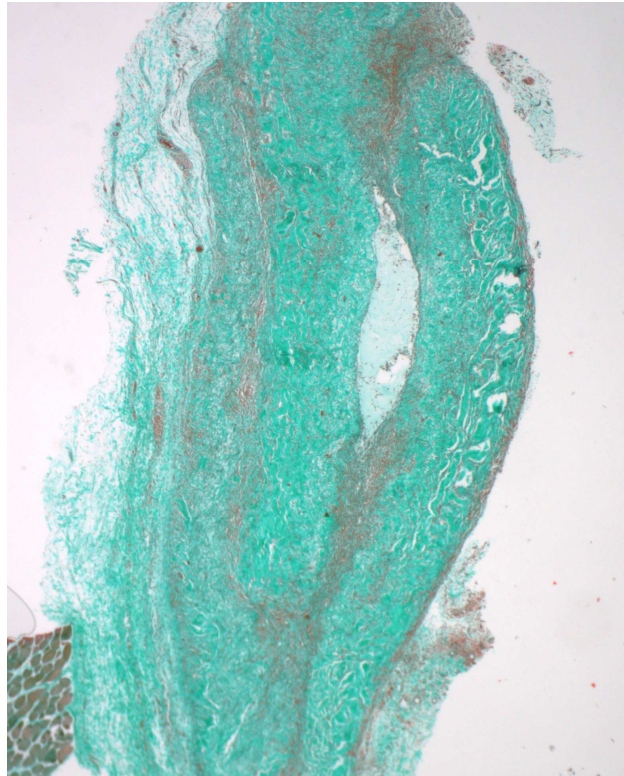


Abb. 34: **CM+HGH-M, MG, 14 Tage, x25**

3.2.4 Zeitpunkt 60 Tage:

Nach 60 Tagen Einheilung waren die Werte der mittleren TH- und TC- Werte innerhalb der Kontrollgruppe annähernd mit denen nach 14 Tagen vergleichbar (Tabelle 1). Obwohl die peripheren Grenzen der Kollagenmatrix histologisch noch von dem umliegenden Bindegewebe abgrenzbar waren, zeigten sich deutliche Zeichen eines Remodellierungs- und Degradationsprozesses des Matrixkörpers, was anhand einer geringeren Matrixdichte, einer Zunahme der Vernetzung und einem Anstieg an Granulozyten und Makrophagen zu erkennen war. Immunhistochemisch, konnte die C3-Antigenreaktivität der Kontrollproben nicht mehr von der des umliegenden Bindegewebes unterschieden werden, was auf eine homogene Organisation des xenogenen Ersatzmaterials schließen lässt (Abb. 35-37).

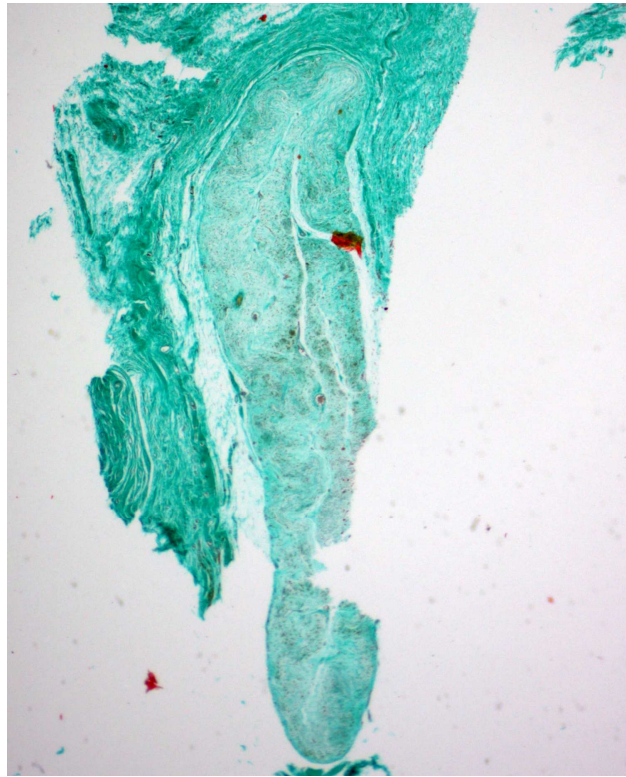


Abb. 35: **CM, MG, 60 Tage, x25**

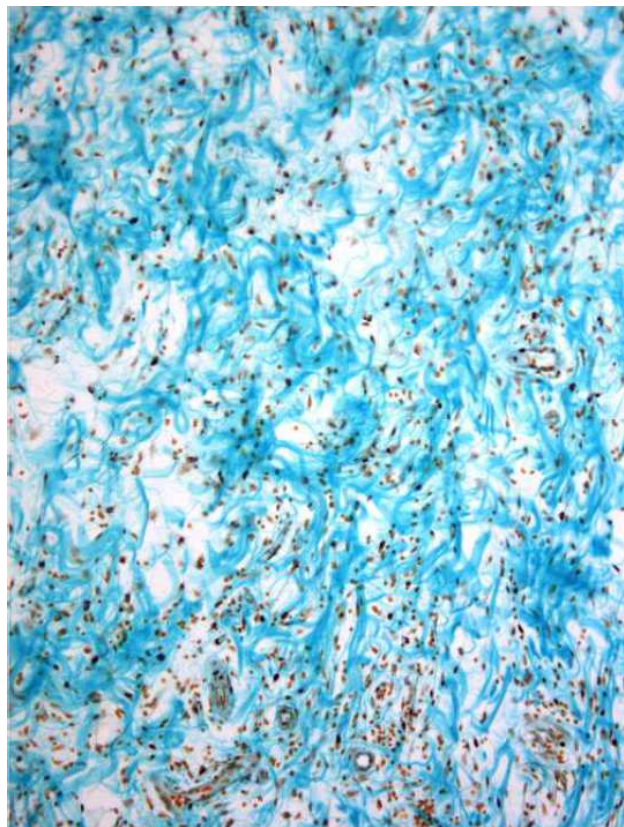


Abb. 36: **CM, MG, 60 Tage, x200**

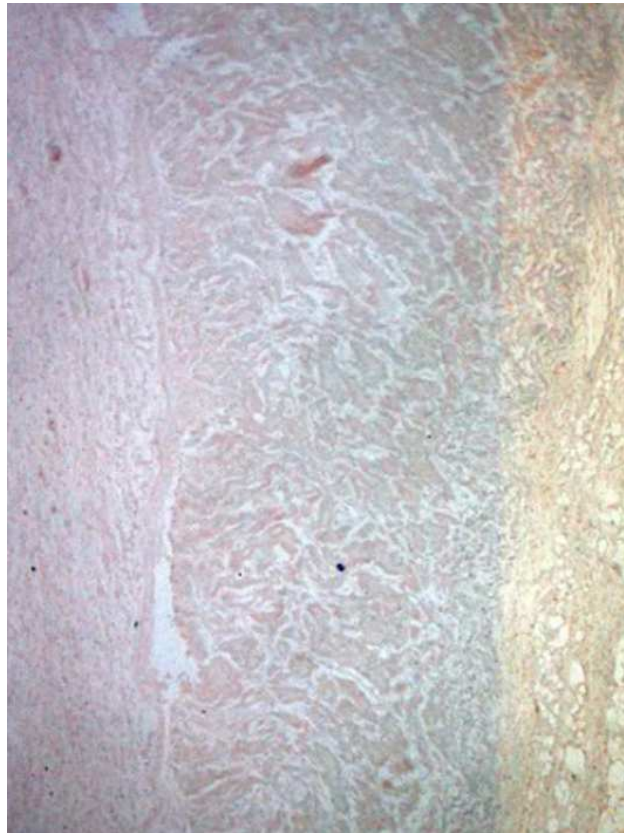


Abb. 37: **CM, C3 Antigen, 60Tage, x40**

Dieser Remodellierungsprozess schien in den untersuchten Testgruppen sogar noch ausgeprägter zu sein, obwohl ein Vergleich der mittleren TH-Werte mit denen nach 14 Tagen auf eine Abnahme der Matrixdicke hindeutet. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab in diesem Falle aber keine statistische Relevanz ($p > 0,05$; ungepaarter T-Test) (Abb. 38-41).

Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 60 Tagen konnte histologisch kein Anhalt auf entzündliche Zellinfiltrate innerhalb des die Test- und Kontrollproben umgebenden Bindegewebes festgestellt werden (Abb. 14-41).

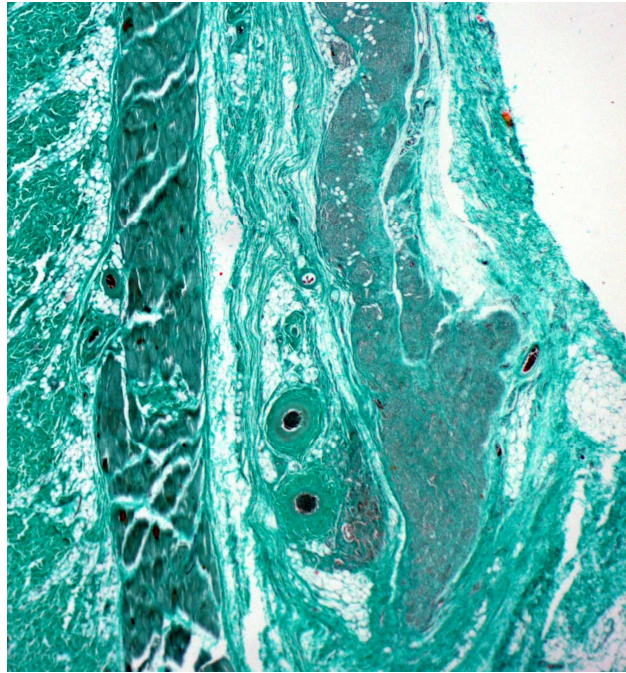


Abb. 38: CM+PDGF-L, MG, 60 Tage, x25

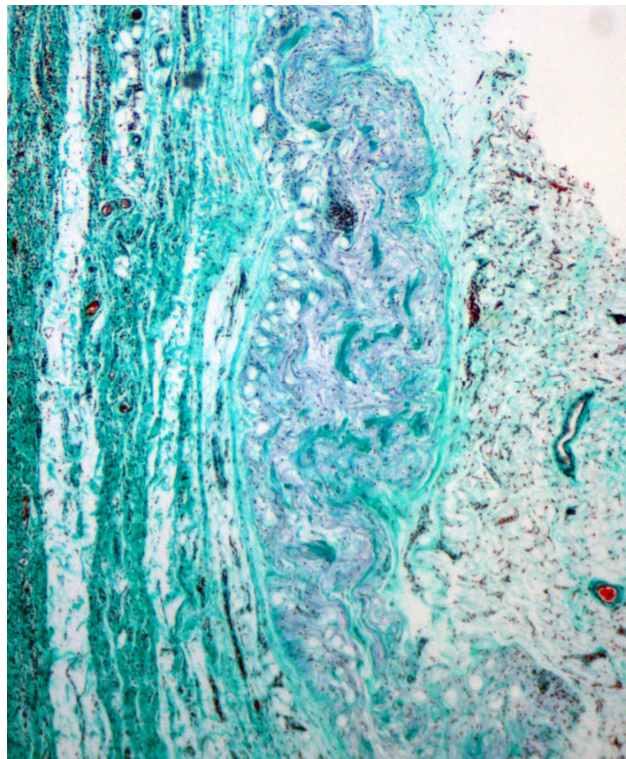


Abb. 39: CM+FGF-H, MG, 60 Tage, x25

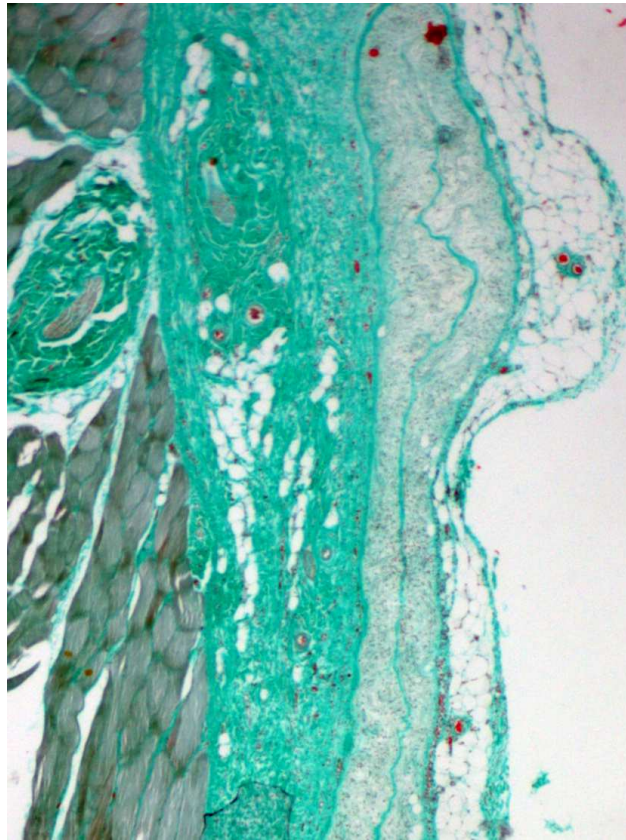


Abb. 40: CM+EPO-H, MG, 60 Tage, x25

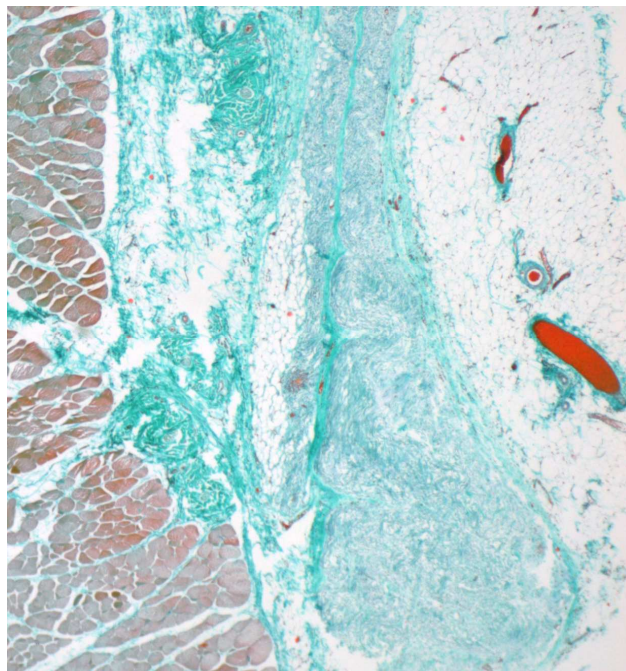


Abb. 41: CM+HGH-H, MG, 60 Tage, x25

4 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es, den konzentrationsabhängigen Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren (rhPDGF-BB, FGF-2, EPO und HGH) auf die Biodegradation und Organisation einer xenogenen Kollagenmatrix histologisch und immunhistochemisch zu untersuchen.

Xenogene Kollagenmatrices wurden für den Bereich der augmentativen Mukogingivalchirurgie als Alternative zu den autologen freien Schleimhaut- oder Bindegewebestransplantaten entwickelt. Laut dem Bericht der aktuellen Konsensus Konferenz des 10. *European Workshop on Periodontology* ist die Augmentation von Weichgewebe an Zähnen und Implantaten indiziert, wenn ein Defizit an keratinisierter, befestigter Gingiva besteht oder das Volumen des Weichgewebes verdickt werden soll (Hämmerle und Giannobile, 2014), da Rezessionen an Zähnen und dentalen Implantaten mit ästhetischen Einbußen für den Patienten, Hypersensitivitäten an Zahnwurzeln und erschwelter Plaque Kontrolle einhergehen (Hämmerle und Giannobile, 2014; Vignoletti et al., 2014).

Die Breite des Bandes an keratinisierter Gingiva wird in Zusammenhang mit der parodontalen Gesundheit von Zähnen, sowie der Überlebensrate von dentalen Implantaten kontrovers diskutiert. So attestierten verschiedene Studien bei einem breiteren Band an keratinisierter Schleimhaut in Bezug auf dentale Implantate deutlich höhere Überlebensraten, gesünderes periimplantäres Weichgewebe, sowie bessere ästhetische Ergebnisse (Adell et al., 1986; Artzi et al., 1993; Langer 1996) und auch in Bezug auf Zähne gilt eine ausreichend breite keratinisierte Gingiva als Voraussetzung für eine konstante parodontale Gesundheit und zur Vorbeugung von gingivalen Rezessionen (Nabers, 1966; Sullivan & Atkins, 1969). Dennoch wird diese Diskussion sehr kontrovers geführt. So fassten aktuellere Veröffentlichungen zusammen, dass der Nachweis eines Zusammenhanges der Breite an keratinisiertem Gewebe mit dem Überleben von Implantaten oder Zähnen, sowie der Entstehung gingivaler Rezessionen ungenügend sei (Esposito et al., 2007; Cairo et al., 2008). Lang und Loe empfahlen in einer Studie aus dem Jahr 1972 ein Minimum an 2mm breiter keratinisierter Schleimhaut, um gingivale Gesundheit zu gewährleisten (Lang und Loe, 1972). Letztendlich ist eine bindende Angabe über das Maß an keratinisierter Schleimhaut von offizieller Seite aber noch

nicht definiert worden (Thoma et al., 2011). Somit ist es die Entscheidung des Behandlers, abhängig von Funktion und Ästhetik eines jeden individuellen Falles, sowie von der geplanten prothetischen Versorgung, wie ausgeprägt die keratinisierte Schleimhaut und wie voluminös das Umgebende periimplantäre Weichgewebe oder die Gingiva gestaltet werden sollen. Um einen Mangel an Weichgewebe auszugleichen, wurden zahlreiche chirurgische Techniken entwickelt. Nach wie vor gelten der Einsatz von autologen freien Schleimhaut- oder Bindegewebstransplantaten als Goldstandard bei der Augmentation von Weichgewebe (Thoma et al., 2011).

4.1 Autologe Transplantate als bisheriger Goldstandard in der Weichgewebsaugmentation

Diese autologen Transplantate werden in den meisten Fällen vom Gaumen des Patienten im Bereich der Prämolaren-/Molarenregion, seltener von der retromolaren bukkalen Schleimhaut der Oberkiefermolaren entnommen. Der Erfolg einer Transplantation von autologen Geweben, also die vollständige Adaptation des Transplantates in der Empfängerregion durch Vaskularisierung, ist von mehreren chirurgischen Prinzipien abhängig. Zum einen muss das Transplantatbett in der Empfängerregion ausreichend vaskularisiert sein (Hawley, C.E. & Staffileno, H., 1970). Neuere Techniken empfehlen in diesem Zusammenhang, den marginalen und papillären Teil der Gingiva im Bereich der Empfängerregion miteinzubeziehen. Die Vaskularisierung in diesem Bereich der Gingiva soll aufgrund von dicht vernetzten Gefäßschlingen und Anastomosen, welche einen dichten Gefäßplexus bilden, im Vergleich zu apikalen Gingivaabschnitten deutlich besser sein (Shah et al., 2015).

Zum anderen ist eine erfolgreiche Transplantation abhängig von einer möglichst starren, immobilen Fixierung des Transplantates im Bereich der Empfängerregion, sowie – im Hinblick auf das ästhetische Ergebnis – von einer ausreichenden Dimensionierung des Transplantates, unter Einberechnung einer Schrumpfung im Verlaufe der Einheilungsphase (Hawley et al., 1970). Diese Schrumpfungen werden verursacht durch Kollabierung des Gefäßsystems und somit einer (vorübergehenden) Unterversorgung des Transplantates (Gümüş, P. & Buduneli,

E., 2014). Um einer Beschädigung der Gefäße des Transplantates vorzubeugen empfehlen Sullivan und Atkins das zu entnehmende Transplantat ausreichend dick zu dimensionieren, atraumatisch zu operieren und das Transplantat möglichst schnell und mit grazilem Nahtmaterial in der Empfängerregion zu fixieren (Sullivan H.C. & Atkins JH., 1968).

Aktuell gilt der Einsatz autologer Transplantate bei der Verbreiterung der keratinisierten Schleimhaut oder der Verdickung von Weichgewebe an Zähnen, sowie an Implantaten als Goldstandard mit vielversprechenden klinischen Ergebnissen (Thoma et al., 2009). Dennoch ist der Einsatz autologer Transplantate nicht unumstritten, da die Entnahme von Bindegewebe und Schleimhaut als chirurgisch anspruchsvoll gilt, einige intraoperative Risiken birgt (z.B. Verletzung der *A. palatina*) und mit einer erhöhten postoperativen Morbidität des Patienten einhergeht (Roccuzzo et al., 2002; Griffin et al., 2006).

Zudem sind noch keine Langzeitdaten über autologe Transplantate verfügbar (Thoma et al., 2011a). Auch das ästhetische Ergebnis ist häufig ein Kompromiss und für den Patienten unbefriedigend, da sich vor allem autologe freie Schleimhauttransplantate farblich von dem umliegenden Gewebe unterscheiden und hügeliger wirken (Shah et al., 2015).

Somit birgt der Einsatz autologer Transplantate eine Reihe von Nachteilen und Kompromissen, welche die Wissenschaft dazu animieren, alternative Materialien für die Augmentation von Weichgewebe zu entwickeln.

Dabei sind die klinischen und histologischen Anforderungen an ein solches Material vielfältig. Es muss in das ortsständige Gewebe integriert werden können, die Fähigkeit zur Degradation besitzen und von Bindegewebe ersetzt werden können (Thoma et al., 2011a). Zudem muss es eine dreidimensionale Volumenstabilität langfristig aufrechterhalten, auch unter physiologisch anspruchsvollen Bedingungen wie Druck- und Zugbelastungen, welchen es im Bereich der Empfängerregion ausgesetzt sein wird (Thoma et al., 2011a).

Als potenzielles Material wurden in diesem Zusammenhang bereits diverse Kollagenmembranen entwickelt und getestet. Bisher wurden Kollagenmembranen eingesetzt, um im Zuge der GBR (*guided bone regeneration*) und der GTR (*guided tissue regeneration*) als Barrieren das Augmentat vor der Einwanderung von

Bindegewebs- und Epithelzellen zu schützen, sowie die Proliferation von regenerativen Zellen zu begünstigen (Rothamel et al., 2005). Zwar wurden auch eine Reihe anderer resorbierbarer Materialien auf ihre Eignung als Barrieremembranen getestet, wie zum Beispiel Membranen aus Polylactidsäure oder Polyglykolsäure, allerdings zeigte sich Kollagen diesen Materialien gegenüber überlegen, da es die Blutkoagulation fördert, chemotaktisch auf Gingiva- und PDL (*periodontal ligament*) - Fibroblasten wirkt und eine Hauptkomponente des parodontalen Bindegewebes darstellt (Rothamel et al., 2005; Locci et al., 1997).

Das verwendete Kollagen Typ I und III ist bovinen oder porcinen Ursprungs.

Ein großer Nachteil der nativen Kollagenmembranen ist die schnelle Biodegradation und damit einhergehende mangelnde Volumenstabilität, da sie relativ zügig durch Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten abgebaut werden (Tatakis et al., 1999; Rothamel et al., 2005).

Um den Abbau der Membranen zu verzögern, wurden sogenannte „*cross-linking*“ Techniken entwickelt, chemische Modifikationen von nativem Kollagen. Bekannte *cross-linking*-Techniken sind zum Beispiel die Anwendung von ultravioletter Licht, Glutaraldehyd oder Diphenylphosphorylsäure (Kodama et al., 1989; Brunel et al., 1996; Zahedi et al., 1998; Bunyaratavej & Wang, 2001). In einer Studie von Rothamel aus dem Jahr 2004 wurden verschiedene *cross-linked* Membranen mit *non-cross-linked* Kollagenmembranen im Rattenmodell im Hinblick auf die Biodegradation, Vaskularisation, Gewebeintegration und Fremdkörperreaktion verglichen. Es wurde festgestellt, dass durch das *cross-linking* bei bovinen und porcinen Kollagenmembranen vom Kollagentyp I und III eine verzögerte Biodegradation stattfand. Allerdings zeigte sich bei den nativen Membranen eine deutlich schnellere Vaskularisierung, sowie eine annähernd perfekte Gewebeintegration, im Gegensatz zu den *cross-linked* Membranen (Rothamel et al., 2004). Dies ist im Rahmen einer GBR vertretbar, da in diesem Zusammenhang die Barrierefunktion und Zellokklusivität vorrangig erwünscht ist, allerdings zeigten GBR-Membranen häufig den Nachteil von Weichgewebsdehiszenzen (Annen et al., 2011).

Für die Indikation der Weichgewebsaugmentation sind *cross-linked* GBR-Membranen somit nicht geeignet. Eine Studie von Thoma et al. aus dem Jahr 2011 untersuchte zwei Prototyp Matrices aus Kollagen Typ I und III, welche sich lediglich

in dem Grad des *cross-linkings* unterschieden im Hinblick auf die Biodegradation, Vaskularisierung und Gewebeintegration. Die eine Membran (CM1) hatte eine dichtere Faserstruktur, wurde also stärker chemisch modifiziert, als die andere Membran (CM2), welche eine lockerere Faserstruktur aufwies. Im Rattenmodell konnte festgestellt werden, dass der Grad des *cross-linkings* signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Vaskularisierung, Bindegewebsformation, sowie die Degradation des Kollagennetzes hat. Die weniger dichte Struktur von CM2 war stabiler, zeigte verbesserte angiogenetische Eigenschaften und eine verbesserte Bindegewebsformation im Vergleich zur dichteren CM1. Somit konnte im Rahmen dieser Studie festgestellt werden, dass vor dem Hintergrund biologischer und mechanischer Aspekte eine lockerere und weniger chemisch modifizierte Kollagenmatrix für Weichgewebsaugmentationen geeigneter ist (Thoma et al., 2011a).

4.2 Mucograft als Alternative zum autologen Transplantat

Mucograft® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) ist eine dreidimensionale Typ I und III Kollagenmatrix porcinen Ursprungs, welche aus zwei funktionellen Schichten besteht: einer zellokklusiven Schicht aus kompakt angeordneten Kollagenfasern und einer dickeren porösen, spongiösen Schicht. Diese spongiöse Schicht dient der Bildung von Blutkoageln innerhalb der Matrix, um somit das Einwachsen von Gewebe, ausgehend von dem umgebenden ortständigen Gewebe, zu fördern (Lorenzo et al., 2012). Diese xenogene Matrix wurde keinem *cross-linking*-Verfahren unterzogen und besteht somit aus purem Kollagen. Die kompakte Schicht ermöglicht die Befestigung am ortständigen Gewebe über Nähte, während die spongiöse Schicht dem Knochen oder submukösen Weichgewebe aufliegt.

Mucograft wurde in einer 2009 veröffentlichten klinischen Studie von Sanz et al. mit Bindegewebstransplantaten verglichen. Untersucht wurden 20 Patienten mit mindestens einer Region von weniger als 1mm keratinisierter Schleimhaut im Hinblick auf den Gewinn an keratinisierter Schleimhaut nach 6 Monaten, parodontale Gesundheit, ästhetisches Ergebnis, sowie Patientenmorbidity.

Die Verbreiterung an keratinisierter Schleimhaut war für FST und Mucograft vergleichbar (2,6mm bzw. 2,5mm). Es zeigte sich in beiden Fällen eine

Gewebekontraktion von 60% (FST), bzw. 67% (Mucograft), wobei die parodontalen Parameter nicht beeinträchtigt wurden. Allerdings zeigte sich eine deutlich geringere Morbidität der Patienten bei angewandtem xenogenen Transplantat, gemessen an dem subjektiven Schmerzempfinden und der Menge an eingenommenen Schmerzmitteln, bei deutlich kürzeren Operationszeiten (Sanz et al., 2009), was einen nicht zu vernachlässigenden Vorteil für den Patienten darstellt.

Auch bei der Therapie von Weichgewebsdehiszenzen an Implantaten konnte gezeigt werden, dass Mucograft eine effektive Alternative zum freien Schleimhauttransplantat darstellt. So zeigte eine Studie von Schwarz et al., dass ein Vergleich von angewandtem koronalem Verschiebelappen (CAF) + Mucograft (CM), CAF + FST, sowie CAF alleine keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Breite an neugebildeter Mukosa ergaben. Alle drei Techniken zeigten eine vergleichbar gute Deckung der Rezessionen im Hundemodell (Schwarz et al., 2012).

Lorenzo et al. untersuchten die Effektivität von Mucograft im Vergleich zum Bindegewebstransplantat bei der Deckung von Rezessionen an dentalen Implantaten im Rahmen einer klinischen Studie an 24 Patienten. Auch sie konnten feststellen, dass die xenogene Matrix nach sechs Monaten vergleichbar gute Ergebnisse bei der Verbreiterung der keratinisierten Schleimhaut zeigte, wie nach Transplantation eines autologen Bindegewebstransplantates. Auch ästhetisch zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, während auch hier die Patientenmorbidity nach Anwendung der xenogenen Matrix deutlich geringer war (Lorenzo et al., 2012). Aktuell wurden diese Ergebnisse in dem Bericht der Konsensus Konferenz des 10. *European Workshop on Periodontology* festgehalten, in welchem es heißt, dass verglichen mit transplantiertem autologem Bindegewebe (BGT), die xenogene Kollagenmatrix eine histologisch vergleichbare Gewebeintegration zeigte und klinisch eine vergleichbare Zunahme des Gewebevolumens beobachtet werden konnte (Hämmerle und Giannobile, 2014).

4.3 Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren auf die Biodegradation und Organisation der xenogenen Kollagenmatrix

Präklinische Studien zeigten, dass das quervernetzte spongiöse Netzwerk der xenogenen Kollagenmatrix homogen von dichtem und gut vaskularisiertem Bindegewebe durchflochten wurde (Thoma et al., 2011b) und dass dies zudem mit einer Verdickung des Weichgewebes in der Empfängerregion einhergeht. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die pro-angiogenetischen Effekte von Glykoproteinen wie z.B. EPO (Erythropoetin), Peptidhormonen wie z.B. HGH (*human growth hormone*) oder Mitogenen wie z.B. PDGF (*platelet derived growth factor*) oder FGF (*fibroblast growth factor*) mit einer gesteigerten Kollagenproduktion einhergehen (Caperna et al. 1994; Throckmorton et al., 1995; Yamabe et al., 2000; Haroon et al., 2003). Somit könnten diese Faktoren die Gewebeintegration, Organisation, Biodegradation und Ersetzung der xenogenen Matrix durch eigenes Bindegewebe begünstigen und schlussendlich die Möglichkeiten und Techniken zur Weichgewebsaugmentation an Zähnen und Implantaten verbessern.

Die Untersuchung des Einflusses von EPO, HGH, PDGF und FGF auf die Biodegradation und Organisation einer xenogenen Kollagenmatrix (Mucograft) wurde im Rahmen dieser Arbeit histologisch und immunhistochemisch an Ratten untersucht. Das Rattenmodell hatte sich in vorangegangenen Studien als zuverlässiges, standardisiertes Testverfahren bewährt. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist dabei zwar limitiert, da die Ratte unter anderem die untersuchten Wachstumsfaktoren anders verstoffwechselt, als der menschliche Organismus, aber es eignet sich hervorragend, um eventuelle Infektionen, Fremdkörperreaktionen oder Wundheilungsstörungen beim Einsatz der inserierten Kollagenmatrices zu beobachten, was für den Erfolg der vorliegenden Studie von hoher Priorität war. Die Ergebnisse hinsichtlich der Biodegradation und Organisation der kollagenen Matrix in Abhängigkeit von unterschiedlich konzentrierten Wachstumsfaktoren kann dabei letztendlich nur in Tendenzen auf den Menschen übertragen werden. Das Rattenmodell bot somit die Möglichkeit, bei größtmöglicher Sicherheit durch Standardisierung und geringe Abweichungen, Tendenzen in den Ergebnissen zu erkennen und abzuleiten. Die

Abwesenheit von Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen zeigt, dass der Einsatz der in Wachstumsfaktoren getränkten Kollagenmatrices in Zukunft auch in klinischen Studien unbedenklich erprobt werden könnte. Derzeit ist eine Verwendung der Wachstumsfaktoren zu diesem Zweck europaweit nicht zugelassen.

Hinsichtlich der Ergebnisse zur Biodegradation und Organisation der Matrix konnte grundsätzlich beobachtet werden, dass die Kontrollgruppen eine Zunahme an C3-Fasern und folglich eine Zunahme der Membrandicke nach 7 (11%), 14 (20%) und 60 (21%) Tagen aufwiesen. Die Zugabe von Faktoren verschiedener Konzentrationen war gewöhnlich mit einer beschleunigten Organisation der Kollagenmatrix durch C3-Fasern, aber auch mit einer beschleunigten Biodegradation der Matrix assoziiert, was sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe an signifikanten Unterschieden der Werte nach 7 (PDGF-M; FGF-M; HGH-H), sowie nach 14 Tagen (EPO-H; HGH-L) zeigte. Der Nachweis der biologischen Aktivität der mit PDGF, FGF, EPO und HGH angereicherten Matrices wurde anhand humaner gingivaler Fibroblasten mit Hilfe eines validierten ATP-basierten luminometrischen Zellviabilitätsassays (Maehara et al., 1987; Petty et al., 1995) untersucht.

Bei dieser *in-vitro* Untersuchung gab es die Einschränkung, dass der Effekt der pro-angiogenetischen Faktoren auf Rattenzellen zwar unbekannt war, die luminometrischen Ergebnisse nach drei Tagen stimmten dennoch mit den histologischen Ergebnissen nach 4 und 7 Tagen überein und zeigten somit das höchste biologische Potenzial im Hinblick auf eine Zunahme des Weichgewebes für PDGF getränkte Matrices.

Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch den Nachweis der Antigenreaktivität von C3, einem extrazellulären Matrixprotein des subepithelialen Bindegewebes (Becker et al., 1993) und des Gefäßsystems (Farquharson&Robins, 1989), bestätigt werden.

Dies lässt die Annahme zu, dass eine Zunahme der C3 Antigenreaktivität in Folge der Zugabe einzelner pro-angiogenetischer Faktoren mit einer schnelleren Organisation der Kollagenmatrix einhergeht, sowohl in Bezug auf die bindegewebigen, als auch auf die vaskulären Strukturen.

Dennoch muss an dieser Stelle auch betont werden, dass die Beurteilung und Prüfung allein von C3 nicht die gesamten komplexen biologischen Prozesse, welche bei der Organisation und Biodegradation einer Kollagenmatrix auf zellulärer Ebene ablaufen, widerspiegelt und in diesem Zusammenhang sicherlich auch noch weiterführende immunhistochemische Analysen sinnvoll wären.

Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass Kollagenmatrices (Kontrollgruppe, ohne pro-angiogenetische Faktoren) nach bestimmter Zeit eine Zunahme an Weichgewebstdicke und Volumen aufweisen, deckt sich mit den Beobachtungen aus vorangegangenen experimentellen Studien (Thoma et al., 2010, 2011b; Schwarz et al., 2012).

Thoma et al. stellten insbesondere nach einer Einheilzeit von 28 und 84 Tagen bei chronischen Kieferkammdefekten im Hundemodell eine Volumenzunahme einer Prototyp Kollagenmatrix von $1,6\pm0,9$ und $1,4\pm0,4$ mm fest, welche sich näherungsweise mit den Werten für autologe Bindegewebestransplantate deckten ($1,5\pm0,1$ und $1,4\pm0,4$ mm) (Thoma et al., 2010).

Dies ging einher mit einer messbaren Neubildung von Hart- (Knochen)- und Weichgewebe von $6,4\pm0,9$ mm und $5,6\pm1,5$ mm bei eingesetzter Kollagenmatrix, bzw. $7,2\pm1,2$ mm und $6,0\pm2,1$ mm bei transplantiertem autologem Bindegewebe.

Die dichte Struktur der Kollagenmatrix zeigte sich in dieser Studie nach 28 Tagen annähernd unverändert, während nach 84 Tagen eine deutliche Degradation und Umwandlung der Matrixstruktur einhergehend mit kleineren Infiltraten von Entzündungszellen zu erkennen war (Thoma et al., 2010). Eine Studie von Schwarz et al. aus dem Jahr 2012 über die Deckung von Rezessionen an Titanimplantaten kommt zu ähnlichen Ergebnissen. 12 Wochen nach erfolgter Behandlung zeigten sich Mukosadicken von $0,71\pm0,55$ mm bei der Gruppe der Kollagenmatrices, sowie von $0,62\pm0,66$ mm bei der Gruppe der autologen Bindegewebestransplantate. Diese Werte wurden mit denen der Kontrollgruppe verglichen ($0,34\pm0,23$ mm) und zeigten eine vergleichbare Zunahme der Mukosadicke beider Testgruppen, mit leichtem Vorteil auf Seiten der Kollagenmatrix. Zudem konnte gezeigt werden, dass in drei von fünf Proben residuale Bestandteile der Kollagenmatrix nachzuweisen waren, welche sich ohne begleitendes entzündliches Zellinfiltrat und homogen durchwachsen von einem gut vaskularisierten Bindegewebe darstellten (Schwarz et al., 2012).

Betrachtet man all diese Daten geschlossen vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse, so lässt sich darauf schließen, dass die Organisation der untersuchten xenogenen Kollagenmatrix (Mucograft) durch C3- Fasern die Dicke von Weichgewebe in der Empfängerregion erhöht und diese somit als adäquate Alternative zum freien Schleimhauttransplantat oder dem autologen Bindegewebsstransplantat angesehen werden kann.

Während eine initiale Umwandlung peripherer Anteile der Kollagenmatrix durch den Zusatz von PDGF-M, EPO-M und EPO-H verstärkt werden konnte, wurde eine deutliche Degradation des Matrixkörpers bei den meisten Testgruppen zwischen Tag 7 und 60 der Einheilungsphase beobachtet. Diese Beobachtung wird bereits von früheren Daten gestützt, welche darauf hindeuten, dass PDGF-BB, FGF-2, EPO und HGH tatsächlichen Einfluss auf den Kollagenmetabolismus ausüben (Caperna et al., 1994; Throckmorton et al., 1995; Yamabe et al., 2000; Haroon et al., 2003).

Nichtsdestotrotz liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darin, den Einfluss der pro-angiogenetischen Faktoren auf die Biodegradation und die Organisation der Kollagenmatrix zu beurteilen und nicht darin, potenzielle Änderungen der Weichgewebstdicke in der Empfängerregion zu messen. Somit ist es schwierig abzuschätzen, in welchem Ausmaß die untersuchten pro-angiogenetischen Faktoren das Volumen des Weichgewebes beeinflusst hätten. Die klinische Relevanz dieser Beobachtung sollte in geeigneteren Defektmodellen weiterführend untersucht werden. Fest steht, dass wir in der vorliegenden Arbeit deutlich zeigen konnten, dass durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren eine Biologisierung der eigentlich biologisch inaktiven Kollagenmatrix erreicht werden konnte.

Zudem ist abschließend hervorzuheben, dass die Matrixstabilität des Kollagengerüsts durch chemische *cross-linking*- Verfahren gesteigert werden könnte (Thoma et al., 2012), was wiederum die Saugfähigkeit für die Aufnahme von pro-angiogenetischen Faktoren gegenüber nativen Membranen mit allen damit verbundenen Effekten erhöhen würde. Während Mucograft als Alternative zum FST bei der Weichgewebsaugmentation bereits CE-zertifiziert und europaweit zugelassen ist, besteht eine solche Zertifizierung und Zulassung für die angewandten Wachstumsfaktoren in Europa nicht. Neuartig wird eine xenogene Alternative zum BGT (*Fibro-Gide®*, Geistlich Pharma AG) in präklinischen Studien

erprobt. Auch in diesem Zusammenhang wäre der Einfluss pro-angiogenetischer Faktoren auf die Biodegradation des Materials interessant, nicht zuletzt im Hinblick auf eine zukünftige Zulassung von Wachstumsfaktoren beim Einsatz xenogener Materialien in der Weichgewebsaugmentation an Zähnen und dentalen Implantaten.

4.4 Schlussfolgerungen

Unter Berücksichtigung der Einschränkungen dieser vorliegenden Studie am Rattenmodell kann somit zusammengefasst werden, dass alle untersuchten pro-angiogenetischen Faktoren zu einer gesteigerten Organisation der Kollagenmatrix durch C3-Fasern führten und die Biodegradation der Matrix beschleunigten.

5 Literaturverzeichnis

Adell, R., Lekholm,U., Rockler,B., Branemark,P.I., Lindhe,J., Eriksson,B. Sbordone,L. (1986): Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures(i). A 3-year longitudinal prospective study. The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 15:39-52

Albrektsson T., Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T (eds). Proceedings of the First European Workshop on Periodontology. London: Quintessenz, 1994: 365-369.

Allen, E. P., Miller, P. D. Jr. (1989): Coronal positioning of existing gingiva. Short term results in the treatment of shallow marginal tissue recession. J Periodontol 60 (6): 316-319.

Annen, B. M., Ramel,C.F., Hämmerle,C.H., Jung,R.E. (2011): Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of peri-implant dehiscence defects: a randomized controlled double-blinded clinical trial. European Journal of Oral Implantology 4: 87-100

Artzi, Z., Tal,H., Moses,O., Kozlovsky,A. (1993): Mucosal considerations for osseointegrated implants. Journal of Prosthetic Dentistry 70: 427-432

Batal, H., Yavari A, Mehra P (2015):Soft tissue surgery for implants. Dent Clin North Am. 2015 Apr;59(2):471-91. doi: 10.1016/j.cden.2014.10.012. Epub 2014 Dec 19

Becker, J., Neukam, F.W., Schliephake, H. (1992): Restoration of the lateral sinus wall using a collagen type I membrane for guided bone regeneration. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 21: 243-246

Becker, J., Schuppan, D., Müller, S. (1993): Immunohistochemical distribution of collagens type I, III, IV and VI, of undulin and of tenascin in oral fibrous hyperplasia. Journal of Oral Pathology and Medicine 22: 463-467

Bengazi, F., Wennström J.L., Lekholm U. (1996): Recesson of the soft tissue margin at oral implants. A 2-year longitudinal prospective study. Clin Oral Implants Res. 1996 Dec ;7(4): 303-10.

Bjorn, H., Free transplantation of gingiva propria. Sver Tandlakarforb Tidn. 1963; 22:684

Bondurant, M.C., Koury M.J.: Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver (1986), Mol. Cell. Biol. 6:2731-2733

Brines, ML., Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury (2000) PNAS Vol 97 Nr 19 10526-10531

Brunel, G., Piantoni, P., Elharar, F., Benque, E., Martin, P., Zahedi, S. (1996): Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. Journal of Periodontology 72:215-229

Bunyaratavej, P., Wang, H.L. (2001): Collagen membranes: a review. Journal of Periodontology 72: 215-229

Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med 6: 389-95.

Cairo, F., Pagliaro, U. & Nieri, M. (2008) Soft tissue management at implant sites. Journal of Clinical Periodontology 35:163-167.

Cairo, F., Pagliaro, U. & Nieri, M. (2008): Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: a systemic review. Journal of Clinical Periodontology 35: 136-162

Caperna, T.J., Gavelek, D., Vossoughi, J. (1994): Somatotropin alters collagen metabolism in growing pigs. Journal of Nutrition 124: 770-778

Cawood, JI, Stoelinga PJ. (2000) International Research Group on Reconstructive Preprosthetic Surgery. Consensus report. Int J Oral Maxillofac Surg. 29(3):159-162.

Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P. (2001): Molecular mechanism of blood vessel growth. Cardiovasc Res 2001; 49: 634-646.

Del Pizzo, M., Modica, F., Bethaz, N., Priotto, P., Romagnoli, R. (2002): The connective tissue graft: a comparative clinical evaluation of wound healing at the

palatal donor site. A preliminary study. *Journal of Clinical periodontology* 29: 848-854

Eposito, M., Grusovin, M.G., Maghaireh, H., Coulthard, P., Worthington, H.V. (2007): Interventions for replacing missing teeth: management of soft tissues for dental implants. *Cochrane Database Systematic Review* 18: CD006697

Farquharson, C., Robins, S.P. (1989): Immunolocalization of collagen types I and III in the arterial wall of the rat. *Histochemical Journal* 21:172-178

Finch, C.A.: Erythropoiesis, erythropoietin, and iron (1982) *Blood* 60:1241-1246

Griffin, T.J., Cheung, W.S., Zavras, A.I., Damoulis, P.D. (2006): Postoperative complications following gingival augmentation procedures. *Journal of Clinical Periodontology* 77: 2070-2079.

Gümps, P., Buduneli, E. (2014): Graft stabilization with cyanoacrylate decreases shrinkage of free gingival grafts; *Australian Dental Journal*,59: 1-8

Hämmerle, C.H., Jung, R.E., Feloutzis, A. (2002) A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *Journal of Clinical Periodontology* 29 (Suppl.3), 226-231

Hämmerle C.H., Giannobile WV; Working Group 1 of the European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2014 Apr; 41 Suppl 15:S1-5. doi: 10.1111.

Hangorsky, U., Bissada, N.F. (1980): Clinical assessment of free gingival graft effectiveness on the maintenance of periodontal health. *Journal of Periodontology* 51: 274-278

Hardwick, R., Scantlebury; T.V., Sanchez, R., Whitley, N., Ambruster, J. (1994): Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. In: Buser, D., Dahlin, C., Schenk, R.K., eds. *Guided bone regeneration in implant dentistry*, 101-136. Chicago: Quintessenz Publishing

Haroon, Z.A., Amin, K., Jiang, X., Arcasoy, M.O. (2003): A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. American Journal of Pathology 163:993-1000

Hawley, C.E., Staffileno, H. (1970): Clinical Evaluation of Free Gingival Grafts in Periodontal Surgery, Journal of Periodontology February 1970, Vol. 41, No. 2, Pages 105-112, DOI10.1902/jop.1970.41.2.105

Heldin, C. H., B. Westermark, and A. Wasteson. 1981. Demonstration of an antibody against platelet-derived growth factor. Exp. Cell Res. 136:255-261

Herford, AS, Akin L, Cicciu M, Maiorana C, Boyne PJ. (2010) Use of a Porcine Collagen Matrix as an Alternative to Autogenous Tissue for Grafting Oral Soft Tissue Defects. J Oral Maxil Surg. 68(7):1463-1470.

Jelkmann, W.: Erythropoietin: structure, control of production, and function (1992) Physiol Rev 72:449

Juul, S.E., Yachnis AT, Christensen R: Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus (1998) Earl Hum Dev 52 235-249

Kodama, T., Minabe, M., Hori, T., Watanabe, Y. (1989): The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. Journal of Periodontology 60:205-210

Koury, ST, Bondurant MC, Koury MJ: Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization (1988) Blood 71:524-527

Koury, MJ, Bondurant MC: The mechanism of erythropoietin action (1991) Am J Kidney Dis.18(1) 20-3

Kumar, A., Sood, V., Masamatti, S.S., Triveni, M.G., Mehta, D.S., Khatri,M., Agarwal V., (2013): Modified single incision technique to harvest subepithelial connective tissue graft Indian Soc Periodontol. 2013 Sep-Oct; 17(5): 676–680.

Lang, N. P., Löe, H. (1972): The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. J Periodontol 43 (10): 623-627.

Langer, B., (1996): The regeneration of soft tissue and bone around implants with and without membranes. The Compendium of Continuing Education in Dentistry 17: 268-270; 272 passim; quiz 280

Lippi G, Guidi G: Laboratory Screening for Erythropoietin Abuse in Sport an Emerging Challenge (2000) Clin Chem Lab Med 38(1):13-19

Locci, P., Calvitti, M., Belacastro, S., Pugliese, M., Guerra, M., Marinucci, L., Staffolani, N., Becchetti, E. (1997): Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. Journal of Periodontology 68: 857-863

Lorenzo, R., Garcia, V., Orsini, M., Martin, C., Sanz, M. (2012): Clinical efficacy of a xenogeneic collagen matrix in augmentating keratinized mucosa around implants: a randomized controlled prospective clinical trial. Clinical Oral Implants Research 23: 316-324

Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., Sugimachi, K. (1987): The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. European Journal of Cancer and Clinical Oncology 23:273-276

Martin, GR (1998): The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs, *Genes & Development* 12:1571-1586

Masuda, S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas Jr. F, Tabira T, Sasaki R: Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells (1993) J Biol Chem 268:11208-16

McGuire, M.K., Scheyer, E.T., Nunn, M.E., Lavin, P.T. (2008): A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. Journal of Periodontology 79: 1847-1856.

McGuire, M.K., Scheyer, Xenogeneic collagen matrix with coronally advanced flap compared to connective tissue with coronally advanced flap for the treatment of dehiscence-type recession defects. J Periodontol, 2010. 81(8): 1108-1117.

Metin, M, Dolanmaz D, Alkan A. (2003) Evaluation of autogenous grafts used in vestibuloplasty. J Int Med Res. 31(4):335-339.

Morakkabati, N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W: Erythropoietin induces Ca²⁺-mobilisation and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. (1996) Exp Hematol 24:392-7

Nabers, C. L. (1954): Repositioning the attached gingiva. J Periodontol 25(1): 38-39.

Nabers, JM. (1966) Free gingival grafts. Periodontics 4:243–5.

Naski, MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM (1996): Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia, *Nat Genet* **13 (2)**: 233-7

Norberg, O. (1926): Är en utläkning utan vävnadsförlust otänkbar vid kirurgisk behandling av s.k. alvolaryporrea? Svensk Tandläkar Tidskrift 19:171

Palmer, R.M., Cortellini, P. & Group B.o.E.W.o.P. (2008) Periodontology tissue engineering and regeneration: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. Journal of Clinical Periodontology 35: 83-86

Park, J.B. (2006): Increasing the width of keratinized mucosa around endosseous implant using acellular dermal matrix allograft. Implant dentistry 15: 275-281

Paul, B.F., Melloning, J.T., Towle, H.J.3rd, Gray, J.L. (1992): Use of collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 12:123-131

Petite, H., Frei, V., Huc, A., Herbage, D. (1994): Use of diphenylphosphorylazide for cross-linking collagen-based biomaterials. J Biomed Mater Res. 1994 Feb.;28(2):159-65

Petty, R.D., Sutherland, L.A., Hunter, E.M., Cree, I.A. (1995): Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 10: 29-34

Pitaru, S., Tal, H., Soldinger, M., Grosskopf, A., Noff, M. (1988): Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *Journal of Periodontology* 59:380-386

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-4.

Ross, R., E. W. Raines, and D. F. Bowen-Pope. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 46:155-169.

Roccuzzo, M., Bunino, M., Needleman, I., Sanz, M., (2002): Periodontal plastic surgery for treatment of localized gingival recessions: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* 29 (Suppl 3): 178-194; discussion 195-176.

Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Hertel, M., Sculean, A., Becker, J. (2005): Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin. Oral. Impl. Res.* 16,369-378

Rucha, S, Raison T., Dhoom Singh,M. (2015): Recent modifications of free gingival graft: A case series *Contemp Clin Dent.* 2015 Jul-Sep; 6(3): 425–427.

Sanz, M., Lorenzo, R., Aranda, J.J., Martin, C., Orsini, M. (2009): Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* 36: 868-876.

Schroeder, HE. (1987): *Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Strukturen und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks.* Georg Thieme Verlag. Stuttgart-New York. 1987.

Schroeder, H. E.: Mundschleimhaut. In: Schroeder, H. E.: *Orale Strukturbiologie.* Thieme, Stuttgart (1992): 349-390.

Schlegel, KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Jan-Feb 2003;18(1):53-58.

Schultze-Mosgau, S, Neukam F.W. (2003): Präprothetische Chirurgie. In: Hausamen J-E, Becker J, Neukam FW, Reichardt PA, Schliephake H,

Schmelzeisen R. Curriculum. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Chirurgie Band III. Quintessenz Verlags-GmbH. Berlin. S.147- 180.

Schwarz, F., Sager, M., Rothamel, D., Herten, M., Sculean, A., Becker, J. (2006) Use of native and cross-linked collagen membranes for guided bone regeneration. Schweizerische Monatszeitschrift für Zahnmedizin 116: 1112-1123

Schwarz, F., Rothamel, D., Herten, M., Sager, M., Becker, J. (2006): Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. Clin. Oral. Impl. Res. 17,403-409

Schwarz, F., Mihatovic, I., Shirakata, Y., Becker, J., Bosshardt, D., Sculean, A. (2012): Treatment of soft tissue recessions at titanium implants using a resorbable collagen matrix: a pilot study. Clin. Oral Impl. Res. 25, 2014, 110-115

Schwarz, F., John, G., Kaiser, T., Mihatović, I., Golubović, V., Becker, J. (2014): Impact of proangiogenic factors on organization and biodegradation of a collagen matrix. An immunohistochemical study in rats. Clin. Oral Impl. Res. 25, 530–538

Selvig, K.A., Kersten, B.G., Chamberlain, A.D., Wikesjo, U.M., Nilveus, R.E. (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: 974-978

Shah, R., Thomas, R., Metha, D.S. (2015): Recent modifications of free gingival grafts: a case series, Contemp Clin Dent. 2015 Jul-Sep; 6(3): 425-427

Shimokado, K., E. W. Raines, D. K. Madtes, T. B. Barret, E. P. Benditt, and R. Ross. 1985. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. Cell. 43:277-286.

Soileau, K.M., Brannon, R.B. (2006): A histologic evaluation of various stages of palatal healing following subepithelial connective tissue grafting procedures: a comparison of eight cases. Journal of Periodontology 77: 1267-1273.

Sorg, H., C. Krueger, T. Schulz, M. D. Menger, F. Schmitz, B. Vollmar: Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related. In: *FASEB J.* 23, 2009, S. 3049–3058 PMID 19403513.

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

Tempo, P.J., Nalbandian, J. (1993): Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: morphological and microbiological observations. *Journal of Periodontology* 64: 162-168

Thoma, D.S., Benic, G.I., Zwahlen, M., Hämmerle, C.H., Jung, R.E. (2009): A systemic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clinical Oral Implants Research* 20(Suppl 4):146-165

Thoma, D.S., Jung, R.E., Schneider, D., Cochran, D.L., Ender, A., Jones, A.A., Görlach, C., Uebersax, L., Graf-Hausner, U., Hämmerle, C.H. (2010): Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices: a volumetric analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 37: 659-666

Thoma, D.S., Villar, C.C., Cochran, D.L., Hämmerle, C.H.F., Jung, R.E. (2011a): Tissue integration of collagen-based matrices: an experimental study in mice. *Clin. Oral Impl. Res.* 23,2012,1333-1339 Doi:10.1111/j.160-0501.2011.02356.x

Thoma, D.S., Hämmerle, CHF, Cochran, DL., Jones, AA., Görlach, C., Uebersax, L., Mathes, S., Graf.Heuser, U., Jung, RE (2011b): Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrices in the dog mandible-a histological analysis. *J Clin Periodont* 2011, 38: 1063-1070

Throckmorton, D.C., Brogden, A.P., Min, B., Rassmussen, H., Kashgarian, M. (1995): PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney International* 48: 11-117

Vignoletti, F., Nunez, J. & Sanz, M. (2014), Soft tissue wound healing at teeth, dental implants and the edentulous ridge with scaffolds, cells and biologicals. *Journal of Clinical Periodontology* 41.

Wallace, S.S., Froum, S.J. (2003): Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Annals of Periodontology* 8,328-343

Wehrhan, F, Nkenke E, Melnychenko I, Amann K, Schlegel KA, Goerlach C, Zimmermann WH, Schultze-Mosgau S. (2010) Skin repair using a porcine collagen I/III membrane--vascularization and epithelization properties. *Dermatol Surg.* 36(6):919-930

Wennström, J., Lindhe, J. (1983) Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 10: 206-221

Wennström, J.L., (1996): Mucogingival therapy. *Annals of Periodontology* 1:971-701

Yamabe, H., Osawa, H., Kaizuka, M., Tsunoda, S., Shirato, K., Tateyama, F., Okumura, K. (2000): Platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, interferon gamma increase type IV collagen production in human fetal mesangial cells via a transforming growth factor- beta- dependent mechanism. *Nephrology Dialysis Transplantation* 15: 872-876

Yamaji, R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y: Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA (1996) *Eur J Biochem* 239:494-500

Yan, J.J., Tsai, A.j., Wong, M.Y., Hou, L.T. (2006) Comparison of acellular dermal graft and palatal autograft in the reconstruction of keratinized gingiva around dental implants: a case report. *The International Journal of Periodontics in Restorative Dentistry* 26, 287-292

Zahedi, S., Legrand, R., Brunel, G., Albert, A., Dewe, W., Coumans, B., Bernard, J.P. (1998): Evaluation of a diphenylphosphorylazide-cross-linked collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats. *Journal of clinical periodontology* 69:1238-1246

Zigdon, H., Machtei, E.E. (2008): The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. *Clinical Oral Implants Research* 19:387-392

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1:	Kollagenmatrices in sterilen Glasschalen.....	14
Abb. 2:	Großansicht zweier 10x20mm Kollagenmatrices.....	15
Abb. 3:	OP-Protokoll zur Dokumentation	17
Abb. 4:	Steriles OP-Setup je Tier.....	18
Abb. 5:	Desinfektion des rasierten OP-Bereichs	18
Abb. 6:	Kutane Inzision paravertebral.....	19
Abb. 7:	Platzierung in <i>Pouch</i> 1 mit neuer, steriler Pinzette.....	19
Abb. 8:	Hautnähte (Einzelknopf) Vicryl® 3-0.....	20
Abb. 9:	Freilegung der Entnahmestelle, Tier 6, Zeitpunkt 4 Tage.....	21
Abb. 10:	<i>Pouch</i> 2 und 4; Zeitpunkt 4 Tage	21
Abb. 11:	Entnommene Probe; <i>Pouch</i> 1, Zeitpunkt 4 Tage.....	22
Abb. 12:	Fixierung in 10% gepuffertem Formalin.....	22
Abb. 13:	Zellviabilitätsassay humaner Gingivafibroblasten.....	28
Abb. 14:	CM, MG, 4 Tage, x25.....	33
Abb. 15:	CM, MG, 4 Tage, x200.....	34
Abb. 16:	CM+PDGF-M, MG, 4 Tage, x40.....	35
Abb. 17:	CM+FGF-L, MG, 4 Tage, x40.....	35
Abb. 18:	CM+EPO-M, MG, 4 Tage, x25.....	36
Abb. 19:	CM+HGH-M, MG, 4 Tage, x25.....	36
Abb. 20:	CM, C3 Antigen, 4 Tage, x40.....	37
Abb. 21:	CM, MG, 7 Tage, x25.....	38
Abb. 22:	CM, MG, 7 Tage, x200.....	38
Abb. 23:	CM, C3 Antigen, 7 Tage, x40.....	39
Abb. 24:	CM+PDGF-H, MG, 7 Tage, x25.....	40
Abb. 25:	CM+FGF-H, MG, 7 Tage, x25.....	40
Abb. 26:	CM+EPO-M, MG, 7 Tage, x25.....	41
Abb. 27:	CM+HGH-L, MG, 7 Tage, x25.....	41
Abb. 28:	CM, MG, 14 Tage, x25.....	42

Abb. 29:	CM, MG, 14 Tage, x200.....	43
Abb. 30:	CM, C3 Antigen, 14Tage, x40.....	43
Abb. 31:	CM+PDGF-M, MG, 14 Tage, x25.....	44
Abb. 32:	CM+FGF-M, MG, 14 Tage, x25.....	45
Abb. 33:	CM+EPO-H, MG, 14 Tage, x25.....	45
Abb. 34:	CM+HGH-M, MG, 14 Tage, x25.....	46
Abb. 35:	CM, MG, 60 Tage, x25.....	47
Abb. 36:	CM, MG, 60 Tage, x200.....	47
Abb. 37:	CM, C3 Antigen, 60Tage, x40.....	48
Abb. 38:	CM+PDGF-L, MG, 60 Tage, x25.....	49
Abb. 39:	CM+FGF-H, MG, 60 Tage, x25.....	49
Abb. 40:	CM+EPO-H, MG, 60 Tage, x25.....	50
Abb. 41:	CM+HGH-H, MG, 60 Tage, x25.....	50

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1a:	Matrixdicke in μm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : PDGF.....	29
Tabelle 1b:	Matrixdicke in μm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : FGF.....	29
Tabelle 1c:	Matrixdicke in μm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : EPO.....	30
Tabelle 1d:	Matrixdicke in μm nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : HGH.....	30
Tabelle 2a:	Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : PDGF....	31
Tabelle 2b:	Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : FGF.....	31
Tabelle 2c:	Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : EPO.....	32
Tabelle 2d:	Gewebekontakt in % nach 4, 7, 14, 60 Tagen, CM : HGH.....	32

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben:

Ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater und Lehrer Herrn Universitätsprofessor Dr. med. dent. Frank Schwarz für die stete und großzügige wissenschaftliche Betreuung bei der Ausbildung in der Hart- und Weichgewebshistologie, der Durchführung des Versuchs und der Anfertigung und Vollendung dieser Arbeit.

Zudem danke ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. dent. Jürgen Becker für das Überlassen dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, im Forschungslabor der Zahnärztlichen Chirurgie tätig gewesen sein zu dürfen.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Kollegen und Freunden Dr. med. dent. Vladimir Golubović, Dr. med. dent. Gordon John und Dr. med. dent. Ilja Mihatović aus dem Forschungslabor bedanken. Die Zeit mit euch war großartig! Tausend Dank für eure Unterstützung!

Ebenso danke ich meinen ehemaligen Kolleginnen aus dem Labor, den MTA Brigitte Hartig und Tina Hagen, sowie Dr. rer. nat. Monika Herten. Nur durch euren unermüdlichen Einsatz und eure perfekte Organisation war diese hervorragende Histologie überhaupt erst möglich. Es hat mir enorm viel Spaß gemacht, mit euch zusammen zu arbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Iris Schrey und Herrn PD Dr. med. vet. Martin Sager der ZETT – Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben – für die hervorragende Organisation und die Betreuung rund um die Versuche bedanken.