

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Klinische Navigation und Robotik
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Histologische Untersuchungen zum Transplantatremodeling
nach Ober- und Unterkieferaugmentation mit autologem
Beckenkammknochen und einer quervernetzten
Kollagenmembran am Göttinger Minischwein**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charite - Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Schreckenberger
geb. Schober

aus Gera

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis	2
Zusammenfassung	6
Summary	8
1. Einleitung	10
1.1. Aufbau des Knochengewebes	11
1.2. Osteogenese	14
1.3. Knochenumbau	15
1.4. Aufbau des Alveolarknochens	16
1.5. Augmentationsmaterialien	16
1.5.1. Augmentationsmaterialien: autolog/autogen	18
1.5.2. Augmentationsmaterialien: allogene/homologe	19
1.5.3. Augmentationsmaterialien: xenogene/heterologe	19
1.5.4. Augmentationsmaterialien: alloplastisch	20
1.6. Augmentationsverfahren	20
1.7. Mechanismen der Augmentattheilung	22
1.8. Einsatz von Membranen in der Zahnmedizin	24
1.9. Tiermodell und Vergleich des Knochens	27
1.10. Fluoreszenzmikroskopie	28
2. Fragestellung der Arbeit	30
3. Material und Methoden	31
3.1. Versuchstiere	31
3.1.1. Medikamentöse Therapie	31
3.1.2. Chirurgischer Eingriff	32
Defektsetzung	32
Augmentation	33
Team I - extraoral	33
Team II - intraoral	33
3.1.3. Bio-Gide-Pro [®] - Kollagenmembran	34
3.1.4. Nachsorge der Tiere	35
3.1.5. Fluorochromlabelling	36

3.2. Herstellung der histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Präparate.....	37
3.2.1. Sedierung.....	37
3.2.2. Herstellung der Blöcke.....	37
3.2.3. Herstellung von Schnitten.....	38
3.2.4. Färbungen.....	39
Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner-Trichrom.....	39
3.3. Digitales Bildanalysesystem.....	41
3.3.1. Fluoreszenzmikroskopie.....	41
3.3.2. Evaluation der Knochenneuformationsrate mittels Fluoreszenzmarkierung.....	44
3.3.3. Bestimmung der Knochenresorptionsrate.....	46
3.4. Statistische Analyse.....	47
4. Ergebnisse.....	48
4.1. Versuchstiere.....	48
4.2. Knochenneuformationsrate.....	50
4.2.1. Knochenneuformationsrate im Ober- und Unterkiefer.....	51
4.2.2. Dehiszenzhäufigkeit.....	52
4.3. Evaluation der Resorption.....	54
4.3.1. Resorption in Ober- und Unterkiefer.....	54
4.3.2. Einfluss der Membran auf die Resorption im Vergleich zwischen Oberkiefer und Unterkiefer.....	55
4.3.3. Vergleich der Resorptionsrate zwischen Periost- und Membranabdeckung bei auftretenden Dehiszenzen.....	55
5. Diskussion.....	56
5.1. Diskussion der Methodik.....	56
5.1.1. Gesteuerte Knochenregeneration (GBR).....	56
5.1.2. Tiermodell.....	58
5.1.3. Polyfluorochrome Sequenzmarkierung.....	60
5.2. Diskussion der Ergebnisse.....	60
5.2.1. Knochenneuformationsrate.....	61
5.2.2. Resorptionsrate.....	63

5.2.3. Dehiszenzhäufigkeit.....	65
5.3. Schlussfolgerung.....	69
6. Verzeichnisse.....	70
6.1. Material und Methoden: Fußnoten und Endnoten.....	70
6.2. Literatur.....	72
6.3. Abkürzungen.....	94
6.4. Abbildungen.....	95
6.5. Tabellen.....	95
7. Danksagung.....	96
8. Lebenslauf.....	97
9. Eidesstattliche Versicherung.....	98

Zusammenfassung

Der Einsatz von Membranen erfolgt in der oralen Chirurgie zur selektiven Deckung von Knochendefekten. In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung einer quervernetzten, resorbierbaren Prototyp-Kollagenmembran im Hinblick auf die Knochenneuformationsrate nach Augmentation mit avaskulärem Beckenkammtransplantat am Göttinger Minischwein untersucht. Für diese Studie wurde sechs Schweinen ein Knochenblock des Alveolarkamms aus jedem der vier Quadranten entfernt. Zwei Monate nach der Defektsetzung erfolgte eine Augmentation mit einem Transplantat aus dem porcinen Beckenkamm, das mit zwei Osseosyntheseschrauben fixiert wurde. Anhand einer Randomisierungsliste erfolgte zur Abdeckung der augmentierten Knochenblöcke die selektive Verwendung der Prototyp-Kollagenmembran (Bio-Gide-Pro[®]) oder die reine Periostabdeckung. Nach der Augmentation wurde nach vollendeten 2, 5 und 8 Wochen eine polyfluorochrome Sequenzmarkierung der Knochenneuformation durchgeführt. Zwölf Wochen post augmentationem, die unter geschlossener, unbelasteter Einheilung erfolgte, wurden die Tiere geopfert und die Präparate entnommen. Anschließend wurden die Biopsien histologisch aufbereitet und ausgewertet. Dabei sollte die Knochenneubildungsrate (KNR) bei den beiden verschiedenen Abdeckungen fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung spezieller Filter nach bestimmten Zeitintervallen (3. - 5. Woche = t1, 6. - 8. Woche = t2, 3. - 8. Woche = t3) evaluiert und verglichen werden. Weiterhin wurde die Resorptionstendenz der Transplantate nach 12 Wochen unter der Verwendung der Membran oder der reinen Periostabdeckung bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine durchschnittliche KNR bei der Verwendung der Kollagenmembran im Zeitraum t1 von 47,74 μm und im Zeitraum t2 von 32,29 μm . Bei der reinen Periostabdeckung ergab sich eine durchschnittliche KNR bei t1 von 45,47 μm und bei t2 von 29,14 μm . Die statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Lokalisation (Oberkiefer/Unterkiefer) und der Abdeckmethode. Die KNR pro Tag nahm vom ersten (t1) zum zweiten (t2) Untersuchungszeitraum ab. Hinsichtlich der Resorptionstendenz zeigte sich eine durchschnittliche Resorption des Augmentates von 85,2% ohne signifikanten Einfluss der Lokalisation und Verwendung von Membran oder Periostabdeckung. Gleichzeitig trat eine Dehiszenzhäufigkeit von 54,6% (6 von 11 Präparaten) auf, davon bei 66,6% unter Membranverwendung und bei 33,3% unter reiner Periostabdeckung. KNR und Resorptionsrate wurden durch die Membran nicht beeinflusst, aber die

Dehiszenzhäufigkeit. Zusammenfassend ist zu sagen, die in dieser Studie verwendete Membran zeigte keinen direkten Vorteil hinsichtlich der Knochenneuformationsrate im Vergleich zur reinen Periostabdeckung, sowie eine sehr hohe Dehiszenzhäufigkeit mit damit verbundenen ausgeprägten Resorptionstendenzen. Aufgrund der Ergebnisse dieses Pilotversuches wurden keine weiteren tierexperimentellen oder humanen Studien mit der verwendeten quervernetzten Kollagenmembran (Bio-Gide-Pro®) durchgeführt.

Summary

Membranes are used in oral surgery for selective defect coverage. This study investigated the application of a cross-linked, bioresorbable prototype-collagen membrane considering the bone formation, following alveolar ridge augmentation with autogenous iliac bone grafts in Göttingen minipigs. For this study, an osseous block of the alveolar crest from each of the four quadrants was removed in six Göttingen minipigs. Two months after creating the defect, an augmentation procedure was performed with a transplant from the porcine iliac bone crest, which was fixed with two microscrews. Based on a randomization list, either the prototype Bio-Gide-Pro® collagen membrane or perios coverage was applied to cover the block augmentation. Two, five and eight weeks after the augmentation, a polyfluorochrome sequence labelling of the new bone formation was performed. Twelve weeks after the augmentation procedure the animals were sacrificed and the biopsies removed. Subsequently, the biopsies were prepared histologically and evaluated. The bone formation rate (BFR) in the two different cover methods was to be evaluated and compared applying a fluorescence-microscope using special filters for specific time intervals (3rd - 5th week = t1, 6th - 8th week = t2, 3rd - 8th week = t3). Furthermore, the resorption rate of the grafts was determined after 12 weeks, either covered with a bioresorbable membrane or periosteum. The results showed an average BFR under the collagen membrane of 47.74 µm in the period t1 and of 32.29 µm in the period t2. Applying the periosteum-coverage, a BFR of 45.47 µm resulted at t1, and of 29.14 µm at t2. The statistical analysis showed that there was no significant difference, neither in location (maxilla / mandible) nor method of coverage. The BFR per day decreased from the first (t1) to the second (t2) period of investigation. Regarding the resorption rate, there was an mean resorption rate of the graft of 85.2% without a significant influence of the localisation and use of membrane or periosteum. At the same time, a dehiscence rate of 54.6% (6 of 11 preparations) occurred, of which 66.6% was recorded among membrane cases and 33.3% with periosteum. The BFR and resorption were not influenced by the membrane, but by the rate of dehiscences. In conclusion, the membrane used in this study did not show an advantage in terms of BFR compared to periosteum, and there was a very high dehiscence rate associated with pronounced resorption. Based on the results within this study, no other animal or human studies were carried out that used cross-linked collagen membrane (Bio-Gide-Pro®).

1. Einleitung

Bei kraniofazialen Knochendefekten, die entzündlicher, tumoröser, traumatischer und atrophischer Herkunft sein können, besteht die Notwendigkeit der Behandlung, um die ursprüngliche physiologische Kaufunktion wiederherstellen zu können. Gleichzeitig spielen auch weitere funktionelle und ästhetische Gründe eine entscheidende Rolle. (Reuther und Kübler 1999) Gerade im Hinblick auf die prothetische Wiederherstellung der Defektbereiche ist eine knöcherne Rekonstruktion des Alveolarkamms in horizontaler und vertikaler Dimension von entscheidender Bedeutung. (Wiltfang und Gellrich 2003, Würzler et al. 2004, Zitzmann 2004) Die Therapiemöglichkeiten reichen von membrangestützter Knochenregeneration bis zur Verwendung großvolumiger Knochenrekonstruktionen. (Weibrich et al. 1999) Die gesteuerte Knochenregeneration (GBR - guided bone regeneration) ist ein Verfahren, bei dem durch den Einsatz von Membranen die eigene Regenerationsfähigkeit des Knochens ausgenutzt wird. Durch die Abdeckung des Defektes mit Membranen wird dabei das Einwachsen von schnell proliferierenden Bindegewebszellen verhindert. (Hardwick et al. 1994) Mittlerweile zählt die gesteuerte Knochenregeneration zu den Standardverfahren in der Parodontologie und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Barrieremembranen verschiedener Arten stehen für die Umsetzung des GBR-Verfahrens zur Verfügung (resorbierbare und nicht resorbierbare Membranen, Titanfolien, etc.). (Hämmerle und Lang 2001) Resorbierbare Membranen haben den Vorteil, dass ein Zweiteingriff entfällt. Ist ein Kieferknochendefekt zu groß, so dass der Körper selbst zur Regeneration nicht fähig ist (critical size defect), muss nach einer geeigneten Therapie gesucht werden, um den fehlenden Knochen wieder aufzubauen. (von Garrel und Gotzen 1998) In Abhängigkeit der Größe stehen dabei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Neben den xenogenen, allogenen und alloplastischen Knochenersatzmaterialien ist der autologe Knochen nach wie vor als „Goldstandard“ zur Deckung kraniofazialer Defekte aufgrund seiner osteogenen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaft zu sehen. (Stutzle et al. 1998, Bauer und Muschler 2000, Artzi et al. 2004, Zijdeveld et al. 2005, Nelson et al. 2006, Fickl et al. 2008, Mertens et al. 2012) Entnahmemöglichkeiten des autologen Knochens sind je nach benötigtem Volumen zum einen der intraorale Bereich mit Spenderarealen der Tuber-, Kinn- und Retromolarregion (Kübler et al. 1998) und zum anderen der extraorale Bereich (Ileum, Fibula, Tibia, Costae und Scapula). (Kneser et al. 2006) Aufgrund der immunologischen Gleichheit zwischen Empfänger und Spender

ist autologer Knochen in Bezug auf die Infektionsgefahr ausgehend vom Transplantat unbedenklich. Nachteilig ist die begrenzte Verfügbarkeit des autologen Knochens und die Resorptionstendenz des Materials bei fehlender Belastung. (Capelli 2003, Soost et al. 2001) In der Literatur werden die Möglichkeiten der Membranabdeckung diskutiert, um etwaige Resorptionstendenzen beeinflussen zu können. Durch die Verwendung von Membranen verspricht man sich dabei den Erhalt des Knochenvolumens autologer Transplantate. (Camargo und Lekovic 2000, Taguchi et al. 2005) Um die Aufrechterhaltung der Barrierfunktion der Membranen gewährleisten zu können, sind an diese verschiedene Anforderungen wie eine ausreichende Standzeit, biologische Verträglichkeit, gute Platzierbarkeit und dem mechanischen Schutz des knöchernen Defekts geknüpft. (Ling et al. 2003, Verardi und Simion 2007)

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Anwendung eines Prototyps einer experimentell chemisch quervernetzten, resorbierbaren Kollagenmembran im Rahmen einer präklinischen Prüfung am Tiermodell nach Beckenkammaugmentation untersucht. Zunächst werden aber die anatomischen Grundlagen, die gängigen Augmentationsmaterialien und -verfahren sowie die verschiedenen Membranarten und ihre Verwendung beschrieben.

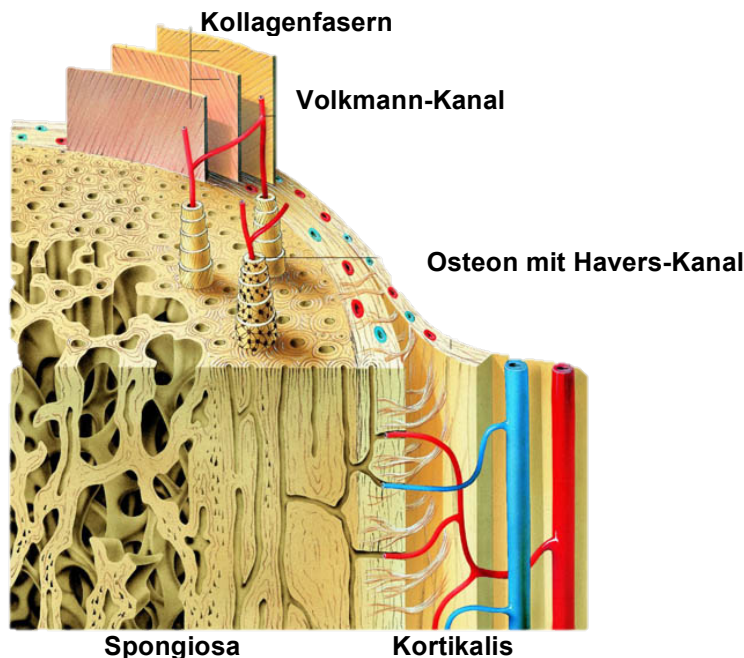
1.1. Aufbau des Knochengewebes

Knochengewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe, das einen Teil des Bewegungsapparats bildet und einen wichtigen Bestandteil der Stützfunktion übernimmt. Wegen seines trajektorialen Systems von Kollagenfibrillen zeichnet sich Knochengewebe durch mäßige Elastizität und Zugfestigkeit aus. (Kugler et al. 2001)

Die äußere Oberfläche des Knochens bedeckt das gefäß- und nervenfaserreiche Periost. Makroskopisch lassen sich kompakte und spongiöse Anteile unterscheiden. Die Kompakta (Substantia corticalis) ist die äußere Schicht eines Knochens, die für die Stützfunktion verantwortlich ist und aus konzentrisch angeordneten Lamellen besteht. Zur Versorgung des Knochens mit Nährstoffen und Sauerstoff dient ein eigenes Gefäßsystem, das die Lamellen (Osteone) durchsetzt. Das Osteon ist konzentrisch um ein zentrales Gefäß, dem Haversschen Kanal angeordnet. (Welsch 2003) Die Blutversorgung und Reizleitung der Osteone untereinander erfolgt über seitliche Volkmannkanäle (Hees und Sinowatz 2000, Liebich 2004), wie Abbildung 1

schematisch zeigt. Die Kortikalis geht direkt in die Spongiosa über, deren Trabekel sich parallel zur größten Druck- und Biegebeanspruchung ausrichten. (Welsch 2003) Der Hohlraum zwischen der Substantia spongiosa bildet die Markräume (Cavum medullare), die Ort der Blutbildung sind. Die Innenseite des Knochens wird von platten Zellen mit osteogener Funktion, dem Endost, ausgekleidet. (Katagiri und Takahashi 2002)

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Lamellenknochens (Brockhaus scholaris intensiv lernen Biologie, Hrsg. Uwe Deppe, 2013)



Molekularbiologisch lassen sich im Knochengewebe eine anorganische von einer organischen Substanz unterscheiden. Die Knochenbestandteile sind zu 70% anorganischen und zu 20% organischen Ursprungs, außerdem ist im Knochen 10% Wasser als intraossäre Flüssigkeit enthalten. (Welsch 2003) Der anorganische Anteil der Knochenmatrix setzt sich überwiegend aus kristallinem Hydroxylapatit (~ 89%), Carbonaten (~ 6%) und Nitraten (~ 5%) zusammen, auch Phosphate und Fluoride liegen in geringen Mengen vor. (Welsch 2003, Bonjour 2011) Die Apatitbildung läuft über amorphes - (ACP - amorphous calcium phosphate) und octa - Hydroxylapatit (OCP - octacalcium phosphate), die bei der Osteogenese leichter präzipieren. Das Hydroxylapatit stellt eine Austauschoberfläche für andere Stoffe dar, z.B. bildet es einen schwerlöslichen Chelatkomplex mit Tetracyclin. Diese Eigenschaft macht man sich in der Fluoreszenzmikroskopie zunutze. (Marx und Garg 1998, Murshed et al. 2005) Der organische Anteil wird zu 95% vom Kollagen Typ I gebildet, die restlichen 5% machen

Proteoglycane und andere nicht-kollagene Proteine aus, wie Osteonectin, Osteopontin und Osteocalcin. (Boskey und Posner 1984) Zusätzlich zur organischen Matrix finden sich im organischen Anteil die Knochenzellen. Diese sind Osteoblasten (~ 15%), Osteozyten (~ 85%), Osteoklasten (~ 0,5%) und Knochenbelegzellen (~ 0,1%).

Osteoblasten sind differenzierte postproliferativ aktive Zellen mesenchymalen Ursprungs an der Knochenoberfläche von Wachstums- und Anbauzonen. Sie produzieren das Osteoid und führen zur Mineralisierung des Knochens mittels BAP (bone alkaline phosphatase). Außerdem enthalten sie die BMP's (bone morphogenetic proteins). Diese nehmen Einfluss auf die Osteoinduktion und besitzen die Fähigkeit die Knochendifferenzierung zu stimulieren. (Urist 1965) Sie regulieren demzufolge Knochenumbau (Resorption), -heilung und dessen Bildung. (Lind 1996, Marx und Grag 1998, Henriksen et al. 2009)

Osteozyten sind in die Knochenmatrix eingemauerte reife Knochenzellen und liegen abgeflacht in Lakunen lamellären Knochens. Sie regulieren den Metabolismus und die Ernährung des Knochens mittels aerober Glykolyse und sind am Hydroxylapatitaaustausch mit dem Blutplasma beteiligt. (Liebich 2004) Sie nehmen Einfluss auf den Phosphatstoffwechsel und besitzen lange dendritische Zellausläufer mit Mechanorezeptoren, die innerhalb eines Osteons ein Synzytium bilden und über gap junctions eine interzelluläre Signalübertragung ermöglichen. (Bonewald 2011)

Osteoklasten sind große mehrkernige Zellen des monozytären Phagozytensystems, deren Bildung durch Östrogen und Calcitonin gehemmt und durch Parathormon aktiviert wird. (Garg 2006) Reguliert wird dieser Vorgang durch den intrazellulären Calciumspiegel. Die Zellen bauen die kalzifizierte Knochenmatrix unter Phagozytose und TRAP (tetrat-resistant acid phosphatase) ab und es bildet sich durch Resorption von Knochen innerhalb von 1-2 Wochen eine Erosionslakune (Howshipsche Lakune). (Marks 1983) Die wellige Zelloberfläche (ruffled border) ist Ort der Resorption, die helle Zone (clear zone) dient der Bindung der Osteoklasten an den Knochen. (Watanabe et al. 1995)

Knochenbelegzellen (lining cells) sind flache Zellstrukturen, sie liegen einem schmalen Band nicht mineralisierter Filamente und Kollagenfasern auf. Sie stehen über gap junctions mit Osteozyten und Osteoblasten in Verbindung. (Miller und Jee 1987) Dadurch sind sie an Umbauvorgängen nach mechanischer Belastung beteiligt. Sie bilden eine Membran auf der Knochenoberfläche, die die intraossäre Flüssigkeit (bone fluid) von der Flüssigkeit im Interstitium des Knochenmarks trennt. (Canas et al. 1969) Ihnen wird auch die Fähigkeit zur Regulation des Mineralstoffwechsels und der Hämatopoese zugesprochen. (Calvi et al. 2003)

1.2. Osteogenese

Ossifikation ist der Vorgang der Bildung von Knochengewebe, der immer gleich verläuft: Osteoblasten produzieren das Osteoid, das mineralisiert wird. Man unterscheidet grundsätzlich die primäre von der sekundären Ossifikation. Die erstmalige Bildung von Knochen wird als primäre Ossifikation gesehen, es entsteht Geflechtknochen. Die sekundäre Ossifikation beschreibt die Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen. (Noble und Reeve 2000, Liebich 2004)

Die Osteogenese beschreibt die individuelle Entstehung von Knochen innerhalb der Embryogenese, diese kann auf zwei Arten erfolgen: desmal (direkt) und chondral (indirekt). Zwei Formen der chondralen Ossifikation sind zu unterscheiden: die peri- und die enchondrale Ossifikation.

- desmale Ossifikation

Durch Anlagerung von Apatit an ein Osteoid entsteht aus embryonalem Bindegewebe Geflechtknochen. Mesenchymzellen differenzieren sich dadurch zuerst zu Vorläuferzellen und schließlich zu Osteoblasten. (Franz-Odendaal 2011) Diese Art der Knochenbildung ist im Viscerocranium, der Mandibula, der Maxilla und im Bereich der Claviculae zu finden. (Welsch 2003, Amir et al. 2006)

- chondrale Ossifikation

Eine knorpelig vorgebildete Knochenanlage wird knöchern ersetzt. Auf diese Weise entstehen Knochen des Ileums, der Vertebrae oder die Knochen der Extremitäten. (Grimes et al. 2011, Ignatius et al. 2011)

- perichondrale Ossifikation

Dabei erfolgt die Verknöcherung von außen, indem sich eine Manschette um die Diaphyse eines Röhrenknochens legt, beginnend in der Schaftmitte. Der Knorpel induziert eine Knochenbildung. Das Perichondrium wird zum Periost, der Knorpel wird durch das primäre Knochenmark ersetzt.

- enchondrale Ossifikation

Die Ossifikation erfolgt von innen, im Bereich der Epiphysen und in kurzen Knochen. Es kommt zur Gefäßeinsprossung und Umwandlung der Mesenchymzellen zu Chondroklasten. (Löffler et al.1997) Liegen die hyalinen Knorpelzellen parallel und längs der Achse (Reservezone), teilen sie sich in eine Zone des säulenförmigen

Knorpels (Proliferationszone). Der nun hypertrophe Knorpel (Blasenknorpel) lagert Glycogen ein (Resorptionszone) und in der Verknöcherungs- bzw. Eröffnungszone verkalken die interzellulären Septen und werden zur Primärpongiosa und der Wachstumsprozess beginnt; Wachstum bedeutet in diesem Zusammenhang ein Zerreißen der Vesikelmembran. (Kugler et al. 2001) Ossifikation und Epiphysenfugen dienen dem Längenwachstum, Apposition mit einer Knochenabbauzone dem Dickenwachstum.

1.3. Knochenumbau

Durch funktionelles Anpassen an wechselnde äußere Belastungen wird Knochen umgebaut. Der Umbau ist außerdem zuständig für das Konstanthalten des Serumspiegels von Calcium und Phosphat. Er ermöglicht ein Reparieren von Mikrotraumen und beugt damit einer Materialermüdung vor. Jährlich werden zwischen 4 und 10% des gesamten Knochens umgebaut. (Hadji et al. 2002) Die Umbaurate der Substantia spongiosa ist mit 25 - 28% deutlich höher als die der Substantia compacta (2,5 - 4%). (Lüllmann-Rauch 2003, Bartl 2008) Knochenumbau beschreibt dabei das selektive Anbauen durch Osteoblasten und die Resorption mittels Osteoklasten während des Wachstumsprozesses, beides findet nie an gleicher Stelle statt. Das Wolffsche Gesetz besagt, dass sich unter Belastung Knochen aufbaut und an Festigkeit zunimmt, während er sich abbaut, wenn er wenig belastet wird. (Wolff 1892) Wolff erkannte bei seinen Untersuchungen an Femurköpfen den physikalischen Effekt, dass sich die Trabekelstrukturen entlang der Wirkung der mechanischen Kräfte ausrichten. Knochenveränderung beruht demnach auf wirkenden Kräften und folgt den muskuloskelettalen Beanspruchungen. (Wolff 1892) Pathologische Prozesse und Anpassung an mechanische Belastungen werden durch Knochenneuf ormation im adulten Organismus verändert. Während der Umbau entweder aus Aktivierung und Resorption oder aus Aktivierung und Formation zusammengesetzt ist, besteht der Remodelingprozess aus allen drei Formen der Veränderung (Aktivierung, Resorption und Formation). Demnach kann an Stellen resorbierten Knochens auch wieder neuer Knochen gebildet werden. Beim Umbau in kortikalen Knochen bilden Osteoklasten einen Resorptionstunnel (cutting cone), der von Osteoblasten aufgefüllt wird (closing cone) und ein neues Osteon entstehen lässt, in spongiösem Knochen findet eine Rinnenbildung statt und es entsteht nach Knochenauffüllung ein Hemi-Osteon.

Coupling, das Bilden einer Einheit von Osteoblasten und Osteoklasten, garantiert ein stetes Ersetzen von abgetragenen Knochen. (Parfitt 1979, 1994, 2000) Obwohl der Aufbau und die Zellstruktur des Alveolarknochens generell denen anderer Knochengewebe entsprechen (MacMillan 1924), ist es notwendig ihn gesondert zu beschreiben, um die physiologischen Eigenschaften und die daraus resultierenden Folgen zu erläutern.

1.4. Aufbau des Alveolarknochens

Der Alveolarknochen besteht aufgrund der unterschiedlichen mastikatorischen Belastung der einzelnen Bereiche zu verschiedenen Anteilen aus Spongiosa und periostbedeckter Kompakta, oral zeigt sich meist eine dickere Kompakta als vestibulär. (Schröder 1986) Das Periost des Alveolarknochens besteht aus einer Faserschicht (Stratum fibrosum) und einer Cambriumschicht (Stratum osteogenicum), zwischen ihnen verlaufen Sharpeysche Fasern. (Schröder 1982) Bündelknochen bildet den kortikalen Anteil der Alveoleninnenseite der natürlichen Zahnfächer (Araujo und Lindhe 2005), die von der Lamina cribriformis ausgekleidet sind und durch ihre löchrige Struktur ein Einstrahlen von desmodontalen Fasern bis in die Markräume ermöglichen. Der nach Zahnextraktionen auftretende Knochenrückgang ist unter anderem von Atwood klinisch und tierexperimentell mit dem Ziel der histologisch nachzuvollziehenden Resorptionsmechanismen untersucht worden. Er konnte zeigen, dass der Verlust der Desmodontalfasern in diesem Zusammenhang eine zentrale Bedeutung hat. (Atwood 1971, Araujo et al. 2005) Aufgrund der fehlenden Funktion resorbieren diese Fasern, das zieht eine Resorption des Bündelknochens nach sich. Dieser Umbau bedeutet vor allem für die marginalen Bereiche der Alveole einen kompletten Masseverlust, da diese fast ausschließlich aus Bündelknochen bestehen.

Ziel ist es, diese physiologische Volumenreduktion zu kompensieren. Dafür stehen in der oralen Chirurgie verschiedene Augmentationsmaterialien zur Verfügung, die im nächsten Kapitel beschrieben werden.

1.5. Augmentationsmaterialien

Augmentationsmaterialien in der Idealvorstellung sollten zunächst in den ortsständigen Knochen integriert, nach Funktionserfüllung abgebaut und in körpereigenen Knochen umgewandelt werden. Neben dem Auffüllen des Defektes müssen eine

Revaskularisierung und eine adäquate Resorptionsstabilität gewährleistet sein. (Boyne 1973, Wagner und Al Nawas 2004) Zusätzlich wird eine nicht antigene Wirkung gefordert, um eine infektiöse, kanzerogene, teratogene und allergische Reaktion auf das Ersatzmaterial sicher ausschließen zu können. Das Material sollte sich an den Komponenten der physiologischen Knochenregeneration orientieren: (Laurencin et al. 2006) an der osteogenen Komponente, als Fähigkeit Knochen zu bilden, der osteokonduktiven Komponente, die Knochenwachstum entlang einer Leitschiene ermöglicht und der osteoinduktiven Komponente, die eine Bildung von Knochengewebe induziert. (Albrektsson und Johansson 2001) Verwendung und Einsatz sowohl knöcherner als auch synthetischer Materialien zur Deckung von Knochendefekten haben eine weitreichende Tradition, die bis in das 16. Jahrhundert dokumentiert ist. (Lindqvist et al. 1985, Prolo und Rodrigo 1985) Fallopius (1523 - 1562) hielt seine Rekonstruktionsversuche mit Gold erstmals schriftlich fest. (Sailer und Weber 2000) Mitte des 19. Jahrhunderts begannen Forschungen um Knochenersatzmaterialien. Ollier veröffentlichte in seinem Werk über Knochenregeneration die Grundlagen der Transplantationsmedizin, die er tierexperimentell ermittelte. Er schlussfolgerte aus seinen Ergebnissen, dass eine Vitalität des transplantierten Knochens vorliegt. Er prägte die noch heute verwendete immunologische Einteilung der Materialien nach ihrer Herkunft in autolog, allogene, xenogene und alloplastisch. (Ollier 1867)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Anwendungsbeispiele</i>
autolog/autogen	vom selben Individuum	Zahn-, Knorpel-, Knochentransplantate
isogen	vom genetisch identischen Individuum	Zahn-, Knorpel-, Knochentransplantate
allogene/homolog	von derselben Spezies	Lyoknochen, Lyoknorpel, DFDBA*, AAA-Bone**
xenogene/heterolog	von anderer Spezies	Hydroxylapatit, Kollagen, Kalziumkarbonat
alloplastisch	synthetisch oder halb-synthetisch	Hydroxylapatit, β -Trikalziumphosphate, Biogläser

*DFDBA = demineralized freeze-dried bone allograft

**AAA-Bone = autolysierter antigenextrahierter allogener Knochen

Tabelle 1: Einteilung gängiger Augmentationsmaterialien zum Knochenaufbau (Wagner und Al Nawas 2004)

Unabhängig voneinander führten Barth und Curtis histologische Untersuchungen an Knochenimplantaten durch, mit der Erkenntnis, dass transplantierte Knochenelemente verloren gehen und lediglich eine Leitschiene für den neugebildeten Knochen darstellen. Barth prägte damit den Begriff *schleichender Ersatz*. Er sprach sich entschieden gegen eine qualitative Unterteilung der autologen, allogenen und xenogenen Knochenersatzmaterialien (KEM) aus. (Curtis 1893, Barth 1893 und 1895, Wagner und Al Nawas 2004) Axhausen und Lexer führten Barths Arbeit weiter und konnten zeigen, dass die Knochenneubildung sogar vom Transplantat selbst ausgehen kann. (Axhausen 1907, Lexer 1925) Mittels histologischer Untersuchungen zeigten sie, dass autologe Transplantate den allogenen überlegen sind und xenogene Transplante ihnen gegenüber keine regenerative Potenz besitzen.

1.5.1. Augmentationsmaterialien: autolog/autogen

Dr. Philipp Franz von Walther (Chirurg und Augenarzt) transplantierte als erster 1821 autologes Spendermaterial, das er bei einer Schädelreparation gewann. (von Walther 1821) Die Anwendung im Bereich des Gesichtsschädels, wie Kieferrekonstruktionen, wurde erst in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben und durchgeführt. (Lexer 1924) Die Knochenregeneration erfolgt durch zellvermittelte Osteogenese, hinzu kommen die osteoinduktiven und die osteokonduktiven Eigenschaften. Auf Grund dessen gilt die autologe Defektdeckung besonders bei großvolumigen Defekten heute noch als der „Goldstandard“ unter den Augmentationsmaterialien in der Zahnmedizin (Garofalo 2007), außerdem zeigt er eine hohe Biokompatibilität. (Klinge et al. 2000) Immunologische Reaktionen durch Antigene sind ausgeschlossen, da Spender und Empfänger identisch sind. (Misch und Dietsch 1993, Müller 2005) Mögliche intraorale Entnahmestellen sind Tuber, Kinn, Linea obliqua und Retromolarregion. In diesen Bereichen ist das Knochenangebot begrenzt, sodass größere benötigte Volumina extraoral aus dem Ileum, der Fibula, der Scapula oder der Tibia gewonnen werden können. Nachteilig bei der Verwendung von autologen Transplantaten sind die zusätzliche Entnahmemorbidity mit möglichen Komplikationen sowie die zeitbedingte Resorptionstendenz (Khoury 1994, Garofalo 2007, Sbordone et al. 2011), weshalb alternative Ersatzmaterialien in der Literatur diskutiert werden.

1.5.2. Augmentationsmaterialien: allogene/homolog

Allogene Knochenersatzmaterialien sind humanen Ursprungs, aber genetisch nicht identisch. MacEwen führte 1881 in Glasgow die erste erfolgreiche allogene Knochentransplantation zur Wiederherstellung eines Humerus durch. (MacEwen 1881, de Boer 1989, Gross et al. 1993) Das Material wird u.a. durch Mechanismen der Kryokonservierung, Lyophilisation und Deproteinisierung aufbereitet. Immunreaktionen können aufgrund der unterschiedlich antigenen Eigenschaften unter anderem an einer Übertragung von Infektionen beteiligt sein oder sogar zu einer Abstoßung des Augmentates führen. Allogener Knochen wird aus Knochenbanken von humanen Spendern bezogen, die ethische Komponente ist also kritisch zu hinterfragen. (Glass et al. 2008) Die Knochenneubildung folgt der Osteokonduktion, dabei dient das Transplantat als Leitschiene für den neu zu bildenden Knochen und durch die Platzhalterfunktion wird das Einwandern von knochenbildenden Zellen im Bereich des Defektes gefördert. (Aukhil et al. 1986) Die ausreichende Verfügbarkeit des Materials und die Vermeidung der Entnahmemorbidität sind entscheidende Vorteile allogener Materialien.

1.5.3. Augmentationsmaterialien: xenogene/heterolog

Xenogene Knochenersatzmaterialien sind tierischen Ursprungs. Der Chirurg Job Janszoon van Meekeren aus Amsterdam führte die erste erfolgreiche xenogene Knochentransplantation bei einem russischen Soldaten mit caninem Ersatzmaterial durch. (van Meekeren 1668) Xenogene Transplantate sind unbegrenzt verfügbar und weisen keine Morbidität der Entnahmestelle auf. Sie werden aus Individuen verschiedener Spezies, meist porcine (Schwein) oder bovine (Rind), gewonnen, weshalb die Möglichkeit einer hyperakuten, vaskulären oder zellvermittelten Abstoßungsreaktion in Betracht gezogen werden muss. (Lin et al. 2000) Laut Stellungnahme der DGZMK 2006 ist das xenogene Material aus bovinem Knochen BioOss[®] (Biomaterial - Geistlich, Baden-Baden, Deutschland) im Einsatz in der Zahnmedizin als unbedenklich eingestuft worden. (Becker und Terheyden 2006) Weitere Materialien xenogener Herkunft sind Algen (z.B. Frios Algipore[®], Friadent, Mannheim, Deutschland) und Korallen (z.B. Biocoral[®], Inoteb, St. Gonnery, Frankreich). Durch Autoklavierung, Lyophilisierung, Sterilisierung und Deproteinisierung erfolgt die Aufbereitung dieser Materialien. Das

Bereitstellen einer porösen Leitstruktur bildet die reparative Potenz im Sinne der Osteokonduktion. (Parikh 2002)

1.5.4. Augmentationsmaterialien: alloplastisch

Alloplastische Transplantate werden synthetisch oder halbsynthetisch hergestellt, einige Vertreter sind β -Trikalziumphosphat-Keramiken (Cerasorb®) und Hydroxylapatit. Die synthetischen Materialien verfügen über definierte physio- und kristallochemische Eigenschaften und einen hohen Reinheitsgrad. (Horch et al. 2006) Sie sind druckstabil, werden nach Angaben einiger Autoren langsam und im Idealfall vollständig, gleichmäßig und parallel zur körpereigener Knochenbildung in situ remodelliert. (Taylor et al. 2002, Baumgarten 2009) Die Fähigkeit der Resorption ermöglicht den schleichenden Ersatz bei gleichzeitigem Erhalt der Stabilität. Die osteokonduktive Eigenschaft wird in Kombination mit einer geeigneten Porenstruktur zwischen 100 und 125 μm erreicht. (Merten et al. 2001) Bei diesen Transplantaten kann das Übertragung von Infektionskrankheiten und das damit assoziierte immunologische Restrisiko aufgrund antigener Eigenschaft systematisch ausgeschlossen werden. (Knaepler et al. 1992, Stevenson et al. 1996)

1.6. Augmentationsverfahren

Kieferkammdefekte, die durch Extraktion, Trauma oder Atrophie entstehen, können durch verschiedene Techniken wieder rekonstruiert werden. Sie werden unterteilt in non-additive und additive Verfahren. Non-additive Verfahren zur Rekonstruktion der Kieferkammdefekte sind unter anderem:

- Distraktionsosteoplastik
- Bone-splitting-Technik

Die Distraktionsosteoplastik beruht auf der mechanischen Verlängerung des Knochens. Dazu wird der ortständige Knochen horizontal segmentiert und dann Distraktoren unter Erhalt der Periostabdeckung eingesetzt. In bestimmten Zeitintervallen wird der Distraktor aktiviert. Dabei werden die Segmente weiter unter der bestehenden Weichteilabdeckung voneinander bis zu einer gewünschten Höhe separiert, so dass im Segmentpalt ein Kallus entstehen kann. Dieser wird dann im weiteren Zeitverlauf zu Geflecht- und später Lamellenknochen umorganisiert. (McAllister und Haghghat 2007)

Diese Technik ist aufwendig und bedarf eine individuelle Planung und eine längere Behandlungszeit. Es erfordert Motivation und Mitarbeit des Patienten, aber eine Knochenentnahme entfällt. Ein Zugewinn an Weichgewebe ist beschrieben worden. (Gaggl 2002)

Bei der Bone-splitting-Technik erfolgt eine segmentale lamelläre Osteotomie des Alveolarkamms durch vertikale Augmentation zur Verbreiterung des Kieferkamms. Diese Extentionsplastik wurde erstmals von Osborn beschrieben. (Osborn 1985) Diese Technik wurde weiterentwickelt: Khoury verwendete autologes Material und modifizierte das Verfahren. (Khoury 1987) Summers, Nentwig und Streckbein entwickelten non-ablative Knochenspreizer, die eine primäre Implantation mit der Kombination der Bone-splitting-Technik ermöglichen. (Summers 1994, Nentwig 1996, Streckbein 1997)

Zu den chirurgischen Standardverfahren der additiven Rekonstruktion des Kieferkamms zählen nach Kessler et al. (2004):

- LeFort I-Osteotomie mit Einlagerungsplastik
- Sinusbodenelevation
- Onlay-Technik autologer Blocktransplantate

Das Verfahren der LeFort I-Osteotomie mit Einlagerungsplastik wurde erstmals von Bell und McBride beschrieben und dient dem Ausgleich der vertikalen Relation zwischen beiden Kiefern. (Bell und McBride 1977) Da im atrophierten Kiefer auch das Gaumengewölbe abflacht, wurde diese Operationstechnik modifiziert, um auch in diesem Bereich eine Korrektur vornehmen zu können. (Neukam et al. 1989, Sailer 1989)

Im Oberkiefer kann durch Zahnverlust im Seitenzahnbereich und dadurch fehlender Belastung die Pneumatisierung der Kieferhöhle fortschreiten, in Folge dessen sich der Kieferhöhlenboden absenkt. Daraus kann eine nur noch dünne Knochenlamelle resultieren, die die Begrenzung zur Kieferhöhle bildet. Um diese Region dennoch als Implantatlager zu nutzen, hat sich die Sinusbodenelevation (SBEA) durchgesetzt. (Jensen et al. 1994, Shulman und Jensen 1998, Neukam und Schultze-Mosgau 2004)

Augmentationen zur Rekonstruktion der atrophierten Maxilla im Onlay-Verfahren mit autologem Beckenkamm wurden zunächst als Monotherapie-Verfahren angewendet. (Brånemark et al. 1975) Ziel dabei ist die Wiederherstellung des atrophierten Alveolarkamms in horizontaler und vertikaler Dimension. Entsprechend der

Ausdehnung des Defektes wird dabei ein autologer kortikospongiöser Knochenblock z.B. aus dem Ileum entfernt, modelliert und in den Kieferkammdefekt eingebracht und mit Mikroschrauben befestigt. (McAllister und Haghghat 2007) Aufgrund der beobachteten hohen Resorptionstendenzen wurde nach Möglichkeiten gesucht, eine langfristige Stabilisierung dieser Volumenerweiterung zu erzielen. Die simultane Verwendung autologer Transplantate mit enossalen Implantaten schien Erfolg versprechend. (Cranin et al. 1988) Auftretende Dehiszenzen forderten das operative Management zu überdenken. (Misch und Dietsh 1994) Neben Qualität (kortikaler Anteil des autologen Transplantates) und Quantität, scheint der Implantationszeitpunkt Einfluss auf die Resorption und die Knochenneubildung auszuüben. (Kahnberg und Vannes-Löfquist 2005, Mertens et al. 2012) Ein zweizeitiges operatives Verfahren mit Einheilzeiten von 3 Monaten vor Implantatinsertion nach Beckenkammtransplantation wird gegenwärtig bevorzugt. (Umstadt et al. 1999, Nelson et al. 2006, Heberer et al. 2008) Um dieses Vorgehen erklären zu können, werden im Folgenden die Mechanismen der Augmentateinheilung näher erläutert.

1.7. Mechanismen der Augmentateinheilung

Augmentationen dienen der Volumenvergrößerung und werden als enossale Heilung bezeichnet. Bei der direkten (primären) Frakturheilung wird das Granulationsgewebe, das aus dem ursprünglichen Thrombus entsteht, mit Geflechtknochen durchsetzt und ohne Kallusbildung durch längsaxial angeordnete Osteone ersetzt (Spaltheilung). (Schenk und Buser 1998, Gerstenfeld et al. 2003) Die Heilung nach chirurgischen Eingriffen verhält sich anders. Am Augmentat finden Resorptionen des nekrotischen komprimierten Materials statt sowie eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie BMP, IGF-1 und FGF, die die Knochenbildung stimulieren. Dieser als Osteoinduktion bezeichnete Effekt dauert etwa einen Monat. Hier tritt das stärkste Wachstum in der ersten Woche auf, da die Angiogenese drei Tage nach der Augmentation eintritt. (Marx et al. 1998, Garg 2006) Die Angiogenese wird begleitet von einer Entzündungsreaktion bedingt durch das Einwandern von Makrophagen und Osteoklasten. Durch Gefäßeinsprossung, Resorption und Apposition wird der transplantierte Knochen durch neu gebildeten Knochen ersetzt, dieser Vorgang wird als schleicher Ersatz bezeichnet (creeping substitution). (Albrektsson und Johansson 2001) Gefäße des Periosts und der Haversschen Kanäle sprießen in die Markräume

des Transplantates ein. Proteinkomplexe, die an das Transplantat binden, induzieren vitale mesenchymale Zellen sich zu Osteoblasten zu differenzieren. Auf diese Weise wird das Transplantat von außen nach innen durch neu gebildeten Knochen ersetzt. (Burkhardt 1983) Das entstehende Blutkoagulum wird durch das vorhandene Periost stabilisiert. (Araujo und Lindhe 2005) Bei der Osteokonduktion dient das Transplantat als Leitschiene für den Knochen. Bedingt durch die Blutgerinnungskaskade kontrahiert das Fibrinnetz und Fibrinogen lässt aus Thrombin Fibrin entstehen. (Walter 1976) Alle drei Formen des Einheilens sind ausschließlich bei autologen Knochentransplantaten vorhanden. (Albrektsson und Johansson 2001) Je nach Herkunft werden kortikospongiose (z.B. Ileum) oder kortikale (z.B. Fibula) Transplantate verwendet. (Kübler 1997) Es ist gezeigt worden, dass die kortikale Dicke und Dichte die Resorptionstendenz beeinflussen. (Lundgren et al. 1996) Dabei spielt die embryonale Herkunft eine untergeordnete Rolle. (Ozaki und Buchman 1998) Um Resorptionen entgegenzuwirken, muss der transplantierte Knochen belastet werden, aus diesem Grund ist eine zeitnahe Versorgung mit Implantaten anzustreben. Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben eine von der Defektgröße und den verwendeten Knochenersatzmaterialien abhängigen Einheilzeit, diese variierten von 3 bis 15 Monaten. (Neukam et al. 1989, Neukam und Schultze-Mosgau 2004) In einer Tierstudie von Shirota et al. an Unterkiefern im Kaninchenmodell zeigten autologe Beckenkammtransplantate nach dreimonatiger Einheilzeit ein stabiles, vitales Knochenlager für Implantate und das günstigste Verhältnis zwischen Knochenneuf ormation und Knochenresorption bezogen auf die untersuchten Zeiträume von 7, 14, 30, 60, 90 und 180 Tagen. (Shirota et al. 1991) Nelson et al. beschrieben als erste Arbeitsgruppe den Implantationszeitpunkt nach drei Monaten in humanen Studien und beurteilten ihn als guten Kompromiss zwischen Knochenneubildung und dem Resorptionsbeginn. (Nelson et al. 2006, Heberer et al. 2008) Die Kongruenz zum Knochenlager ist genauso wichtig wie die Stabilisierung des Augmentates mit Osteosynthesematerial (Osteosyntheseschrauben, -platten etc.) oder als präprothetische Versorgungsvariante zusammen mit Implantaten. Größere Defekte durch Resorptionen oder Traumata können auf diese Weise kompensiert werden. Nkenke et al. untersuchten in humanen Studien die Bedeutung intraoperativer Stabilisierung von kortikospongiosen Knochenblöcken. Es konnte herausgearbeitet werden, dass eine optimale Befestigung am ortsständigen Knochen die Resorption der Transplantate um zwei Drittel verringert. (Phillips und Rahn 1988, Nkenke et al. 2001) Autologer

kortikospongiöser Beckenkammknochen zeigte in Kaninchen-Studien bei unbelasteter Einheilung je nach kortikalem Anteil eine Resorption von bis zu 68%. (Chen und Glowaki 1994) In Studien von Alonso und Machado de Almeida wurde die Hypothese aufgestellt, dass augmentierter membranöser Knochen geringere Resorptionstendenzen hat als enchondraler. Des Weiteren wird die Resorptionsrate weiter reduziert, wenn das Transplantat mechanisch belastet wird. (Alonso und Machado de Almeida 1995) Ozaki et al. beschrieben in ihren Studien den Knochentyp und nicht deren Herkunft als Ursache unterschiedlicher Resorptionsraten, ein höherer kortikaler Anteil des Knochens zeigte geringere Resorptionen unabhängig vom Entnahmeort als spongiöser Knochen. (Ozaki et al. 1998) Zur Minimierung der Resorptionstendenz werden der Einsatz von Membranen und die Verfahren der gesteuerten Gewebe- bzw. Knochenregeneration (GBR und GTR) in der Literatur diskutiert. (Camargo und Lekovic 2000, Taguchi et al. 2005)

1.8. Einsatz von Membranen in der Zahnmedizin

Erstmals wurde die gesteuerte Knochenregeneration mit Membranen 1959 zur Ausheilung von Wirbelfrakturen eingesetzt. (Hurley et al. 1959) Die guided tissue regeneration (GTR) zielt auf den Erhalt und die Regeneration des gesamten Parodontiums (Alveolarknochen, Wurzelzement und parodontales Gewebe) ab, während sich die guided bone regeneration (GBR) auf die Förderung der Knochenneuf ormation beschränkt. (McAllister und Haghghat 2007) Die synthetischen Membranen erzeugen eine Barriere zur Verschiebung der Konkurrenz zwischen verschiedenen Gewebearten mit dem Ziel einer knöchernen Regeneration. (Reichart et al. 2001) Beide Verfahren folgen dem gleichen Prinzip. (Nyman et al. 1982) Sie dienen unter anderem der Abdeckung und dem Schutz von Implantaten bzw. Augmentaten, dem Verschluss des Sinusbodens oder dem Auffüllen von Knochendefekten. (Schwarz et al. 2006a) In diesem Zusammenhang dienen sie der Stabilisierung des Blutkoagulums. Eine dichte Membranadaptation ist entscheidend für eine komplikationsfreie primäre Wundheilung. (Zitzmann et al. 2001) Dimensionsverluste am Alveolarknochen und dem umliegenden Weichgewebe konnten mit diesem Verfahren reduziert werden. (Nevins et al. 2006, Fickl et al. 2008) Zu den wichtigsten Anforderungen, die an eine Membran gestellt werden, zählen Biokompatibilität, Gewebeintegration und Bioadhäsion. (Haney et al. 1993) Ein vorhandener

Knochendefekt wird mit einer Membran abgedeckt, damit er langsam knöchern regenerieren kann, während die rasch proliferierenden gingivalen Bindegewebszellen aus diesem Hohlraum ausgeschlossen werden. (Hämmerle et al. 1998) Nach einem Knochenverlust im Bereich des Kieferknochens stellt die gesteuerte Knochenregeneration (GBR - guided bone regeneration) mit Membranen eine Möglichkeit der Therapie dar und kann mit oder ohne Augmentation von Knochenersatzmaterial (in Kapitel 1.6. aufgeführt) erfolgen. (Buser et al. 1993) Die funktionelle Inanspruchnahme des transplantierten Knochens hat entscheidenden Einfluss auf die Knochentransformation. (Roux 1895)

Hardwick postulierte die vier wesentlichen Ziele einer erfolgreichen GBR: Ausschluss von Zellen, hauptsächlich Bindegewebszellen, Raumschaffung und Raumerhalt, damit die Knochenzellen einwachsen können, Schutz des Blutgerinnsels und Stabilisierung der Wunde. (Hardwick et al. 1994)

Heute werden zur gesteuerten Knochenregeneration nicht resorbierbare Membranen aus Polytetrafluorethylen (ePTFE z.B. Gore-Tex[®], Gore, Putzbrunn, Deutschland), Titanfolien (FriosR BoneShield[®], Friadent, Mannheim, Deutschland) und resorbierbare Membranen synthetischer (Polyactide und Polyglykolyde z.B. Epi-Guide[®], Curasan, Kleinostheim, Deutschland) oder xenogener (Kollagen z.B. Bio-Gide[®], Geistlich, Baden-Baden, Deutschland) Herkunft verwendet. Die nicht resorbierbaren Membranen haben den resorbierbaren gegenüber den Vorteil einer zeitlich unbegrenzten Barrierefunktion und damit dem von Hartwick geforderten Ausschluss von Bindegewebszellen. (Hardwick et al. 1994) Nachteilig ist, dass sie in einem zweiten Eingriff wieder entfernt werden müssen. Das operative Trauma kann zu unerwünschten Resorptionen führen. (Hämmerle und Lang 2001) In einer humanen Studie von Strietzel wurden resorbierbare und nicht resorbierbare Membranen untersucht. Bei Verwendung nicht resorbierbarer Membranen zur Defektdeckung wird eine Membranexposition in bis zu 44% beschrieben. (Strietzel 2001, McAllister und Haghghat 2007) Diese kann eine bakterielle Superinfektion nach sich ziehen (Buser et al. 1990), die trotz Desinfektion und antibiotischer Therapie zur Knochenresorption führen kann und teilweise auch eine Entfernung der Membran oder des gesamten Augmentates erforderlich macht. Werden resorbierbare Membranen verwendet, findet sich in 4 bis 15% eine Exposition, die durch Lokalbehandlung sekundär epithelisierten und abheilen, so dass ein Augmentatverlust

verhindert wurde. (Friedmann et al. 2011) Die Größe und Beschaffenheit des Defektes zeigte in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Expositionsrate im Vergleich der beiden Membranarten. (Strietzel 2001) Um diese Nachteile zu umgehen, ging die Entwicklung und Forschung vermehrt in Richtung der resorbierbaren Materialien. (Hutmacher et al. 1996) Nicht quervernetzte resorbierbare Membranen haben eine kürzere Standzeit. Bei der nativen Bio-Gide[®] - Membran liegt die zu erwartende Resorptionsdauer bei circa vier Wochen (Schwarz et al. 2006b), dadurch können Barrierefunktionen vor allem bei größeren Defekten nicht lange genug aufrechterhalten werden. (Brunel et al. 1996) Rothamel et al. diskutieren in Studien an Ratten die initiale Membranstabilität von vier Wochen gegenüber dem Zeitraum der Revaskularisierung von bis zu drei Monaten. (Rothamel et al. 2005)

In der Literatur werden in diesem Zusammenhang quervernetzte resorbierbare Materialien mit verlängerter Standzeit zwischen vier (Bio-Gide-Perio[®] - chemische Vernetzungsmethode) und 24 Wochen (Ossix[™] - Vernetzung durch Polysaccharidinsertion) diskutiert. (Rothamel et al. 2005, Schwarz et al. 2006b) Um die Standzeit der kollagenen Membranen zu verlängern und die Stabilität zu steigern, werden verschiedene Methoden zur Erzeugung einer Quervernetzung verwendet. Chemische, physikalische und enzymatische Verfahren stehen dafür zur Verfügung. (Bunyaratavej und Wang 2001) Die wenigen tierexperimentellen Untersuchungen zeigten, dass durch eine chemisch experimentelle Quervernetzung die Resorption langsamer und proportional zum Vernetzungsgrad erfolgt. Sie besitzen eine geringere Antigenität und günstigere Effekte auf die Koagulation bzw. die Wundheilung gegenüber anderen Vernetzungsmethoden z.B. mit Glutaraldehyd oder Polysacchariden. (Brunel et al. 1996, Rothamel et al. 2005, von Arx et al. 2005) Die Verwendung von Glutaraldehyd scheint einen beträchtlichen Einfluss auf die Biokompatibilität zu haben, während die Proliferation durch die Vernetzung mit Polysacchariden nicht negativ beeinflusst wurde. (Schwarz et al. 2004) Kollagen wird physiologisch durch enzymatische Spaltung mittels Proteasen und Kollagenasen metabolisiert. (Tatakis et al. 1999) Klinische Untersuchungen ergaben, dass natives und quervernetztes Kollagen zusätzlich durch polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen resorbiert wird. (Rothamel et al. 2005) Primäre Nachteile durch zu schnelle Degradation und vorzeitigen Verlust der Platzhalterfunktion könnten durch eine Erhöhung des Vernetzungsgrades der Kollagene in Membranen verbessert werden. (Hyder et al. 1992, Rothamel et al. 2005, Schwarz et

al. 2006b, Becker et al. 2009) Aussagekräftige Studien mit dieser Art von Membranen bei großvolumigen autologen Transplantationsmaßnahmen fehlen bis dato. Diese wären aber entscheidend, um mögliche positive Einflüsse auf Knochenneuerformationsraten und Resorptionstendenzen und damit stabile Langzeiterfolge bei Onlay-Graft Verfahren evaluieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im präklinischen Versuch im Tiermodell der Einsatz der Bio-Gide-Pro[®] - Kollagenmembran unter diesen Gesichtspunkten untersucht.

1.9. Tiermodell und Vergleich des Knochens

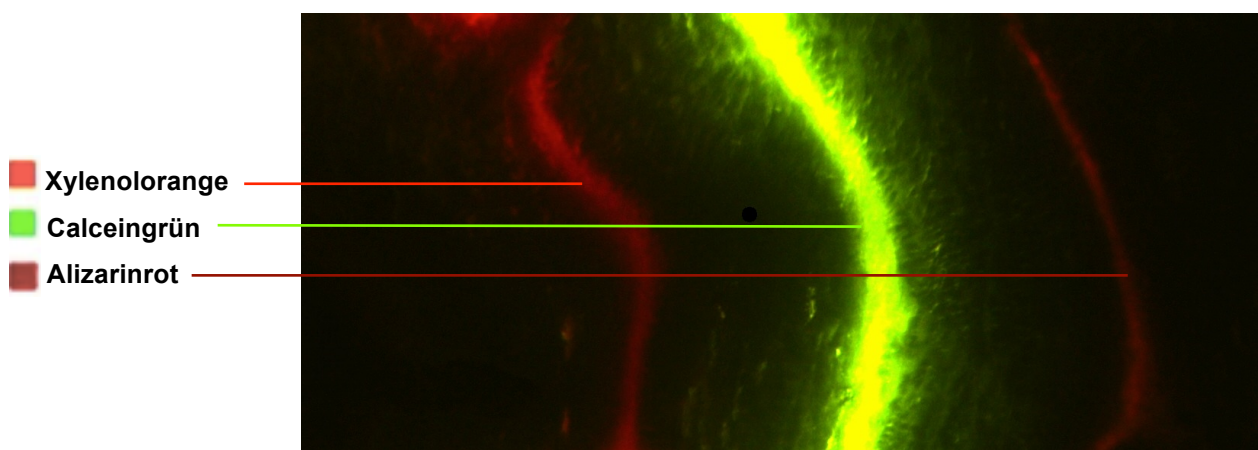
Es existiert kein einheitliches Tierversuchsmodell hinsichtlich der Erzeugung kraniofazialer Knochendefekte. Ratten zeigen kein Haverssches Remodeling und sind deswegen als Modell für Vorgänge im kortikalen Knochen ungeeignet, daher muss ein größeres Säugetier verwendet werden (Auszug aus dem Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bei dem zuständigen Landesamt)^{1°}. Die Verwendung des Göttinger Minischweins schien bei der geplanten Fragestellung sehr geeignet, da bei diesen Tieren genügend autologes Spendermaterial gewonnen werden kann und die Kiefergröße und -form ideal für die vorgesehene Setzung der Defekte ist. (Hale et al. 1991, Mosekilde 1995) Entstanden ist die sogenannte „white line“ des Göttinger Minischweins durch die Kombination des Temperaments und des Typs der Minnesota Minipig mit der Kleinwüchsigkeit und Fruchtbarkeit des vietnamesischen Hängebauchschweins. (Sambraus 2001) Die daraus entstandenen Nachkommen wurden mit der Deutschen Landrasse rückgekreuzt und aufgrund der Dominanz des weißen Erscheinungstyps als „white line“ bezeichnet. (Haring et al. 1967) Die Tiere zeichnen sich durch ihr ideales Verhältnis zwischen Körpergröße und -gewicht aus. Auch die Anzahl und die Qualität der Ohrvenen, die unkomplizierte Heilung sowie die Indolenz nach chirurgischen Eingriffen sind für die geplanten Eingriffe sehr geeignet. (Beglinger et al. 1975) Zudem können ähnliche Instrumente wie beim Menschen verwendet werden, die Biomechanik ist vergleichbar und auch der Kostenaufwand ist niedrig zu halten. (Wissing et al. 1990) Außerdem weist das Göttinger Minischwein hinsichtlich der Knochenphysiologie, der Anatomie, der Morphologie, des Heilungsprozesses und des Remodelings eine sehr große Ähnlichkeit zum Menschen auf (Thorwarth et al. 2005), so dass aufgrund der zu erwartenden Reaktion Rückschlüsse gezogen werden können. Auch ist die Reproduzierbarkeit der

Ergebnisse bei entsprechend geringer Fallzahl gegeben. (Hönig und Merten 1993, Pearce et al. 2007)

Um die Knochenneufbildungsrate im Tiermodell zeitlich und örtlich zu markieren, finden Fluorochrome ihre Anwendung und dienen dem Sichtbarmachen der Mineralisationsfront zum Zeitpunkt der Fluorochromgabe. (Rahn 2003)

1.10. Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 2: Fluoreszenzmikroskopie



Als Fluoreszenz wird die spontane Emission von Licht bezeichnet, sie endet mit dem Einstellen der anregenden Strahlung. Wird ein Molekül mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, werden seine Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, wird Energie in Form von Wärme und Photonen (Licht) frei. (Rahn et al. 1980) Das Fluoreszenzlicht ist aufgrund dieser Tatsache langwelliger als das Anregungslicht, das sogenannte Stokes-Shift, und beträgt im Mittel 20 - 50 nm. Um die Fluoreszenz sichtbar machen zu können, muss das Licht so gefiltert werden, dass diese durch das starke Anregungslicht nicht überstrahlt wird. (Knoche 1979, Herman 1989a und 1989b) Der Anregungsfilter bringt das Anregungslicht in den Bereich der gesuchten Wellenlänge. Es entsteht Licht mehrerer Farben, obwohl der Wellenlängenbereich sehr eng ist. Ein Sperrfilter direkt hinter dem Objektiv filtert das Licht erneut, um das exakte Fluoreszenzlicht zu erzielen. (Rahn 1976) Das Spektrum der Gasentladungslampen reicht bis in den UV-Bereich.

Ihre Lichtintensität ist sehr hoch, daher eignen sich diese Lampen besonders zur Fluoreszenzmikroskopie. Knochen besitzt eine physiologische Primärfluoreszenz, die bei der polyfluorochromen Sequenzmarkierung durch das Verwenden von Fluorochromen zu einer Sekundärfluoreszenz führt. Fluorochrome, die zur Markierung neuen Knochens verwendet werden, dürfen die Mineralisation des neuen und alten Knochens nicht beeinflussen und müssen eindeutige Banden bilden, die von anderen Farbstoffen gut abgrenzbar sind. Sie dürfen nicht toxisch sein und sollten sich relativ unempfindlich gegenüber Chemikalien oder Licht verhalten. (Rahn und Perren 1971) Fluorochrome absorbieren aufgenommenes Licht einer bestimmten Wellenlänge, emittieren Licht charakteristischer Intensität und Wellenlänge in spezifischer Farbe und geben Licht teilweise als Strahlung wieder ab. Sie binden sich als Chelatkomplex an das Hydroxylapatit während der Mineralisationsphase der Knochenneubildung. Diese Tatsache prädestiniert sie zum Sichtbarmachen von Veränderungen in der Knochenphysiologie, sowohl Region und Zeitpunkt als auch Ausmaß lassen sich mit dieser Methode festhalten. (Rahn 2003) Bereits 1958 wurden gelb fluoreszierende Tetrazykline untersucht. (Milch et al. 1958) Ab 1966 fanden Calcein-Grün (Suzuki und Mathews 1966) und ab 1971 auch Xylenolorange und das rote Alizarin ihre Anwendung als Fluorochrome. (Rahn und Perren 1971)

2. Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die klinische und histologische Evaluation des Einsatzes einer experimentell chemisch quervernetzten, resorbierbaren Prototyp-Kollagenmembran Bio-Gide-Pro® (Biomaterials - Geistlich, Wolhusen, Schweiz) nach dem Prinzip der gesteuerten Knochenregeneration (GBR) im Tierexperiment. Diese Pilotstudie erfolgte im Rahmen einer präklinischen Prüfung.

Die vorliegende Studie sollte zeigen, ob und wie die Membran das Heilungs- bzw. Resorptionsmuster eines nichtvaskularisierten Beckenkammtransplantates beeinflusst. Die Untersuchung erfolgte im split-mouth Design, als Kontrollgruppe dienten die Präparate mit Periostabdeckung.

Es wurden histologische und fluoreszenzmikroskopische Befunde erhoben und zusätzlich die Augmentation zwischen Ober- und Unterkiefer verglichen.

Verwendung der Bio-Gide-Pro® - Kollagenmembran bezogen auf:

1. Die Knochenneuformationsrate nach Augmentation
Oberkiefer
Unterkiefer
2. Die Resorptionsrate nach 12 Wochen
Oberkiefer
Unterkiefer
3. Die Dehiszenzhäufigkeit nach 12 Wochen

3. Material und Methoden

Ein Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde gestellt. Das Projekt war unter der Nummer - G 0403/05 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales^{1°} registriert mit der offiziellen Bezeichnung: „Untersuchung von Kollagenmembranen zur Abdeckung von Knochendefekten nach Kieferaugmentation (Kurzbezeichnung: Kieferaugmentation mit avaskulärem Hüftknochen am Minischwein)“.

3.1. Versuchstiere

Bei den Tieren handelte es sich um 6 weibliche 2-jährige Minischweine mit einem durchschnittlichen Gewicht von 30 - 35 Kilogramm (Göttingen Minipig[®] - Ellegaard, Dalmose, Dänemark). Entsprechend der Richtlinien wurden die Tiere im Biomedizinischen Forschungsinstitut unter der Leitung von PD Dr. C. Große - Siestrup untergebracht (Genehmigungsnummer: ZH 76). Tierärztin Dr. B. Rühle übernahm die Hauptverantwortlichkeit, das Tierpflegepersonal garantierte die ganztägige Fürsorge. Die Tiere wurden in einem 24 m² großen, gefliesten Großraumgehege im Biomedizinischen Forschungsinstitut bei 20 C° gehalten. Die Ernährung beinhaltete eingeweichtes, vitaminreiches Mischfutter (ssniff Mpig-E, Soest, Deutschland)^{2°} und Wasser ad libitum.

3.1.1. Medikamentöse Therapie

24 Stunden praeoperativ wurde eine Infektionsprophylaxe mit Baytryl[®] (BAYER, Leverkusen, Deutschland) 10% begonnen, die in einer Dosierung von 2,5 ml pro 100 kg KG i.m. appliziert wurde.

Zur Sedierung und Narkoseeinleitung wurden perioperativ jedem der Tiere Atropin[®] 1% (Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland) zwischen 0,5 - 0,8 ml, Ketamin[®] 10% (Actavis, München, Deutschland), Xylazin[®] 2% (CEVA, Düsseldorf, Deutschland) und Stresnil[®] 40 mg/ml (Janssen, Beerse, Belgien) gewichtsabhängig über einen Zugang in die Ohrvene gespritzt.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden intraoperativ im 20 Minutentakt und 30 Minuten nach Narkoseeinleitung 4 ml Ketamin[®] 5% (Actavis, München, Deutschland) und 0,7 ml Xylazin[®] (CEVA, Düsseldorf, Deutschland) i.v. injiziert.

Narkoseeinleitend wurde Isofloran-Baxter[®] (Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet, zur Schmerzprophylaxe wurden intraoperativ halbstündlich 2 ml Fentanyl[®] - Jansson (Jansson Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) i.v. verabreicht. Zusätzlich wurden Infusionen mit Jonosteril[®] (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) ad 1,5 l und HAES-steril[®] 6% (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) ad 0,5 l als Volumenersatz eingesetzt.

3.1.2. Chirurgischer Eingriff

Die Operationen wurden alle von der Oralchirurgin Prof. Dr. K. Nelson (Implantologie und Spezialprothetik) und Dr. Dr. C. Glatzer (Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichts-chirurgie) durchgeführt.

Die durchgeführten Schritte sind im Folgenden dokumentiert.

Defektsetzung

Nach der Narkoseeinleitung wurde die Desinfektion, die sterile Abdeckung sowie die Injektion von 5 ml Ultracain DS forte 1:100000 (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) je Kiefer durchgeführt. Im Unterkiefer erfolgte eine Leitungsanästhesie in Höhe des N. alveolaris inferior und im Oberkiefer eine Infiltrationsanästhesie im Bereich der Defektsetzung. Die Schnittführung erfolgte marginal mit einer Entlastung im Eckzahnbereich nach anterior vestibulär. Nach distal wurde der Schnitt über den Resektionsbereich hinaus extendiert. Ein Mukoperiostlappen wurde präpariert und die Schleimhaut im Oberkiefer nach vestibulär und im Unterkiefer nach lingual mobilisiert. Ein kastenförmiges Segment von 3,5 cm Länge und 1,5 cm Höhe wurde mit dem Horex - digitaler Caliper^{3°} (Hoffmann GmbH, München, Deutschland) markiert, mit einer oszillierenden Knochensäge^{4°} (Aesculap Typ G-6100-05, Tuttlingen, Deutschland) geschnitten, entnommen und die vorhandenen Zähne dieses Bereiches entfernt. Die scharfen Knochenkanten wurden geglättet, der Mukoperiostlappen mit 3 bis 4 Einzelknopfnähten gestützt, spannungsfrei adaptiert und im Anschluss über dem Defekt mit einer fortlaufenden Naht vernäht. Verwendet wurde dafür ein Monocryl-Faden der

Stärke 3/0 (Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien). Bei allen 6 Versuchstieren erfolgte die Resektion in jedem der vier Quadranten des Ober- und Unterkiefers.

Augmentation

Zwei Monate nach der Defektsetzung erfolgte die Operation zur Augmentation mit kortikospongiösem Beckenkamm. Für die Durchführung wurden zwei Operationsteams benötigt, die gleichzeitig operierten:

Team I - Entnahme Beckenkammtransplantat (extraoral)

Team II - Kieferkammaugmentation (intraoral)

Team I - extraoral

Nach Desinfektion, steriler Abdeckung und Infiltration von insgesamt 5 ml Ultracain DS forte 1:100000 (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland), wurde die Spina iliaca anterior superior durch Palpation lokalisiert und die Schnitfführung angezeichnet. Der Schnitt wurde entlang der Crista iliaca 10 cm nach dorsal geführt. Es erfolgte die scharfe Durchtrennung der Cutis und Subcutis, das Abheben der Muskulatur von der Faszie und die stumpfe und teilweise scharfe Präparation mit der Schere bis auf das Periost. Überwiegend mit dem Raspatorium wurde das Periost vom Becken abgelöst, bis die gesamte Länge des Beckenknochens dargestellt war. Die Osteotomielinie wurde nach Ausmessen mit dem Horex - digitaler Caliper^{3°} (Hoffmann GmbH, München, Deutschland) gekennzeichnet. Es erfolgte die Osteotomie mit anschließender Entnahme eines 7cm langen und 3cm hohen kortikospongiösen Knochenblocks (tricortikal) mittels Knochensäge^{4°} Typ G-6100-05 (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und Meißel. Die Konfiguration des Knochens erfolgte mit o.g. Knochensäge^{4°} horizontal und vertikal in vier Blöcke entsprechend des Knochendefizits des jeweiligen Kiefers. Abschließend erfolgte die sorgfältige elektrochirurgische Blutstillung und ein schichtgerechter Wundverschluss mit resorbierbarer Naht Vicryl 2/0 (Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien).

Team II - intraoral

Es erfolgte eine Desinfektion, steriles Abdecken des Operationsbereiches und die Infiltration von insgesamt 10 ml UDS forte 1:100000 (Oberkiefer und Unterkiefer).

Begonnen wurde am Oberkiefer rechts, die Schnitfführung erfolgte entlang der Narben der Voroperation auf dem Alveolarkamm mit einer Entlastung nach vestibulär. Ein Mukoperiostlappen wurde gebildet und der kastenförmige Defekt vorsichtig dargestellt. Der Alveolarknochen wurde angefrischt und der Knochenblock des kortikospongiösen Beckenkammes mit rotierenden Instrumenten an die Defektgröße angepasst. Die Fixation des Transplantates erfolgte equicrestal mit zwei Osseosyntheseschrauben (Medartis® Ø 2.0 mm, Länge: 10 mm, Basel, Schweiz). In den Fällen in denen eine Membran verwendet wurde erfolgte zur spannungsfreien Adaptation des Mukoperiostlappens eine Periostschlitzung und eine Mobilisation des Lappens, um einen dichten Wundverschluss mit der resorbierbaren Naht Monocryl 3/0 (Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien) zu erreichen. Voraussetzung der Periostabdeckung war das intakte Periost, so dass eine Periostschlitzung nicht erfolgte. Das Vorgehen am Unterkiefer war analog. Das Schwein wurde umgelagert, so dass ein Zugang zu den Quadranten 2 und 3 ermöglicht wurde. Begonnen wurde am Oberkiefer wie in den Quadranten 1 und 4.

Anhand einer Randomisierungsliste wurde die Bio-Gide-Pro® - Kollagenmembran (Biomaterials - Geistlich, Wolhusen, Schweiz) auf die Schweinekiefer verteilt. Bei Schwein Nummer 6 wurde die Membran in allen vier Quadranten verwendet, bei Schwein Nummer 2 wurde kein Augmentat mit einer Membran abgedeckt. Die übrigen vier wurden im split-mouth-Verfahren getestet, so dass im Zuge der Augmentation insgesamt 12 Kieferhälften mit und 12 ohne Membranabdeckung vorlagen.

3.1.3. Bio-Gide-Pro® - Kollagenmembran

In der Arbeit wurde der Prototyp einer quervernetzten, resorbierbaren Kollagenmembran unter der Bezeichnung Bio-Gide-Pro® (Biomaterials - Geistlich, Wolhusen, Schweiz) mit einer Abmessung von 16 x 22 mm verwendet. Sie bestand aus nicht-toxisch chemisch quervernetztem porkinen Typ I und III Kollagen. Durch die auf der sogenannten „zero-length“ Technik basierenden Vernetzungsmethode wird ihr eine Resorptionszeit zwischen 4 und 8 Wochen zugesprochen. (Rothamel et al. 2004) Bei der „zero-length“ Technik werden Reagenzien eingesetzt, deren reaktive Gruppen mit Aminogruppen in Proteinen reagieren, z.B. EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) oder NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid). (Wong 1991) Sie bilden mit dem Protein ein stabiles

Intermediat und haben den Vorteil, dass keine zusätzlichen Stoffe in das Kollagen eingebracht werden müssen. Die offenporige Bilayer-Membran ist aus zwei Schichten aufgebaut: einer kompakten, die auf das Weichgewebe aufgebracht wird und einer porösen Schicht, die den Knochendefekt bedeckt.

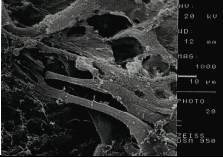
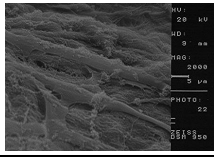
	untersuchte VN-Membran	BG-Membran
Produktname	Bio-Gide-Pro®	Bio-Gide®
REM		
Hersteller	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz	
Herkunft	porkin, Typ I und III Kollagen	
Resorptionszeit	4 – 8 Wochen	2 – 4 Wochen
Vernetzung	dreifach chemisch experimentell (zero-length-technik)	nativ
Struktur	bilayer offenporig	

Tabelle 2: Daten der untersuchten Kollagenmembran versus native Bio-Gide® - Membran (Rothamel et al. 2004)

3.1.4. Nachsorge der Tiere

Die Tiere wurden durch Tierärztin Dr. Bärbel Rühle oder dementsprechend ausgebildetes tierärztliches Fachpersonal nachsorgt. Alle Tiere erholten sich nach dem chirurgischen Eingriff schnell und fingen wenige Stunden nach der Operation an zu fressen, was als Anzeichen für Indolenz und die gute Verträglichkeit des Eingriffes gewertet wurde.

Postoperativ wurden 1,3 ml Temgesic® (Essex Pharma, München, Deutschland) dreimal täglich i.m. appliziert, danach wurden 2 ml Rimardyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) einmal täglich i.m. verabreicht. Prophylaktisch wurden zusätzlich 3 Wochen postoperativ kombinierend die bakterizid wirksamen Substanzen Baytryl® (BAYER, Leverkusen, Deutschland), wie beschrieben und Borgal® (Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) 3 ml i.m. täglich einmal appliziert.

In der ersten postoperativen Woche wurden die Versuchstiere täglich einmal nach Befinden, Fressverhalten, Fieber und Gewicht, sowie Wunddehiszenzen untersucht und die festgestellten Parameter dokumentiert. Als Wunddehiszenz wurde gewertet, wenn ein Auseinanderweichen der Wundränder mit Freilegung der Membran und/oder des Knochenblockes zu verzeichnen war. Im weiteren Verlauf verkürzten sich diese Kontrollen auf einmal wöchentlich. In Fällen von Wunddehiszenzen erfolgte eine Anfrischung der Wunde durch Kürettage mit einem scharfen Löffel nach Willinger (Henry Schein Dental GmbH, Langen, Deutschland) und eine desinfizierende Spülung mit Polyvidonjod-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

3.1.5. Fluorochromlabelling

Um das Fluorochromlabelling durchführen zu können, wurden die Tiere sediert. Die Farblösungen wurden am Vortag der Injektion frisch angesetzt und der pH - Wert eingestellt. Angefangen wurde mit 90 mg pro kg Körpergewicht Xylenolorange (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) nach vollendeten 14 Tagen post augmentationem, 20 mg pro kg Körpergewicht Calceingrün (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) folgten 3 Wochen später. Nach weiteren 3 Wochen erfolgte die Gabe von 30 mg pro kg Körpergewicht Alizarin-Komplex (Merck, Darmstadt, Deutschland) als i.v.-Applikation in die Ohrvene.

3.2. Herstellung der histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Präparate

3.2.1. Sedierung

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte 12 Wochen post augmentationem. Die Tiere wurden mit Ketamin[®] 10% (Actavis, München, Deutschland), Xylazin[®] 2% (CEVA, Düsseldorf, Deutschland) und Stresnil[®] 40 mg/ml (Janssen, Beerse, Belgien) sediert. Ein Venenzugang wurde gelegt und sie erhielten intravenös 2 g Trapanal[®] (Byck-Gulden, Konstanz, Deutschland), 40 mg Pancuronium[®] (Delta-Select, Pfullingen, Deutschland) und 60 mmol einer 7,45%igen Kaliumchloridlösung. Die angeschlossene Sektion diente der Gewinnung des Knochenmaterials.

3.2.2. Herstellung der Blöcke

Es wurden ca. 2 cm³ große Knochenblöcke entnommen, die die region of interest (ROI) einschloss. Die Präparate wurden zusätzlich sagittal nach Entfernung der Osseosyntheseschrauben (Medartis[®] Ø 2.0 mm, Länge: 10 mm, Basel, Schweiz) in deren Verlauf geteilt.

Zur Konservierung wurden die zuvor entnommenen Knochenfragmente in einer formaldehydbasierten Fixierung für Fluorochromlabellings^{5°} zwischen 10 und 14 Tagen belassen. Ein Liter dieser Lösung wurde aus 324 ml Formalin (37%), 540 ml Ethanol (100%) und 130 ml Natrium-Barbital-Puffer (0,1 mol / pH = 7,3) bestehend aus 58,1 ml Natrium-Barbital (2,06%) und 41,9 ml Salzsäure (0,1%) sowie 6 g Glucose hergestellt.

Das Formalin wurde ausgewaschen und mittels aufsteigender Alkoholreihe (70% / 80% / 90% / 96% Ethanol - Herbeta - Arzneimittel, Berlin, Deutschland) für jeweils 7 Tage wurde eine Entwässerung der Proben erreicht.

Darauf wurden sie 4 Stunden mit Xylol (J.T.Baker, Deventer, Holland) entfettet und für die Aufnahme der Acrylate vorbereitet.

Die Verarbeitung erfolgte ausschließlich in Polyethylen- oder Glasgefäßen.

Die verwendeten Kunststoffkomponenten von Technovit[®] 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) eignen sich besonders gut für die

Darstellung nicht entkalkter Knochenpräparate im Dünnschnittverfahren. Die Basislösung dieser Lösung besteht aus Methylmethacrylat (die vor Lösungsherstellung durch eine Chromatographiesäule mit 50g Aluminiumoxid (Al_2O_3) entstabilisiert wurde) und dem Zusatz eines Hydrophilierungsmittels. Dazu kommen Polymethylmethacrylat - Pulver zur Absenkung des Polymerisationsschrumpfes sowie Härter 1 für die Peroxidverbindung. Härter 2, der Katalysator für Härter 1, ist zudem der Regler für eine kontrollierte und niedrigtemperierte Polymerisation.

Die Immersion erfolgt in drei Stufen über die Präinfiltration (1 Tag) bis zur Infiltration (7 Tage). Die Polymerisation erfolgt in vorgekühlten Einbettformen bei 4°C für die Dauer von 4 Tagen.

Die ausgehärteten Proben wurden aus den Einbettformen gelöst und mit Technovit[®] 3040 (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) gesockelt. Das Trimmen der Präparate am Gerät Jean Wirtz Phoenix 3000^{6°} (Firma Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland) mit Schleifpapier^{7°} (Merck, Darmstadt, Deutschland) einer 80er Körnung diente sowohl dem Beseitigen von Kanten als auch dem Anpassen an die Fassung am Schneidegerät, um ein optimales Einspannen zu gewährleisten.

3.2.3. Herstellung von Schnitten

Die ersten Schnitte am Schneidegerät Leica RM 2255^{8°} (Leica, Nussloch, Deutschland) wurden mit 100 μm Schichtdicke durchgeführt bis zum Erreichen der festgelegten Schnittebene. Um das Messer und den Schnittblock zu befeuchten, wurde Schneideflüssigkeit (1,5 ml Lifosan Soft[®] auf 50 ml Wasser)^{9°} (Braun AG, Sempach, Schweiz) genutzt. Von jeder Probe wurden in Folge 14 Schnitte mit einer Schichtdicke von 60 μm genommen und in die Mitte eines Objektträgers^{10°} (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) positioniert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden sie mit 70%igem Ethanol (Herbeta - Arzneimittel, Berlin, Deutschland) benetzt. Das Polymer wurde abschließend mit einer Streckflüssigkeit (30 ml 2-Butoxyacetat + 70 ml 70% Ethanol) aufgelöst, das Präparat mit Kisolfolie^{11°} (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgedeckt und ein Filterpapierstreifen^{12°} (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) dazwischen gelegt, der die überschüssige Flüssigkeit aufnahm. Die Objektträger wurden leicht gepresst gestapelt und 48 Stunden im

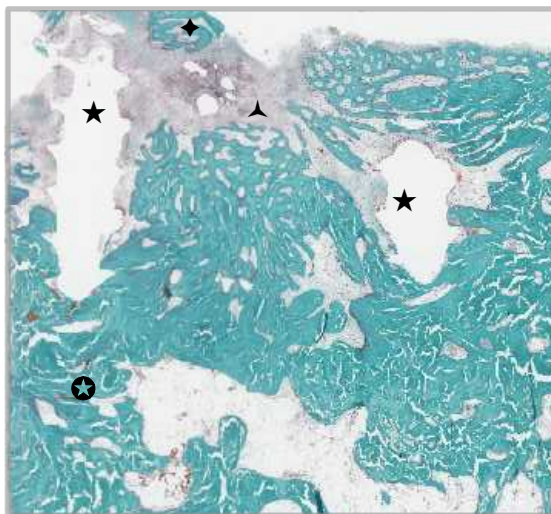
Wärmeautomaten Heraeus B6 (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) bei 70 °C getrocknet. Durch das Fluorochromlabelling der Präparate musste sehr sorgsam mit den Blöcken und Schnitten umgegangen werden, da diese äußerst lichtempfindlich sind. Zum Schutz vor einer direkten Lichteinstrahlung erfolgte die Lagerung verpackt in Aluminiumfolie, um ein Ausblässen der Fluoreszenzen zu vermeiden.

3.2.4. Färbungen

Zunächst wurde eine Übersichtsfärbungen pro Präparat zur Darstellung des Gewebes und seinen Veränderungen angefertigt. Dazu wurden die beschichteten und getrockneten Objektträger dreimal für 20 Minuten mit 2-Methoxyethylacetat (MEA) entplastet, in einer absteigender Alkoholreihe (96% / 90% / 80% / 70% Ethanol - Herbeta - Arzneimittel, Berlin, Deutschland) rehydriert und abschließend mit Aqua bidest. gespült. Durch eine kurzzeitige Färbung dringt die Färbelösung nur in die oberen Zellschichten ein (15 µm) und eine Überlagerung der gefärbten Schichten wird verhindert. Die restlichen Schnitte wurden belassen, lichtgeschützt verpackt und dienten der Auswertung der Fluoreszenzmarkierung unter dem Mikroskop.

Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner-Trichrom^{13°, 14°, 15°, 16°}

Abbildung 3: Biopsie Präparat OK mit Membran Masson-Goldner-Trichromfärbung, Übersichtsfärbung (x 10)



◆ Restaugmentat nach 12 Wochen

▲ Bindegewebe

★ Schraubenkanal der Osteosyntheseschraube

☆ ortsständiger Knochen

Bei dieser Färbung wurde nach der Spülung in Aqua bidest. der Färbekorb für drei Minuten in Weigerts-Eisenhämatoxylin^{13°} (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) eingetaucht. Danach wurde der Korb für 10 min. mit fließendem

Leitungswasser umspült, in Säurefuchsin-Ponceaulösung^{14°} (Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland) für 5 min. belassen und mit 1% iger Essigsäure gespült. Nach 15 min. in Phosphormolybdän-säure-Orange-G^{15°} (Merck, Darmstadt, Deutschland) schloss sich ein kurzes Eintauchen in Essigsäure 1% an. Die Präparate wurden 8 min. in Goldner-Lösung III Lichtgrün^{16°} (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) gefärbt. Danach wurde erneut 1%ige Essigsäure zum Spülen verwendet. Um den Färbvorgang zu beenden, wurde mit aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, mit Xylol (J.T.Baker, Deventer, Holland) entfettet und mittels Vitroclud[®] (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) der Objektträger^{10°} (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) mit einem Deckglas abgedeckt.

3.3. Digitales Bildanalyzesystem

Die Analyse teilte sich in zwei Abschnitte: erstens die Bestimmung der Knochenneuformationsrate mittels polyfluorochromer Sequenzmarkierung und zweitens die Bestimmung der Resorptionsrate mit eingescannten, nach Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Schnitten.

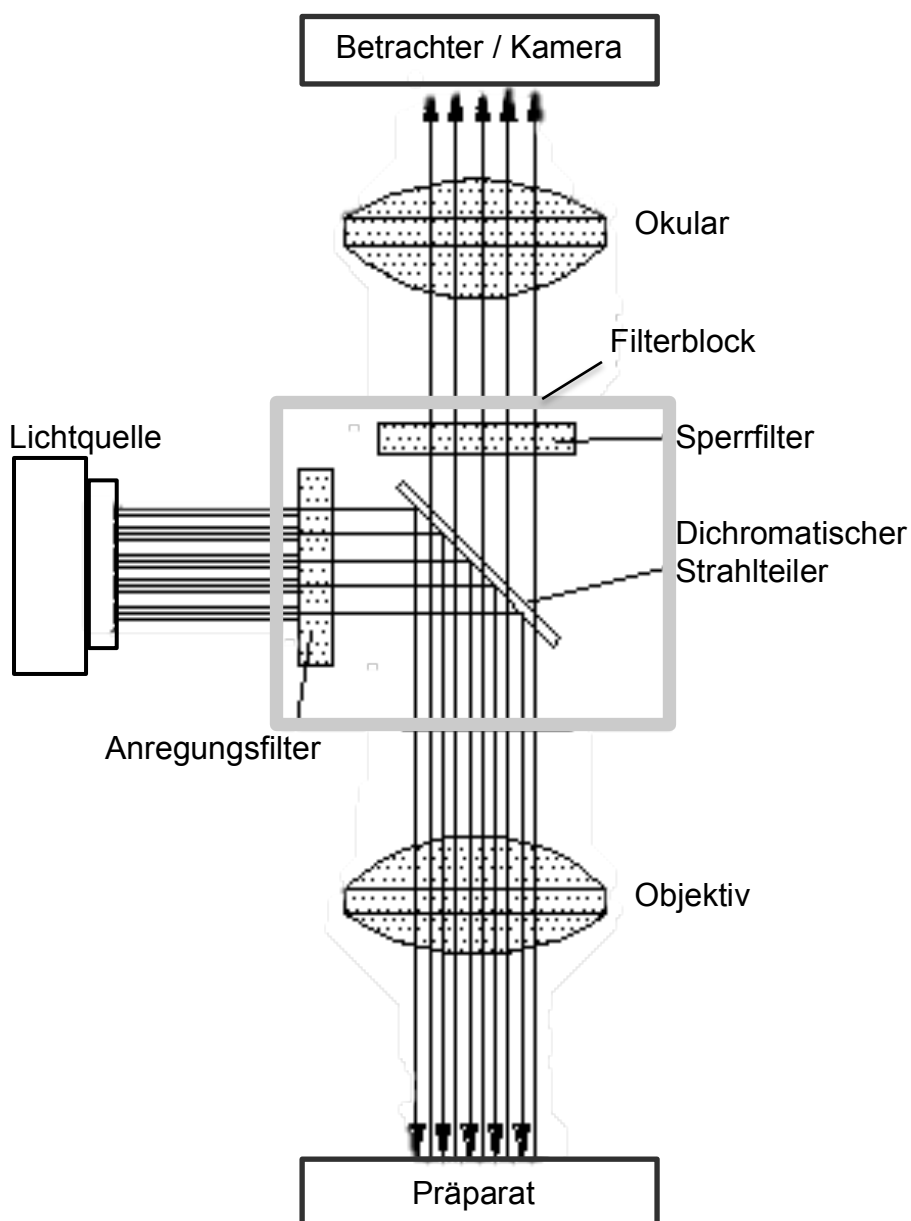
3.3.1. Fluoreszenzmikroskopie

Jeweils das Präparat, bei dem alle drei Fluoreszenzbanden deutlich zu erkennen waren, wurde ausgewählt und direkt vom Objektträger^{10°} (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) unter dem Mikroskop betrachtet.

Ziel der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung war die quantitative und qualitative Beurteilung der Knochenneubildungsrate (KNR) im Transplantat. Bei der Dokumentation war darauf zu achten, dass der Vergrößerungsfaktor des Objektivs mit dem des Programmes übereinstimmt, dadurch erschien die angezeigte Strecke bereits in Mikrometer (μm) umgerechnet, die der KNR des jeweiligen dreiwöchigen Zeitintervalls entsprach. Zusätzlich wurde die Strecke von Xylenolorange zu Alizarin ermittelt, um die KNR des gesamten Beobachtungszeitraumes bestimmen und die Breite der Calceingrünbande berechnen zu können. Die Bestandaufnahme erfolgte jeweils zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten an drei verschiedenen Präparatstellen. Die Fluoreszenzbanden wurden an Präparaten mit 10-facher Vergrößerung in dem Bereich vermessen, der an die Schraubenkanäle der entfernten Osteosyntheseschrauben angrenzte. Sie wurden ausschließlich in einem abgedunkelten Raum und nur mittels spezieller Filter^{19°} für Xylenolorange (TYP 14), Calceingrün (TYP 09) und Alizarin (TYP 02) unter dem Mikroskop betrachtet. Die Fluoreszenzschnitte wurden mittels Zeiss Mikroskop (Axiophot, Göttingen, Deutschland)^{17°} und einer Digitalkamera (AxioCam MRc5, Göttingen, Deutschland)^{18°} unter Verwendung eines Filtersystems aufgenommen. Jede Fluoreszenzmarkierung wies einen anderen Anregungsbereich auf. Die Analyse wurde mit dem Filterblock FITC^{19°} (Leica, Bensheim, Deutschland) bestehend aus Anregungsfilter (Bandpassfilter G - 450-490 nm), dichromatischem Strahlteiler (Reflexionskurzpassfilter FT - 510 nm) und Sperrfilter (Langpassfilter LP - ab 520 nm) durchgeführt. Der wichtigste Zusatz des Mikroskops ist der dichromatische Strahlteiler, der kurzwellige Strahlen ($< 510 \text{ nm}$) des

Anregungslichtes von der Lichtquelle zu Objektiv und Präparat reflektiert, während Fluoreszenzstrahlen längerer Wellenlänge ($> 510 \text{ nm}$) zum Betrachter bzw. zur Kamera reflektiert werden. Der Sperrfilter absorbiert das blaue Licht mit der Anregungswellenlänge (siehe Abbildung 4). Die Sensitivität dieser Methode ist sehr hoch, nur die ausgesendeten Strahlen der zulässigen Wellenlänge werden als leuchtende Punkte registriert. (Herman 1989b)

Abbildung 4: schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskops (optische und elektronische Geräte Jülich GmbH, Bonn, Deutschland)

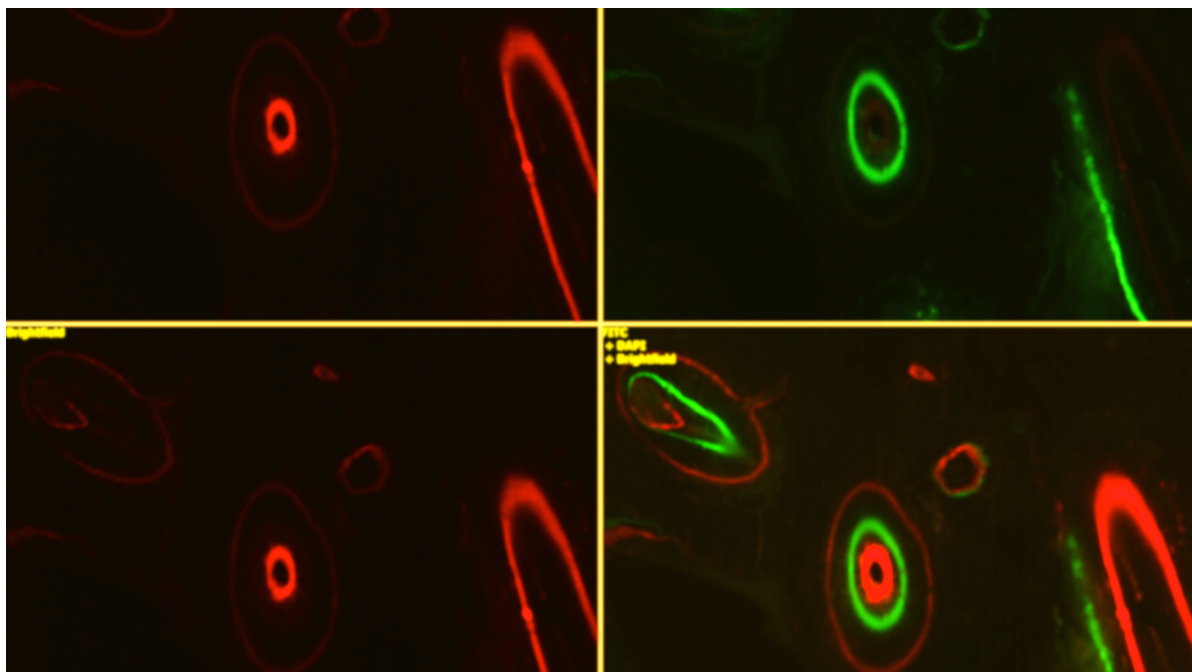


Jede Fluoreszenzbande hatte eine charakteristische Farbe. Xylenolorange stellte sich rotorange dar, Calceingrün leuchtend grün und Alizarin leuchtend rot. Ein optimales Ergebnis wird erreicht, wenn alle Filter für ein Fluorochrom exakt aufeinander abgestimmt sind.

Mit jedem Filter wurde eine der drei Banden sichtbar gemacht und als „mehrdimensionales Bild“ im AxioVision-Rel.4.6-Programm (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) zusammengesetzt (wie in Abbildung 5 erkennbar). Bei sehr starker Fluoreszenz konnte mit dem Filter TYP 02 ein „Livebild“ angefertigt werden, bei dem alle drei Banden sichtbar und zu unterscheiden waren.

Abbildung 5: Gallery Fluoreszenzmarkierung, Präparat UK ohne Membran (x 20)

- Xylenolorange
- Calceingrün
- Alizarinrot

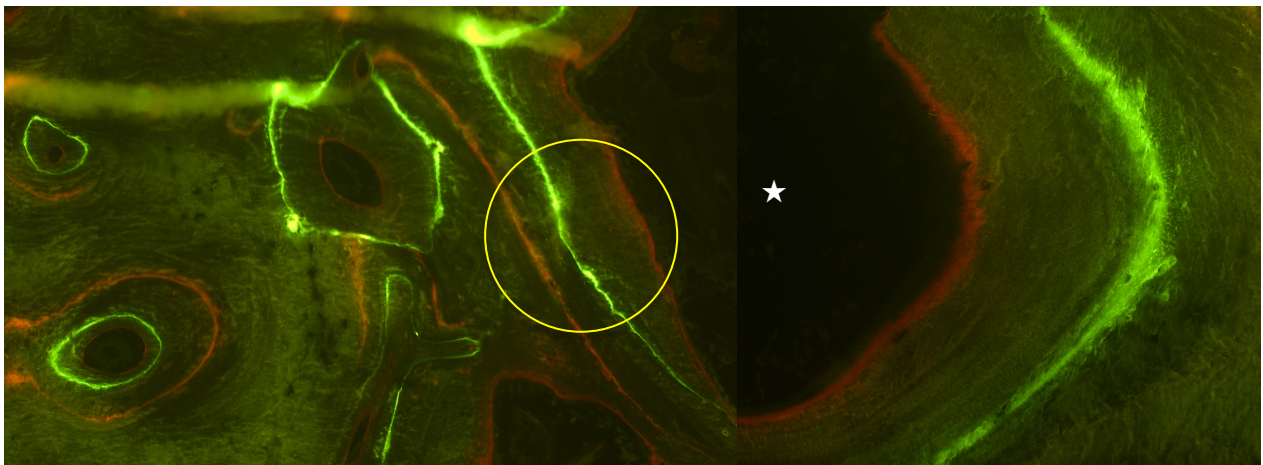


3.3.2. Evaluation der Knochenneuformationsrate mittels Fluoreszenzmarkierung

Die Messung der Knochenneuformation erfolgte anhand der fluoreszenzmarkierten Wachstumslinien in 10-facher Vergrößerung, die durch spezielle Filter sichtbar gemacht wurden.

Mit Hilfe des AxioVision-Rel.4.6-Programmes (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurden die Fluoreszenzbanden der histologischen Präparate gemessen. Die gemittelten Werte wurden zur statistischen Analyse verwendet. Für die Berechnung der durchschnittlichen KNR wurden zunächst die Mittelwerte aller Ober- und Unterkieferpräparate ohne spezielle Berücksichtigung der Membranverwendung zusammengefasst und der Mittelwert gebildet. Gemessen wurde die KNR im Bereich der Schraubenkanäle der Osseosyntheseschrauben, wie die gelbe Markierung in Abbildung 6 zeigt.

Abbildung 6: Vorgehen der Messung, Präparat UK mit Membran (x 10)



- ★ Schraubenkanal der Osteosyntheseschraube
- Bereich der Messung

Im ersten Abschnitt wurde der Abstand von Xylenolorange zu Calceingrün (3. bis 5. Woche = t1) markiert, im zweiten der Abstand zwischen Calceingrün und Alizarin (6. bis 8. Woche = t2).

Exemplarisch werden in den Abbildungen 7 und 8 die Messwerte der Knochenneuformationsrate in μm entsprechend des jeweils dreiwöchigen Zeitintervalls demonstriert. Um die Abstände zwischen den Fluoreszenzbanden zu erfassen, wurden Anfang- und Endpunkt von Xylenolorange zu Calceingrün und von Calceingrün zu

Alizarin markiert und als Strecke in dem voreingestellten System des AxioVision-Rel.4.6-Programmes (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) angezeigt, wie Abbildung 7 zeigt. Das Wachstum des gesamten Zeitraums (3. bis 8. Woche = t3) ergibt sich unter Berücksichtigung der Breite der Calceingrünbande, siehe Abbildung 8.

Abbildung 7: Beispiel der Messung der Fluoreszenzbanden, Präparat OK ohne Membran (x 10)

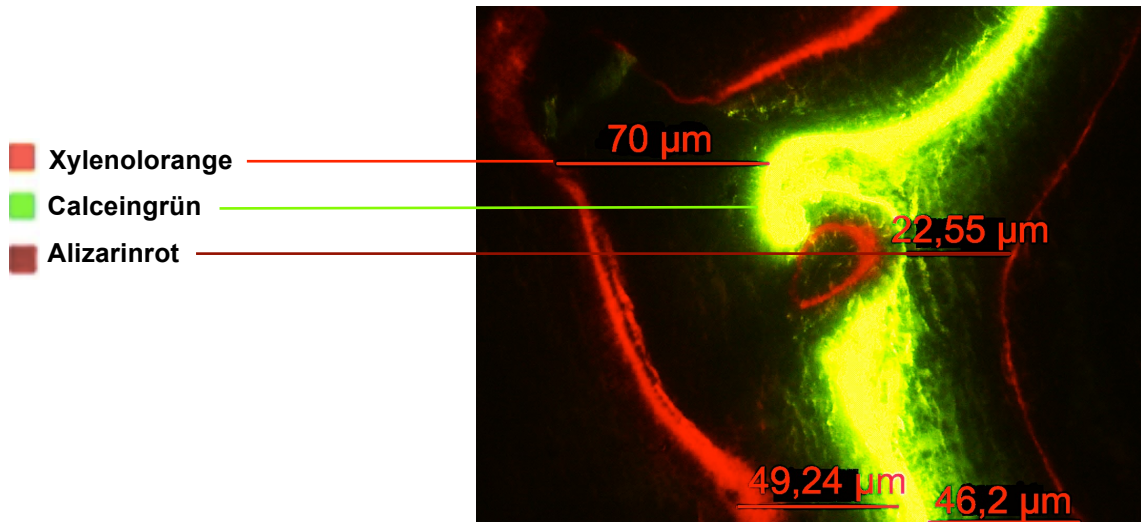
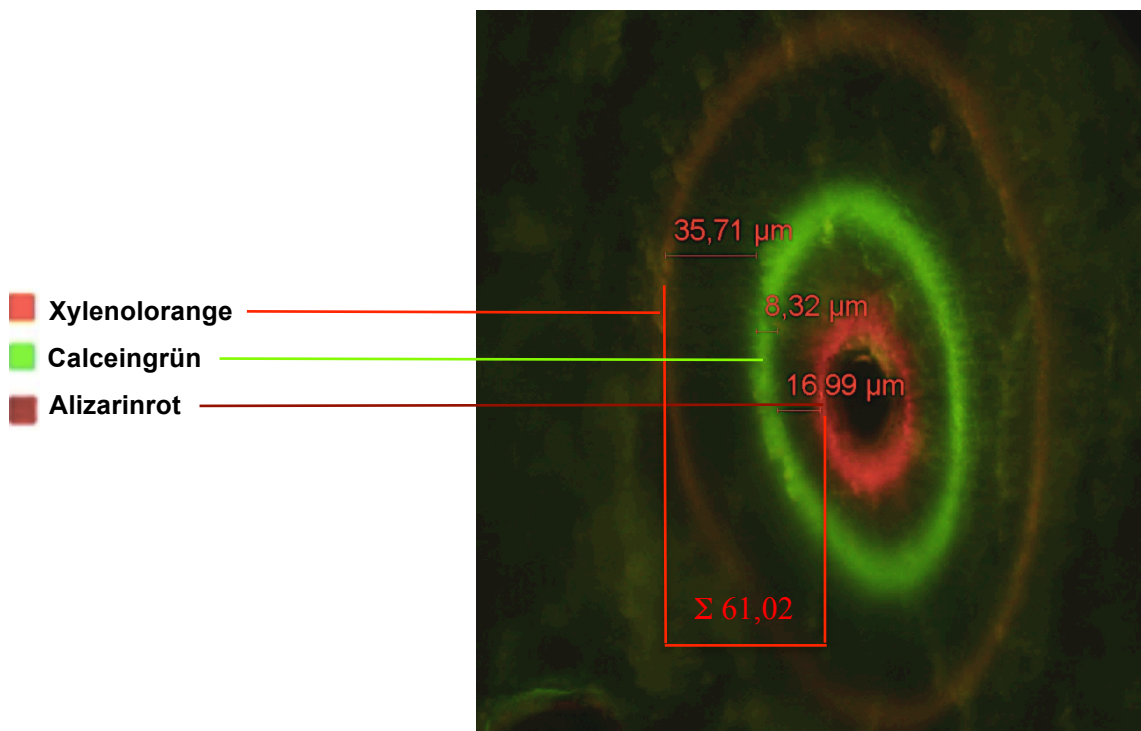


Abbildung 8: Auswertung der Fluoreszenzmarkierung unter Berücksichtigung der Breite der Calceingrünbande, Präparat UK ohne Membran (x 10)



3.3.3. Bestimmung der Knochenresorptionsrate

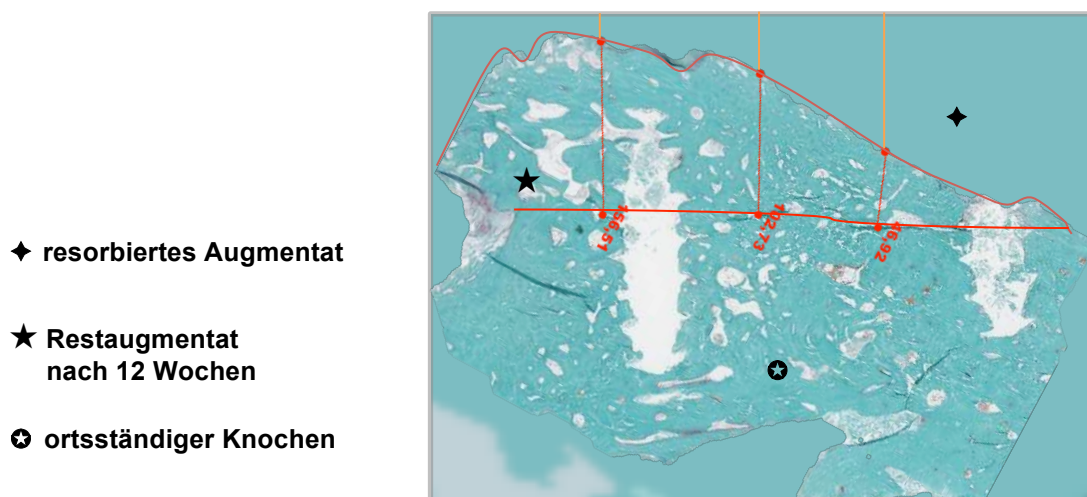
Von den nach Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Schnitten wurde ein digitales, eingescanntes Bild in 40-facher Vergrößerung erzeugt und auf einer externen Festplatte^{20°} (Freecom Technologies GmbH, Berlin, Deutschland) gespeichert. Dieses Bild wurde zur Dokumentation der Resorptionsrate im ScanScopeProgramm (Aperio Technologies, Vista, Kanada) hochgeladen und ausgewertet.

Zur Messung der Knochenresorptionsrate wurden ausschließlich Präparate verwendet die nach Masson-Goldner-Trichrom angefärbt wurden.

Die Bestimmung der Knochenresorptionsrate des Transplantates erfolgte anhand der Größe des Augmentates 12 Wochen post augmentationem, die mit Hilfe des im ScanScope-Programm (Aperio Technologies, Vista, Kanada) voreingestellten Lineals ausgemessen wurde. Wie Abbildung 9 zeigt, wurden die Augmentate in μm an je drei verschiedenen Stellen zu drei unterschiedlichen Zeitenpunkten markiert. Um detaillierte Messungen durchzuführen, musste das Bild konvertiert, mit dem AxioVision-Rel.4.6-Programm (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) geöffnet und bearbeitet werden.

Die Resorptionsrate errechnet sich durch Subtraktion der Höhe des Augmantats nach 12 Wochen von der Ausgangshöhe des Augmentates, die bei der Operation zur Augmentation bestimmt wurde.

Abbildung 9: Auswertung der Färbung nach Masson-Goldner-Trichrom, Präparat UK mit Membran (x 40)



3.4. Statistische Analyse

Die gespeicherten Daten aus dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) wurden in das Statistikprogramm SPSS 17.0.2 und SAS V9.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) übertragen. Es wurde eine deskriptive Analyse durchgeführt, da die Normalverteilungsvoraussetzung für die zu analysierenden Variablen nicht erfüllt war. Können Daten mathematisch nicht bewiesen werden, ist das Verfahren mit Monte-Carlo-Studien hilfreich. In diesem Fall wird der empirische Beweis über eine große Anzahl generierter Stichproben geliefert. Diese Studienvariante fand auch in der vorliegenden Arbeit ihre Anwendung.

Für die statistische Auswertung wurden Tests erhoben:

- Wilcoxon Signed Rank Test
- Mann-Whitney-U-Test

Der Wilcoxon Signed Rank Test wurde in dieser Studie verwandt um mögliche Unterschiede hinsichtlich der Knochenneuformationsrate und Resorptionstendenzen im zeitlichen Verlauf zu evaluieren (abhängige Parameter). Zur Überprüfung unabhängiger Parameter hinsichtlich der Membranverwendung bezogen auf die augmentierte Region wurde der Mann-Whitney-U-Test zu Rate gezogen. Zur Untersuchung abhängiger und unabhängiger Parameter in einem gemeinsamen Modell erfolgte die zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse longitudinaler Daten. (Brunner et al. 2002)

Durch diese Verfahren wird die Signifikanz von Mittelwertdifferenzen getestet. Als signifikant wurde der Wert $P < 0.05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Versuchstiere

Das allgemeine Befinden der Tiere war zu allen Zeitpunkten der Untersuchung ohne Besonderheiten. Allerdings reagierte eines der Tiere aus dieser Versuchsgruppe (Nummer 6) auf den Wirkstoff Alizarin, da die Markierung bei Versterben des Tieres aber bereits abgeschlossen war, konnte das Präparat zur Bestimmung der Knochenneuformationsrate, nicht aber zur Resorptionsauswertung verwendet werden.

In der vorliegenden Studie wurden 6 Schweine operativ versorgt. Jeweils 12 Kiefer wurden nach der autologen Augmentation mit einer Membran abgedeckt. Bei den anderen 12 Kiefern wurde eine reine Periostabdeckung der autologen Transplantate durchgeführt.

Bei einem Schwein kam es zur vollständigen Resorption aller 4 Augmentate, bei drei Schweinen resorbierten 2 und bei einem Schwein 3 Augmentate vollständig. Demzufolge konnte insgesamt bei 5 Schweinen mit 13 Augmentaten (7 mit Membran, 6 ohne Membran) keine Auswertung erfolgen.

In die histologischen Auswertung kamen somit 11 Präparate (5 mit Membran, 6 ohne Membran) verteilt auf fünf Schweine. (siehe Tabelle 3)

Schwein	Region	links	Membran	Histologische Auswertung
		rechts		
1	OK	li	-	ja
		re	+	nein
	UK	li	-	nein
		re	+	nein
2	OK	li	-	ja
		re		nein
	UK	li		ja
		re		nein
3	OK	li	+	ja
		re	-	ja
	UK	li	+	ja
		re	-	ja
4	OK	li	-	nein
		re	+	nein
	UK	li	-	nein
		re	+	nein
5	OK	li	-	ja
		re	+	ja
	UK	li	-	nein
		re	+	nein
6	OK	li	+	nein
		re		ja
	UK	li		nein
		re		ja

Membran: - = nicht vorhanden
+ = vorhanden

Tabelle 3: Verteilung der Bio-Gide-Pro® - Membran auf die Schweinekiefer. Vorzeitig verlorengegangene Augmentate wurden nicht histologisch untersucht.

4.2. Knochenneufbildungsrate

Die KNR wurde anhand der polyfluorochromen Sequenzmarkierung untersucht.

Für den ersten Abschnitt der dritten bis fünften Woche (t1) konnte eine durchschnittliche KNR von 1,09 μm (0,99 - 1,21 μm) am Tag ermittelt werden. In der sechsten bis achten Woche (t2) ergaben sich Werte von 0,72 μm (0,66 - 0,83 μm) KNR pro Tag. Das ergab eine durchschnittliche KNR aller Präparate für den gesamten Zeitraum (t3) von 1,94 μm (1,65 - 2,04 μm) täglich. Das größte Wachstum zeigte sich jeweils bei t1.

Unter Verwendung der Prototyp-Kollagenmembran waren es im ersten Zeitraum (t1) 1,09 μm (0,85 - 1,26 μm) und im zweiten (t2) 0,71 μm (0,51 - 0,88 μm), das ergibt eine durchschnittliche KNR unter Membranverwendung von 2,04 μm täglich (t3). (Tabelle 4)

Schwein	Region	links	Membran	Abstand Xylenolorange zu Calceingrün [μm]	Abstand Calceingrün zu Alizarin [μm]
		rechts			
1	OK	li	-	50,67	33,96
		re	+	°	°
	UK	li	-	°	°
		re	+	°	°
2	OK	li	-	33,84	21,59
		re		°	°
	UK	li		46,87	26,97
		re		°	°
3	OK	li	+	45,07	27,81
		re	-	47,13	33,32
	UK	li	+	53,06	36,98
		re	-	51,28	34,43
4	OK	li	-	°	°
		re	+	°	°
	UK	li	-	°	°
		re	+	°	°
5	OK	li	-	42,02	30,76
		re	+	35,75	21,45
	UK	li	-	°	°
		re	+	°	°
6	OK	li	+	°	°
		re		47,46	30,47
	UK	li		°	°
		re		48,2	32,79

° = Augmentatverlust

Membran: - = nicht vorhanden

+ = vorhanden

Tabelle 4: Parameter des Knochenwachstums mittels Fluoreszenzmarkierung

4.2.1. Knochenneuformationsrate im Ober- und Unterkiefer

In Tabelle 5 sind die durchschnittlichen Knochenneuformationsraten bezogen auf die Lokalisation aufgeführt.

Die statistische Analyse der KNR ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Oberkiefer und Unterkiefer ($P = 0.37$) über die Zeit.

Region	Membran	mean KNR in [μm]		
		3. - 5. Woche (t1)	6. - 8. Woche (t2)	3. - 8. Woche (t3)
Oberkiefer	ja	44,85	29,68	81,26
	nein	41,85	27,58	73,81
Unterkiefer	ja	50,63	34,89	90,49
	nein	49,08	30,7	84,81
Mittelwert		45,85	30,23	81,33

Tabelle 5: Knochenneuformationsrate in Abhängigkeit der Lokalisation

Im Oberkiefer wurde ohne Berücksichtigung der Membranverwendung eine durchschnittliche KNR von $77 \mu\text{m}$ ($58,76 - 89,89 \mu\text{m}$) ermittelt, das entspricht einer täglichen Rate (t3) von $1,83 \mu\text{m}$.

Bei der Auswertung zeigte sich aber eine signifikant geringere Knochenneuformationsrate innerhalb der Oberkieferproben während des zweiten Beobachtungszeitraumes (t2) im Vergleich zum ersten Zeitraum (t1) ($P = 0.015$).

Im Unterkiefer wurde unabhängig von der Membranabdeckung eine durchschnittliche Knochenneuformationsrate von $87,65 \mu\text{m}$ ($78,61 - 94,02 \mu\text{m}$), folglich $2,09 \mu\text{m}$ täglich (t3) dokumentiert.

Im Unterkiefer zeigte die KNR der Präparate im Vergleich zwischen den beiden Beobachtungszeiträumen (t1 zu t2) keinen signifikanten Wert ($P = 0.119$).

Die statistische Auswertung zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraumes (t3) aller Transplantate in Ober- und Unterkiefer keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der KNR bezogen auf die Membranverwendung ($P = 0.58$).

4.2.2. Dehiszenzhäufigkeit

Alle Dehiszenzen wurden innerhalb der ersten fünf Tage postoperativ dokumentiert. In 19 (10 im Oberkiefer, 9 im Unterkiefer) (79,2%) von 24 Kieferhälften traten Dehiszenzen nach dem operativen Eingriff auf. Davon waren 11 mit Membran- und 8 ohne Membranabdeckung. Sie führten in 13 Fällen sogar zum vollständigen Augmentatverlust. Das entspricht einer Dehiszenzhäufigkeit mit Membranabdeckung von 45,8% und ohne Membranabdeckung von 33,3%.

Bezogen auf die Lokalisation waren 41,7% der Dehiszenzen im Oberkiefer zu verzeichnen, davon 60% (6 von 10) mit Membranabdeckung und 40% (4 von 10) mit Periostabdeckung.

Im Unterkiefer traten Dehiszenzen bezogen auf die Lokalisation zu 37,5% auf, davon 55,6% (5 von 9) mit Membranabdeckung und 44,5% (4 von 9) mit Periostabdeckung.

Die folgende Tabelle 6 zeigt die durchschnittliche Knochenneuformationsrate der dehiszenten Bereiche über die Zeit im Vergleich zu den nicht dehiszenten Bereichen. Ein statistischer Unterschied lag nicht vor ($P = 0.79$)

Schwein	Region	links	Membran	Dehiszenz	KNR in [μ m] mit Dehiszenz	
		rechts			3.-5. Woche (t1)	6.-8. Woche (t2)
1	OK	li	-	+	50,67	33,96
		re	+	°	°	°
	UK	li	-	°	°	°
		re	+	°	°	°
2	OK	li	-	-	33,84	21,59
		re		°	°	°
	UK	li		-	46,87	26,97
		re		°	°	°
3	OK	li	+	+	45,07	27,81
		re	-	+	47,13	33,32
	UK	li	+	-	53,06	36,98
		re	-	-	51,28	34,43
4	OK	li	-	°	°	°
		re	+	°	°	°
	UK	li	-	°	°	°
		re	+	°	°	°
5	OK	li	-	-	42,02	30,76
		re	+	+	35,75	21,45
	UK	li	-	°	°	°
		re	+	°	°	°
6	OK	li	+	°	°	°
		re		+	47,46	30,47
	UK	li		°	°	°
		re		+	48,2	32,79
KNR Mittelwert (pro Tag) an Transplantaten mit Dehiszenz					48,35 (2,3)	28,28 (1,3)

° = Augmentatverlust

Membran: - = nicht vorhanden

+ = vorhanden

Dehiszenz: - = nicht vorhanden

+ = vorhanden

Tabelle 6: Knochenneufornation in Abhängigkeit auftretender Dehiszenzen

4.3. Evaluation der Resorption

In dem 12-wöchigen Beobachtungszeitraum zeigt sich eine durchschnittliche Transplantatresorption aller Präparate von 85,2% (71,8 - 96%).

4.3.1 Resorption in Ober- und Unterkiefer

Im Vergleich zwischen Ober- und Unterkiefer ohne Berücksichtigung der Membranverwendung wurden folgende durchschnittlichen Werte dokumentiert: OK: 84,9% (71,8 - 91%) und UK: 85,4% (78 - 96%).

Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde die Lokalisation (OK/UK) zur Resorptionsrate während des 12-wöchigen Beobachtungszeitraumes ausgewertet. Es gab keinen signifikanten Unterschied (P = 0.109).

In der folgenden Tabelle sind die Werte der Resorptionen zusammengefasst.

Schwein	Region	links	Membran	Augmentat- höhe	Augmentat- höhe nach 12 Wochen	Resorption der Höhe	
		rechts		in [cm]	in [cm]	in [cm]	in [%]
1	OK	li	-	1,5	0,42	1,08	71,8
2	OK	li	-	1	0,09	0,91	91
	UK	li	-	1	0,04	0,96	96
3	OK	li	+	1	0,17	0,83	83
		re	-	0,9	0,12	0,78	86,7
	UK	li	+	0,95	0,13	0,82	86,3
		re	-	1	0,22	0,78	78
4	°	°	°	°	°	°	°
5	OK	li	-	1	0,11	0,89	89
		re	+	1	0,11	0,89	89
6	OK	re	+	0,8	0,13	0,67	83,8
	UK	re		0,8	0,15	0,65	81,3

° = Augmentatverlust
 Membran: - = nicht vorhanden
 + = vorhanden

Tabelle 7: Resorption in Abhängigkeit der Lokalisation

4.3.2. Einfluss der Membran auf die Resorption im Vergleich zwischen Ober- und Unterkiefer

Die durchschnittliche Resorptionsrate in den Biopsien mit Membranabdeckung betrug 84,5% (83 - 89%). In den Biopsien mit Periostabdeckung war eine Resorption von 85,8% (71,8 - 96%) zu verzeichnen.

Im Oberkiefer traten unter Verwendung der Membran höhere Resorptionen auf 88,49% (83 - 89%) als ohne Membranverwendung 82,6% (71,8 - 91%). Bezogen auf den Unterkiefer hingegen werden geringere Resorptionsraten unter Membranverwendung gemessen 83,8% (81,25 - 86,3%) als mit Periostabdeckung 87% (78 - 96%).

Die Verwendung der Prototyp-Kollagenmembran hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Resorption im Unter- und Oberkiefer ($P = 0.792$).

4.3.3. Vergleich der Resorptionsrate zwischen Periost- und Membranabdeckung bei auftretenden Dehiszenzen

Die durchschnittliche Resorptionsrate lag unabhängig von der Lokalisation bei Dehiszenzen unter Periostabdeckung bei 79,3% und unter Membranverwendung bei 84,3%. Die Werte sind in Tabelle 8 dargestellt.

Schwein	Region	links	Membran	Dehiszenz	Resorption der Höhe	
		rechts			in [cm]	in [%]
1	OK	li	-	+	1,08	71,8
3	OK	li	+	+	0,83	83
		re	-	+	0,78	86,7
4	°	°	°	°	°	°
5	OK	re	+	+	0,89	89
6	OK	re	+	+	0,67	83,8
	UK	re		+	0,65	81,3

° = Augmentatverlust
Membran: - = nicht vorhanden
+ = vorhanden
Dehiszenz: + = vorhanden

Tabelle 8: Resorptionsrate bei vorhandenen Dehiszenzen

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methodik

5.1.1. Gesteuerte Knochenregeneration (GBR)

Im Zuge der gesteuerten Knochenregeneration mit Membranen werden sowohl nicht-resorbierbare (e-PTFE, Gore-Tex[®]), als auch resorbierbare Materialien (Bio-Gide[®]) verwendet. Nicht-resorbierbare Membranen müssen wieder entfernt werden, wodurch der neugebildete Knochen freigelegt wird. Das kann zu stärkeren Resorptionen führen (Pfeifer 1965), in diesem Zusammenhang stehen auch Membranexpositionen. (Lang et al. 1994) Resorbierbare Membranen sind der überlegene Lösungsansatz (Hutmacher und Hürzeler 1995), sie bestehen aus einem Faserprotein, das L-4-Hydroxyprolin und eine Triplehelix aufweist. Dadurch wird es ausgezeichnet in das Gewebe integriert, die Wundheilung beschleunigt und das Blutkoagulum stabilisiert. (Joos 1985, Hutmacher und Hürzeler 1995) Natürliches Kollagen tierischen Ursprungs wird genutzt, da es den Heilungsprozess fördern soll. (Cornelini et al. 2004) Die nach Hardwick notwendigen Anforderungen an resorbierbare Membranen werden von der Bio-Gide-Pro[®] - Membran erfüllt. (Hardwick et al. 1994) Das Problem der Antigenität bei xenogenen Kollagenpräparaten wurde durch Qualitätskriterien laut Hersteller gelöst. Die in der Studie verwendete Bilayermembran Bio-Gide-Pro[®] (Biomaterials - Geistlich, Wolhusen, Schweiz) wies eine experimentell chemische Quervernetzung auf und sollte durch ihr interkonnektierendes Porensystem den operativen Eingriff erleichtern und die Heilung beschleunigen. (Rothamel et al. 2004) Die adhäsive Membran sollte eine Barrierefunktion zwischen schnell profilierendem Bindegewebe und langsam profilierendem Knochen garantieren.

Rothamel et al. untersuchten unter anderem die native Bio-Gide[®] - (BG) mit einer einfach, dreifach und vierfach mittels zero-length-Technik quervernetzten Bio-Gide[®] - Kollagenmembran (VN1, VN2 und VN3) in-vitro sowie in tierexperimentellen Studien an 40 Wistar-Ratten. Die Studienergebnisse bezogen sich ausschließlich auf die Membraneigenschaften. Es wurde gezeigt, dass die chemisch experimentelle Quervernetzung des nativen porkinen Typ I - und III - Kollagens vergleichbare oder sogar bessere Ergebnisse gegenüber des ursprünglichen nativen Kollagens hinsichtlich Biokompatibilität, Gewebeintegration und Vaskularisation erzielte trotz der verstärkt

auftretenden Entzündungsreaktion bei dessen Abbau. Die Membran zeigte verlängerte Degradationszeiten, was den Schluss zuließ, dass diese chemische Quervernetzung zu einer Resorptionsverlangsamung führte. Die Resorptionsstabilität konnte abhängig vom Vernetzungsgrad ($VN1 < VN2 < VN3$) gesteigert werden. Nach dieser Studie wird der Bio-Gide-Pro® - Kollagenmembran eine Resorptionszeit zwischen vier und acht Wochen zugesprochen. Zusätzlich wurde beim Abbau der Membran eine Fremdkörperreaktion durch verstärktes Einwandern mehrkerniger Riesenzellen festgestellt, die die Gewebeintegration des Materials beeinflusste. (Rothamel et al. 2004) Die Exposition der quervernetzten Kollagenmembran fiel in der vorliegenden Studie mit 58,3% vergleichsweise hoch aus. Die Ergebnisse der zeitgleich durchgeführten tierexperimentellen Studie am Göttinger Minischwein mit avaskulärer Fibula lieferte sogar eine Membranexposition von 100%. Der Vergleich mit anderen tierexperimentellen Studien am Großtier kann nicht geführt werden, da die Studie in Vorbereitung einer möglichen Markteinführung für den humanen Bereich stattfand und nach den Ergebnissen auf weitere Tierstudien verzichtet wurde.

In einer humanen Studie von Becker et al. wurde an Dehiszenzdefekten eine native (BG) mit einer chemisch quervernetzten Kollagenmembran (VN) verglichen, die Art der Quervernetzung war identisch zur verwendeten Membran der vorliegenden Studie. Die vierwöchigen Untersuchungen ergaben, dass die VN-Membran der BG-Membran in Bezug auf die Knochenregeneration gleichwertig ist. Die quervernetzte Kollagenmembran zeigte eine signifikant erhöhte Entzündungsreaktion, die im Fall einer vorzeitigen Exposition dafür verantwortlich zu sein schien, dass die Weichteilheilung beeinträchtigt wurde oder diese sogar zu einer Wundinfektion führte. (Becker et al. 2009) Schwarz et al. (Düsseldorf) postuliert sogar: „*Quervernetzung verhindert Gewebeintegration*“. In diesem Zusammenhang steht, dass ausgeprägte Expositionen und persistierende Entzündungen die Knochenregeneration beeinflussen. (Schwarz et al. 2004, Rothamel et al. 2004) In der Arbeitsgruppe um Lang et al. wurden in einer humanen Studie quervernetzte mit nativen Geistlich Bio-Gide® - Membranen an unterschiedlich großen Kieferdefekten über einen Zeitraum zwischen 6 und 8 Wochen verglichen. Bei den quervernetzten Kollagenmembranen war eine höhere Frequenz von Expositionen ohne Spontanheilung zu verzeichnen. Die Art der Quervernetzung erfolgte im Gegensatz zur untersuchten Membran der vorliegenden Studie durch

selbstverstärkte Polyglykolsäure, ein Vergleich ist daher nicht möglich. (Lang et al. 1994)

Die tierexperimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten die hypothetisch getroffenen Aussagen von Rothamel et al. überprüfen und die Eignung der chemisch quervernetzten Prototyp-Kollagenmembran durch Anwendung im GBR-Verfahren mit Verwendung von Füllkörpern (autologer Knochen) untersuchen. Trotz der in-vitro und in-vivo am Kleintier ermittelten gesteigerten Resorptionsstabilität brachte die Membran am Großtier weder hinsichtlich der Knochenneubildung, noch der Resorption oder der Dehnsenzzhäufigkeit einen statistisch signifikanten Vorteil gegenüber der reinen Periostabdeckung.

5.1.2. Tiermodell

Um die Problematik hinsichtlich kraniofazialer Knochendefekte darstellen zu können, sollte ein Tiermodell verwendet werden, welches ein ideales Verhältnis zwischen Körpergröße und -gewicht aufzeigt (Beglinger et al. 1975) und hinsichtlich des Knochenstoffwechsels (trabekuläre und kortikale Umbauprozesse eingeschlossen) und der Knochenstruktur eine sehr große Ähnlichkeit zum Menschen aufweist. (Thorwarth et al. 2005) Das Göttinger Minischwein schien für die geplanten Eingriffe besonders geeignet, auch wegen der Vergleichbarkeit mit anderen Studien, v.a. der von Olsen et al., bei der in erster Linie durch das Auftreten ausgeprägter Dehnsenzen und Implantatverluste die Infektsistenz beim Göttinger Minischwein kritisch untersucht wurde. (Olsen et al. 2004) Die Tiere konnten in Gruppen gehalten werden, da ausschließlich weibliche Schweine untersucht wurden. Das ermöglichte sowohl Bewegungsfreiraum als auch sozialen Kontakt zu Artgenossen. (Pearce et al. 2007) Weitere Vorteile waren die helle Haut mit spärlicher Behaarung, die leicht zugänglichen Ohrvenen (Pearce et al. 2007), die unkomplizierte Heilung sowie die Indolenz nach chirurgischen Eingriffen. Es konnte ein ähnliches Instrumentarium wie beim Menschen verwendet werden, zudem ist die Biomechanik vergleichbar. (Wissing et al. 1990) Hervorzuheben ist, dass auch bei geringer Fallzahl eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich ist (Hönig und Merten 1993, Pearce et al. 2007), selbst bei der Reduktion aufgrund von Dehnsenzverlusten auf 11 Proben wie in der vorliegenden Studie ist diese zulässig. In anderen Tierversuchsstudien sind Versuchsgruppen mit bis zu 15 Tieren zu finden, die Anzahl der untersuchten Proben übersteigt aber selten die

der vorliegenden Studie, da vorwiegend in einem Kiefer augmentiert wurde. (Schliephake und Aleyt 1998, Kirchhoff et al. 2011) Die Haltung der Tiere war unkompliziert, kostengünstig und vor allem die Infektionsresistenz sprach für dieses Versuchstier. Gegen den letzten Aspekt sprach indes die Studie von Olsen et al., die in ihren Untersuchungen mit nativen Kollagenmembranen ausgeprägte Dehiszenzen feststellten. (Olsen et al. 2004) Auch in der vorliegenden Studie zeigten sich bei den Befundkontrollen ausgedehnte Dehiszenzen, die in 54,1% (13 von 24) der Fälle zu einem vollständigen Transplantatverlust führten. Bei den verbliebenen und histologisch untersuchten 11 Präparaten traten in 6 Fällen (54,6%) eine Dehiszenz auf, zwei Drittel davon waren membranaugmentiert (4 von 6). Als Ursachen werden das chirurgische Vorgehen, die lokale mechanische Reizung, das postoperative Verhalten der Tiere und die experimentell chemische Quervernetzung der Kollagenmembran selbst angesehen. Wegen der fehlenden Mundhygiene wurde eine dreiwöchige Antibiotikatherapie verordnet. Diese diente nicht nur dem Infektionsschutz, sondern sollte zusätzlich das erfolgreiche Einheilen sichern. Um die mechanische Belastung auf die Transplantate so gering wie möglich zu halten, wurden die Tiere vier Wochen mit weicher Kost gefüttert und auf Stroh in den Gehegen verzichtet. Diese Maßnahmen sollten sowohl interne als auch externe Prozesse auf die Wundheilung minimieren und ein repräsentatives Resultat der geschlossenen Transplantatheilung simulieren. Als Nachteil ist das teilweise ängstliche und aggressive Verhalten der Tiere anzuführen und dass der Umgang mit Schweinen als Versuchstiere schwieriger ist als bei Ziegen oder Schafen. (Pearce et al. 2007) Dass auch das Versuchstier (Göttinger Minischwein) eine potentiell mögliche Ursache für auftretende Dehiszenzen darstellt, kann nicht ausgeschlossen werden. Schafe stellen laut Wissing ein vergleichbar, alternatives Versuchsmodell dar, jedoch die knöcherne Feinstruktur und die Gefäßsituation sind verglichen mit dem Menschen sehr unterschiedlich. Kaninchen können aufgrund des kleineren Verhältnisses zwischen Körpergröße und -gewicht im Vergleich zum Schwein und der sehr schnell ablaufenden knöchernen Regeneration ebenfalls nicht als Modell für die in der Studie untersuchte Indikation verwendet werden. Hunde zeigten in Untersuchungen große Schwankungen während der Knochenregeneration und eine hohe Infektanfälligkeit. Ratten besitzen kein Haverssches Remodeling und sind für die Beurteilung der Knochenneubildung im kortikalen Knochen auch eher ungeeignet. (Wissing 1990)

5.1.3. Polyfluorochrome Sequenzmarkierung

Eine bewährte Methode die Knochenneuf ormation im Tierversuch zu ermitteln, ist die polyfluorochrome Sequenzmarkierung, die seit den siebziger Jahren ihre Anwendung findet. (Rahn 1976) Die drei in dieser Studie verwendeten Fluorochrome Xylenorange, Calceingrün und Alizarin waren unter Verwendung ihrer jeweiligen Filter mikroskopisch meist gut voneinander zu unterscheiden und die Abstände zwischen den einzelnen Banden problemlos zu ermitteln. In den drei Fällen, als Xylenorange und Alizarin nicht optimal erkennbar waren, wurde der Filter TYP 02 zur Beurteilung im sogenannten „Livebild“ verwendet. Ob die Qualität der mehrdimensionalen Bildaufnahme mit einer Änderung der Anregungsfilter zu optimieren ist, gilt es zu prüfen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie an Göttinger Minischweinen wurde versucht herauszufinden, ob sich das Heilungs- bzw. Resorptionsmuster mit der Auflage einer quervernetzten resorbierbaren Prototyp-Kollagenmembran (Bio-Gide-Pro[®]) auf ein avaskuläres Beckenkammtransplantat beeinflussen lässt. Dazu sollen zunächst die Fragestellungen beantwortet werden.

Verwendung der Bio-Gide-Pro[®] - Kollagenmembran bezogen auf:

5.2.1. Die Knochenneuf ormationsrate nach Augmentation:

Oberkiefer

Unterkiefer

5.2.2. Die Resorptionsrate nach 12 Wochen

Oberkiefer

Unterkiefer

5.2.3. Die Dehiszenzenhäufigkeit nach 12 Wochen

5.2.1. Knochenneuformationsrate

Eine Zielstellung der vorliegenden Studie war die Erfassung der durchschnittlichen Knochenneuformationsrate (KNR) unter Verwendung einer Membran im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer reinen Periostabdeckung. Derzeit existiert keine Studie, weder human noch tierexperimentell, die vergleichend die KNR mit reiner Periostabdeckung zu einer resorbierbaren quervernetzten Kollagenmembran fluoreszenzmikroskopisch über einen Zeitraum von 6 Wochen untersuchte.

Nach Studien von Laiblin und Jaeschke zur Untersuchung des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung liegt die allgemeine mittlere KNR beim adulten Göttinger Minischwein zwischen 1,2 und 1,5 μm pro Tag. (Laiblin und Jaeschke 1979) Piert et al. fanden in Untersuchungen zum Knochenmetabolismus in gesunden Schweinen mit einer dynamischen PET-scan-Methode eine mittlere KNR von 1,74 μm pro Tag im Bereich des Ileums und 1,84 μm pro Tag im Bereich der Vertebrae. (Piert et al. 2001) Nach Studien zur Ermittlung der Knochen- bzw. Frakturheilung von Schenk und Willenegger liegt die Rate beim Menschen durchschnittlich bei 0,9 μm am Tag, Pearce zufolge zwischen 1 und 1,5 $\mu\text{m}/\text{d}$. (Schenk und Willenegger 1977; Pearce et al. 2007)

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten bei Membranverwendung Werte von 2,04 $\mu\text{m}/\text{d}$ gegenüber 1,89 $\mu\text{m}/\text{d}$ zur reinen Periostabdeckung. Unter Verwendung der Kollagenmembran ergaben sich tendentiell höhere Knochenneuformationsraten ohne dass sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergab. Die durchschnittliche KNR nach Beckenkammaugmentation lag bei 1,94 μm pro Tag für den gesamten 6-wöchigen Zeitraum (t3). Es wurde festgestellt, dass sich die KNR vom ersten (t1) zum zweiten (t2) Untersuchungszeitraum von 1,09 $\mu\text{m}/\text{d}$ auf 0,72 $\mu\text{m}/\text{d}$ reduzierte. Diese Beobachtung scheint gleichzeitig eine Verlangsamung der KNR während der sechs Wochen (t3) zu belegen. Es finden sich in der Literatur nur wenige fluoreszenz-mikroskopische Studien zur Ermittlung der KNR. In einer Studie an Göttinger Minischweinen von Hönig und Merten, die den Knochenheilungsprozess nach einer Tibiafraktur untersuchte, wurde eine durchschnittliche KNR von 1,2 μm am Tag ermittelt. Zudem wurde eine Verminderung der Knochenneuformationsrate während eines Zeitraumes von zehn Wochen festgestellt. (Hönig und Merten 1993) Diese fiel deutlich geringer aus als 33,9% nach 6 Wochen (t3) wie sie in der vorliegenden Studie ermittelt wurde.

Eine Studie von Nkenke et al. bewies eine Reduktion der Knochenneuformationsrate von 1,8 μm auf 1,6 μm pro Tag innerhalb von 12 Wochen. Im vierwöchigen Turnus wurden teilweise unbelastete Titanimplantate in den linken Mandibeln von sieben Göttinger Minischweinen untersucht. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der KNR zwischen belasteten und unbelasteten Implantaten gefunden werden. Ausschlaggebendes Kriterium für den Implantaterfolg schien eine starre Schienung der Implantate zu sein, da provisorisch befestigte Implantatversorgungen durch unkontrollierte Kaukräfte teilweise verloren gingen. (Nkenke et al. 2003) Eine Implantat-Studie an säuregeätzten WI.TAL[®]-Implantaten am Göttinger Minischwein ergab eine durchschnittliche KNR von 2,32 $\mu\text{m}/\text{d}$. Die KNR reduzierte sich innerhalb von 6 Wochen um 14,6%, dadurch lässt sich eine Verlangsamung der KNR abzeichnen. Eine tendentiell höhere KNR zeigte sich in dieser Studie bei Unterkieferpräparaten, obwohl kein statistischer Unterschied festgestellt wurde. (Rühe et al. 2011) Das deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, bei der auch eine durchschnittlich geringere KNR im Oberkiefer gemessen wurde als im Unterkiefer. Als mögliche Ursache wird die Knochenqualität diskutiert. (Lekholm und Zarb 1985, Misch 1990, Norten und Gamble 2001, Engels 2003) Im Vergleich zur vorliegenden Studie wurde keine Membran verwendet und die KNR nicht nach Augmentation im Transplantat sondern im Bereich der Implantate gemessen. Dadurch ergibt sich eine bedingte Vergleichbarkeit, aber die ähnliche Größenordnung der ermittelten KNR ist bei gleichem Versuchstier zu erwähnen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lagen verglichen mit den anderen Studien im oberen Bereich. Lokalisation und Abdeckungsart zeigten keinen Einfluss auf die KNR, daraus lässt sich schlussfolgern, dass sie von der Membran nicht beeinflusst wurde.

Eine humane Studie von Heberer et al. bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Sie untersuchten im zweizeitigen Verfahren unter Verwendung von autologen Blocktransplantaten aus dem Ilium und endossaler Implantate die Knochenneuformationsrate bei verkürzter Einheilzeit von drei Monaten im zahnlosen Oberkiefer bei selektiver Anwendung einer nativen resorbierbaren Kollagenmembran zur einfachen Periostabdeckung. Die zusätzliche Abdeckung des Augmentates mit einer resorbierbaren Kollagenmembran ergab, wie in der vorliegenden Studie, in Hinblick auf die KNR keinen signifikanten Unterschied zur reinen Periostabdeckung. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurden die Proben ausschließlich histologisch

ausgewertet und lediglich ein Ausschnitt des Transplantates anhand prozentualer Anteile von neuem Knochen, Bindegewebe und nekrotischem Knochen beurteilt. (Heberer et al. 2009) Unabhängig von der Abdeckungsart zeigten die apikalen Knochenproben höhere Anteile vitalen Knochens verglichen mit den koronalen. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung der Studien an Meerschweinchen (guinea-pigs). Die Revaskularisation erfolgt eher vom Alveolarkamm selbst als vom Periost. Es ist bisher nicht geklärt in wie weit eine Membraninsertion Einfluss auf die KNR nimmt. Das Periost dient der Ernährung und Stabilisierung des Knochens (Chanavaz 1995), es unterstützt den Knochen demnach sowohl biologisch als auch mechanisch. Yiannakopoulos et al. untersuchten in ihrer Studie die Bruchfestigkeit, Steifigkeit und Energieabsorption sowohl an Femur als auch an Tibia unter Periosterhalt gegenüber Membranabdeckung an 30 männlichen Wistar-Ratten. Sie stellten keinen negativen Einfluss einer Membran zwischen Periost und Knochen fest und ermittelten keine geringere Knochenneuformationsrate auf membranbedeckter Seite verglichen mit der reinen Periostabdeckung. (Yiannakopoulos et al. 2008) In der Studie von Donos et al. an 30 männlichen Wistar-Ratten wurde die Knochenregeneration anhand einer resorbierbaren (Resolut®) und einer ePTFE-Membran (Gore-Tex®) im split-mouth-Verfahren getestet. Im Falle einer Membranexposition unabhängig von der Membranart, wurde eine vollständige Resorption des Augmentates verzeichnet. Eine Knochenneubildung der nicht kalzifizierten Präparate ließ sich nur an einer Probe nachweisen, die keine Membran aufwies. (Donos et al. 2002a) Rückschlüsse mit der vorliegenden Studie sind schwierig, da sich weder die Versuchstiere, noch die resorbierbare Membran (Resolut®) noch das verwendete Transplantat aus dem Unterkieferkamm ähnelten. Als Kontrollgruppe diente nicht eine Periostabdeckung sondern eine ePTFE-Membran (Gore-Tex®).

Die Resorptionsrate ist nicht zwangsläufig von auftretenden Dehiszenzen abzugrenzen, wodurch sich bei der Diskussion beider Abschnitte teilweise Überschneidungen ergaben.

5.2.2. Resorptionsrate

Die durchschnittliche Augmentatresorption bei reiner Periostabdeckung lag bei 84,63% (OK: 88,49%, UK: 87%) und unter selektiver Verwendung der Kollagenmembran bei 84,45% (OK: 85,1%, UK: 83,8%) ohne signifikanten Unterschied. In einer split-mouth-

Studie von Donos et al. an 51 Wistar-Ratten wurde gezeigt, dass die Augmentation mit autologem, kortikospongiösem Knochen aus dem Os ischii in Kombination mit einer GBR mit einer nicht resorbierbaren Membran (e-PTFE) deutlich im Vorteil ist, solange der Primärverschluss während der ganzen Einheilphase erhalten bleibt. Als Kontrollgruppe diente die einfache Periostabdeckung, bei der weder im Oberkiefer noch im Unterkiefer ein einheitliches Resorptions- bzw. Einheilmuster zu erkennen war. Es zeigten sich sowohl bei periostbedeckten Proben als auch bei Membranabdeckung massive Resorptionen der Augmentate. (Donos et al. 2002c) Als Ursache für ausgedehnte Resorptionen wurde das zwischen Transplantat/Empfängerbett und dem Mikroimplantat gebildete Bindegewebe und die damit einhergehenden Lageveränderung des Transplantates ausgemacht. Diese Ansicht wird durch Beobachtungen in anderen Studien belegt, in denen gezeigt wurde, dass Mikrobewegungen des Knochenaugmentates eine Transplantatresorption unterstützen. (Phillips und Rahn 1988, 1990; Chen und Glowacki 1994) Das trifft für die vorliegende Studie nicht als Grund für die auftretenden Resorptionen zu, da bei Transplantatentnahme die Mikroschrauben nicht gelockert waren. Fehlten die Mikroschrauben, fehlte auch das gesamte Augmentat. Weitere Vergleichsmöglichkeiten zur vorliegenden Studie sind aufgrund des anderen Versuchstieres und der anderen Membranart nicht zu erheben. In einer Studie von Donos et al. an 25 männlichen, 6 Monate alten Albinoratten wurde die Langzeitstabilität (11 Monate) autologer Knochentransplantate unter selektiver Verwendung einer e-PTFE-Membran verglichen. Diese semipermeable, poröse, nicht resorbierbare Membran wurde gewählt, da sie eine transmembranöse Angiogenese vollständig unterbindet bei vorhersagbaren Knochenregenerationen. (Gottlow et al. 1986, Donos et al. 2005) Eine weitere Studie der Arbeitsgruppe Donos et al. zeigte an 30 Wistar-Ratten, dass ein Konstanthalten des Transplantates durch Auflage sowohl einer resorbierbaren als auch nicht resorbierbaren Membran nur unter der Voraussetzung möglich ist, dass ein primärer Wundverschluss über die gesamte Einheilungszeit hinweg aufrecht erhalten werden kann. Traten in dieser Studie Membranexpositionen auf oder lag die Membran gar frei - am häufigsten nach Augmentation im Oberkiefer - zeigten die Transplantate teilweise vollständige Resorptionen, fibröse Einkapselung oder Abstoßung der Mikroimplantate. Anhand dieser und anderer Studien schloss man, dass die verwendeten Membranen einen entscheidenden und vorhersagbaren Einfluss auf die Resorptionsrate bei der Alveolarkammaugmentation mit dem GBR-Verfahren ausüben können. (Buser et al.

1996, Donos et al. 2002a) Eine Studie von Yang et al. verglich die unterschiedliche Resorptionsrate von einer resorbierbaren Kollagenmembran mit einer reinen Periostabdeckung nach Beckenkammaugmentation in Schädeln männlicher Kaninchen. Beide Abdeckungsarten beugten dem Einwachsen von Bindegewebe vor und reduzierten die Augmentatresorption. Verglichen mit der Blockaugmentation ohne Abdeckung (Kontrollgruppe) zeigten beide Arten einen signifikanten Unterschied, zwischen den Abdeckungen (Periost vs. Kollagenmembran) konnte hingegen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. (Yang et al. 2014)

5.2.3. Dehiszenzhäufigkeit

Dehiszenzen nach Augmentationen im Bereich des Kieferkammes scheinen im Tierversuch ein nicht planbares Risiko darzustellen.

In der vorliegenden Studie, die die chemisch quervernetzte Bio-Gide-Pro[®] - Kollagenmembran im Tierversuch testete, kam es während des Heilungsverlaufes in 45,8% der membranbedeckten Kiefersegmente zum Auftreten von Dehiszenzen und einer daraus resultierenden Membranexposition. Im Vergleich dazu gab es in der Kontrollgruppe zu 33,3% Dehiszenzen. Unabhängig von der Lokalisation traten bei Dehiszenzen unter Membranverwendung Resorptionen von 84,28% und unter Periostabdeckung von 79,25% auf. Membranexpositionen führten zu ausgedehnten Resorptionen, die höchste Resorptionsrate zeigte sich allerdings bei einer Unterkieferprobe mit Periostabdeckung.

Eine Studie von Olsen et al. untersuchte eine native resorbierbare Kollagenmembran (Bio-Gide[®]) an Minischweinen ohne Kontrollgruppe. Diese lieferte eine Dehiszenzhäufigkeit von 100% und wurde vorzeitig abgebrochen. (Olsen et al. 2004) Da die Dehiszenzhäufigkeit bei nativen Membranen in vergleichbaren Studien deutlich geringer ausfällt, liegt es nahe, dass das Versuchstier einen entscheidenden Einfluss auf das Auftreten von Dehiszenzen zu nehmen scheint. Strietzel sah die Problematik zur Häufung der Membranexpositionen in der überlappenden Lage der Membran von vestibulär nach oral an. (Strietzel 2001) Diese konnte auch bei der Defektmorphologie in der vorliegenden Studie nicht vermieden werden und führte möglicherweise zur Dehiszenz. Der Einsatz quervernetzter Kollagenmembranen

xenogener Herkunft zeigte in Studien auch bei Auftreten einer vorzeitigen Membranexposition eine Reepithelialisierung der Dehiszenz über der Membran. (Strietzel 2001) Bei der bereits unter 5.2.2. aufgeführten Studie von Donos et al. an 51 Wistar-Ratten wurde ein intraoraler Zugang im Oberkiefer mit einem extraoralen im Unterkiefer verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass bei Unterkieferproben mit extraoralem Zugang ausgedehnte Dehiszenzen in geringerem Maße auftraten als bei Proben im Oberkiefer mit intraoralem Zugang. (Donos et al. 2002c) Zwar wurden bessere Ergebnisse in Bezug auf den extraoralen Zugang erzielt, die Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus ist aber nicht möglich. Lediglich der intraoral gewählte Zugang bietet diese Vergleichbarkeit. Die Ursachen für das häufige Auftreten von Dehiszenzen im Tierversuch mit Schweinen lassen sich nur mutmaßen. Das Tierfutter wurde postoperativ eingeweicht und das Stroh aus dem Gehege entfernt, beides scheidet als Ursache weitestgehend aus. Das Operationsgebiet liegt in einem mastikatorisch stark beanspruchten Gebiet und durch die postoperative Analgesie fehlt die Schonung dieses Bereiches. Die Tiere könnten in unbeobachteten Momenten in die Gitterstäbe ihres Geheges gebissen haben, das zu einem Reißen der Naht oder zum Ausbeißen des gesamten Augmentates geführt haben könnte. Das Blutkoagulum soll durch ein festes Fixieren des Transplantates auf das Lager möglichst klein gehalten werden, um die Revaskularisierung nicht zu beeinträchtigen. Bei auftretender Nahtdehiszenz wäre das nicht mehr gewährleistet. Donos et al. untersuchten in einer Studie an 20 Albinoratten den Effekt von kortikospongiösen Transplantaten bei der Alveolarkammaugmentation in der Maxilla unter Verwendung einer nicht resorbierbaren e-PTFE-Membran mit reiner Periostabdeckung. Im Falle einer Membranexposition (13 von 20 innerhalb von 90 Tagen) kam es in gleichem Maße zur Dehiszenz mit Augmentatverlust (65%). Die nicht membranbedeckten Kiefersegmente der Kontrollgruppen zeigten lediglich eine Dehiszenz. Möglicherweise ist ein Mikrospace zwischen Transplantat und maxillärem Knochen ursächlich für das Auftreten von Dehiszenzen. Nicht-knochenbildende Zellen proliferierten offenbar in den Zwischenraum und separierten das Augmentat vom ortsständigen Knochen. Diese Annahme scheint aufgrund des Vorhandenseins von Bindegewebe in der Mikrolücke wahrscheinlich. (Donos et al. 2002b) Es ist durchaus vorstellbar, dass sich trotz der Fixation mit zwei Osseosyntheseschrauben (Medartis® Ø 2.0 mm, Länge: 10 mm, Basel, Schweiz) ein Mikrospace zwischen Augmentat und ortsständigem Knochen gebildet hat und die dadurch entstandenen Mikrobewegungen ein Einwachsen von

Bindegewebe in den Spalt begünstigten und zu einer Dehiszenz mit Augmentatverlust führten. Mit der vorliegenden Studie ist diese Annahme aber weder zu bestätigen noch zu diskutieren, da das Vorkommen von Bindegewebe zwischen Transplantat und ortsständigem Knochen nicht untersucht wurde. Das operative Vorgehen erfolgte mit großer Sorgfalt. Die Schnittführung wurde der Augmentatgröße angepasst, Knochenkanten geglättet und scharfe Kanten der Osseosyntheseschrauben entweder überlappend durch Mobilisation des Mukoperiostlappens oder zusätzlich mit einer Membran abgedeckt. Die Wunde wurde spannungsfrei und dicht über dem Defekt geschlossen. Trotz dieser Maßnahmen zur Dehiszenzprophylaxe können unbemerkt Komplikationen aufgetreten sein z.B. durch die fehlende postoperative Schwellungsprophylaxe mithilfe lokaler Kühlung. Nicht nur die mechanische Reizung und die Operation können Ursachen für das Auftreten von Dehiszenzen sein, sondern auch das Versuchstier selbst. Die Applikation der quervernetzten resorbierbaren Prototyp-Kollagenmembran scheint Einfluss auf die Dehiszenzhäufigkeit zu nehmen.

Von Arx und Buser untersuchten in einer Studie an 42 Patienten die native Bio-Gide[®] - Membran an horizontalen Kieferkammdefekten und ermittelten eine Dehiszenzrate von 9,5%. (von Arx und Buser 2006) Friedman et al. untersuchten in einer humanen Studie eine Kollagenmembran (Ossix[™], Testgruppe) mit einer e-PTFE-Membran (Gore-Tex[®], Kontrollgruppe). Während sich das Auftreten von Dehiszenzen nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen unterschied (64% bei der Testgruppe zu 71% in der Kontrollgruppe), zeigte sich in der Testgruppe eine vollständige Reepithelialisierung über dem Defekt vier Wochen nach Nahtentfernung, während in der Kontrollgruppe Heilungstendenzen zu verzeichnen waren. Man schlussfolgerte daraus, dass die ribotische Quervernetzung der Ossix[™]-Membran einer enzymatischen Spaltung durch Collagenasen entgegenwirkt und resorbierbare Membranen mit verlängerter Standzeit das Ergebnis der GBR entscheidend verbessern würden. (Friedmann et al. 2002) Dieser Zusammenhang ist mittlerweile durch zahlreiche Studien belegt. 2011 untersuchten Friedmann et al. in einer humanen Pilotstudie mittels GBR-Verfahren das Auftreten von Dehiszenzen anhand zweier Membranarten (Ossix[™] = Testgruppe und Bio-Gide[®] = Kontrollgruppe). Die quervernetzte Kollagenmembran lieferte eine Dehiszenzrate von 70%, die native Kollagenmembran der Kontrollgruppe eine von 55%. (Friedmann et al. 2011) In einer Studie von Tal et al. wurden an 52 Patienten 52 Knochendefekte randomisiert mit einer quervernetzten (Ossix[™]) oder einer nativen

Kollagenmembran (Bio-Gide[®]) versorgt. Das Resultat war, dass die quervernetzte Membran eine Expositionsrate von 50% und die native eine um 23% lieferte. (Tal et al. 2008) In einer randomisierten Doppelblindstudie von Annen et al. an 16 Patienten wurde eine native (BG) mit einer quervernetzten (VN) Kollagenmembran mit verlängerter Resorptionszeit verglichen. Es konnten keine Vorteile zugunsten der VN-Membran ermittelt werden. Wegen der auftretenden Dehiszenzen von 56% in der Gruppe der VN-Membran wurde der Versuch abgebrochen. (Annen et al. 2011)

Vergleicht man die Ergebnisse der aufgeführten Studien miteinander, so scheinen Dehiszenzen bei nativen Kollagenmembranen deutlich geringer auszufallen als bei quervernetzten Kollagenmembranen bzw. bei e-PTFE-Membranen. Die Ausheilung der Dehiszenzen über dem Defekt scheint sich indes entgegengesetzt zu verhalten. Vergleicht man hingegen die Ergebnisse der aufgeführten VN-Studie mit den eigenen Resultaten, so scheint die Art der Quervernetzung unabhängig vom Studiendesign (human oder Tier) zusätzlich einen entscheidenden Einfluss auf die Dehiszenzbildung auszuüben. Es lässt sich vermuten, dass die Entzündung, die zu einer Dehiszenz führte, möglicherweise von der experimentell quervernetzten Membran selbst ausging. In diesem Zusammenhang steht, dass Membranexpositionen oder persistierende Entzündungen die Knochenregeneration beeinträchtigen können. Schwarz et al. gehen sogar soweit zu sagen, dass die chemische Quervernetzung der entscheidende Faktor zu sein scheint. (Rothamel et al. 2004, Schwarz et al. 2006b)

In Studien wurde belegt, dass die Transplantatversorgung durch Gefäßeinsprossung aus dem Implantatbett erfolgt. (Buser et al. 1990; Schmid et al. 1994; Simion et al. 1994; Jovanovic et al. 1995) Eine vollständige Abdeckung des Transplantates ist dennoch von entscheidender Bedeutung, da bei auftretender Wunddehiszenz die Heilung lediglich über sekundäre Granulation erfolgt, die ggf. nachoperationsbedürftig ist und einen erhöhten chirurgischen Aufwand sowie Nachsorge nach sich zieht. Das bestätigt eine Studie von Donos et al., bei der die Volumenstabilität unter Membranabdeckung nur erhalten werden konnte, indem die Membran sauber adaptiert und während der gesamten Heilungsphase mit Mucosa bedeckt war. (Donos et al. 2002b) Der Gewebeverschluss ist abhängig vom Verlauf der Inzisionslinie sowie der Beschaffenheit (Dicke) der bedeckenden Gingiva am Augmentationsort. (Park und Wang 2007)

Ein dichter Wundverschluss unabhängig vom verwendeten Material und eine Vermeidung der Dehiszenzentstehung durch chirurgische und postoperative Maßnahmen sind von entscheidender Bedeutung.

5.3. Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die in dieser Studie verwendete Membran keinen direkten Vorteil hinsichtlich der Knochenneuformationsrate und der Resorptionsminimierung im Vergleich zur reinen Periostabdeckung brachte. Es traten in zwei Drittel Dehiszenzen auf, die hohe Resorptionstendenzen zur Folge hatten. Das kann einerseits durch die verwendete Prototyp-Kollagenmembran andererseits aufgrund des Versuchstiers begründet sein. Die vielversprechenden Hypothesen, die anhand von in-vitro und in-vivo Studien hinsichtlich dieser Bio-Gide-Pro[®] - Kollagenmembran getroffen wurden, konnten in der vorliegenden Studie am Großtier nicht bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der bereits beschriebenden Nachteile hinsichtlich des Versuchstieres war zudem die Dehiszenzhäufigkeit auf der Membranseite erhöht. Das autologe kortikospongiöse Beckenkammtransplantat als Knochenersatzmaterial und die Lokalisation scheinen keinen Einfluss auf die Ergebnisse ausgeübt zu haben.

Die Resultate dieses Versuches führten dazu, dass mit der verwendeten quervernetzten Kollagenmembran (Bio-Gide-Pro[®]) keine weiteren tierexperimentellen oder humanen Studien durchgeführt wurden.

6. Verzeichnis

6.1. Material und Methoden: Fußnoten und Endnoten

- ^{1°} Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi)
- ^{2°} sniff Mpig-E, energiereduziert V4133-000, ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland
- ^{3°} Hoffmann GmbH Qualitätswerkzeuge, München, Deutschland
- ^{4°} Aesculap - eine Sparte der B. Braun Melsungen AG, Tuttlingen, Deutschland
- ^{5°} Für einen Liter: Formalin 37% (324 ml), Ethanol 100% (540 ml), 0,1 mol / pH = 7,3 Natrium-Barbital-Puffer (130 ml bestehend aus 2,06% Na-Barbital (58,1 ml) und Salzsäure 0,1% (41,9 ml) und Glucose (6 g)
- ^{6°} Phoenix 3000, Firma Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland
- ^{7°} Merck 806061, Merck, Darmstadt, Deutschland
- ^{8°} Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
- ^{9°} B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz
- ^{10°} Histobond Marienfeld ISO 8037/1 Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
- ^{11°} MDS, Merck, Darmstadt, Deutschland
- ^{12°} 65 g/m², Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- ^{13°} Eisenhämatoxylin nach Weigert A Hämatoxylin (C.I.75290) und Eisenchloridlösung nach Weigert B, Ethanol 96%, Salzsäure 25%, Eisen (III)-chlorid, Division-Chroma-GmbH, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

^{14°} 0,4 g Ponceau de Xylidine, 0,1 g saures Fuchsin, 0,6 ml Eisessig, 300 ml Aqua dest., Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland

^{15°} 15 g H3P (Mo3O10) 4 x H₂O, 300 ml Aqua dest., 6 g Orange G, Merck, Darmstadt, Deutschland

^{16°} 0,9 g Lichtgrün 1B 211, 0,6 ml Eisessig, 300 ml Aqua dest., Division-Chroma-GmbH, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland

^{17°} Okular: PL 10x/25 Br foc, Objektive: 1,6x/0,05 Fluotar, 2,5x/0,07 N Plan, 5x/0,12 PL Fluotar, 10x/0,30 PL Fluotar, 20x/0,50 PL Fluotar, 40x/0,70 PL Fluotar, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

^{18°} 5 Megapixel (2584x1936), 36 Bit RGB Farbtiefe, Sensorgröße 2/3, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

^{19°} Filterkombinationen 09 für Calcein (513808 blau G 450-490 FT 510 LP 515), 14 für Xylenolorange (513812 grün G 510-560 FT 580 LP 590), 02 für Alizarin (513810 grün G 365 FT 395 LP 420), Leica, Bensheim, Deutschland

^{20°} Freecom FHD-2 Pro 40 GB, Freecom Technologies GmbH, Berlin, Deutschland

6.2. Literatur

Albrektsson T, Johansson C: *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. Eur Spine J. 2001;10: 96-101.

Alonso N, Machado de Almeida O: *Cranial versus iliac onlay bone grafts in the facial skeleton: a macroscopic and histomorphometric study*. J Craniofac Surg. 1995;6(2): 113-8.

Amir LR, Becking AG, Jovanovic A, Perdijk FB, Everts V, Bronckers AL: *Formation of new bone during vertical distraction osteogenesis of the human mandible is related to the presence of blood vessels*. Clin Oral Implants Res. 2006 Aug;17(4):410-6.

Annen BM, Ramel CF, Hämmerle CH, Jung RE: *Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of periimplant dehiscence defects: a randomised controlled double-blinded clinical trial*. Eur J Oral Implantol. 2011 Summer;4(2):87-100.

Araujo MG, Lindhe J: *Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog*. J Clin Periodontol. 2005;32:212-8.

Araujo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J: *Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog*. J Clin Periodontol. 2005;32:645-652.

Artzi Z, Weinreb M, Givol N et al.: *Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis*. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004;19(3):357-368.

Atwood DA: *Reduction of residual ridges: a major oral disease entity*. J Prosthet Dent. 1971;26:266-279.

Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, Pettersson E: *In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers*. J Clin Periodontol. 1986;13:862-8.

Axhausen G: Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen. Deutsche Zeitschrift für Chirurgie. 1907;91:388-428.

Barth A: *Über histologische Befunde nach Knochentransplantationen*. Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie. 1893;46:409-417.

Barth A: *Histologische Untersuchungen über Knochenimplantationen*. Beiträge zur pathologischen Anatomie 1895;17:65-142.

Bartl R: *Osteoporose Prävention - Diagnostik - Therapie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2008.

Bauer TW, Muschler GF: *Bone graft materials*. An overview of the basic science. Clin Orthop Relat Res. 2000;371:10-27.

Baumgarten S: *Behandlung von großen Knochendefekten. Einsatz eines mineralisierten, lösungsmittelkonservierten Block-Allograft - eine Fallstudie*. Implantologie J. 2009;4:24-32.

Becker J, Terheyden H: *Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde: Osteoinduktive Substanzen und Faktoren in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, 2006*. ([http:// www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Osteoinduktive_Substanzen.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Osteoinduktive_Substanzen.pdf). 2006:1-7)

Becker J, Al-Nawas B, Schiephake H, Terheyden H, Schwarz F: *Use of a new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants. A prospective randomized controlled double-blinded clinical multicenter study*. Clin Oral Impl Res. 2009 Jul;20(7):742-9.

Beglinger R, Becker M, Eggenberger E, Lombard C: *Das Göttinger Miniaturschwein als Versuchstier*. Res Exp Med. 1975;165:251.

Bell WH, McBride KL: *Correction of the long face syndrom by Le Fort I osteotomy. A report on some new technical modifications and treatment results*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1977 Oct;44(4):493-520.

Bonewald LF: *The amazing osteocyte*. J Bone Miner Res. 2011 Feb;26(2):229-38.

Bonjour JP: *Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health*. J Am Coll Nutr. 2011 Oct;30(5 Suppl 1):438-48.

Boskey AL, Posner AS: *Bone structure, composition, and mineralization*. Orthop Clin North Am. 1984 Oct;15(4):597-612.

Boyne PJ: *The use of marrow-cancellous grafts in the regeneration of mandibular bone*. Trans Int Conf Oral Surg. 1973;4:58-63.

Brånemark PI, Lindstrom J, Hallen O, et al.: *Reconstruction of the defective mandible*. Scand J Plast Reconstr Surg. 1975;9:116-128.

Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S: *Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking*. J Periodontol. 1996 Dec;67(12):1342-8.

Brunner E, Dornhof S, Langer F: *Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments*. Wiley, New York, 2002

Bunyaratavej P, Wang HL: *Collagen membranes: a review*. J Periodontol. 2001 Feb;72(2):215-29.

Burkhardt H: *The biology of bone graft repair*. Clin Orthop Relat Res. 1983;174:28-42.

Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S: *Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration*. Clin Oral Implants Res. 1990;1:22-32.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H: *Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla*. Int J Periodont Rest Dent. 1993;13(1):29-45.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK: *Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients*. J Oral Maxillofac Surg. 1996;54:420-433.

Buser D: *Membrangeschützte Knochenregeneration in der Implantologie*, Quintessenz Verlags-GmbH, 1. Auflage 2010.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al: *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature. 2003 Oct 23;425(6960):841-6.

Camargo PM, Lekovic V: *A controlled re-entry study on the effectiveness of bovine porous bone mineral used in combination with a collagen membrane of porcine origin in the treatment of intrabony defects in humans*. J Clin Periodontol. 2000;27(12):889-96.

Canas F, Terepka AR, Neuman, WF: *Potassium and milieu interieur of bone*. Am J Physiol. 1969;217:117-20.

Capelli M: *Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation*. Int J Periodontics Restorative Dent. 2003 Jun;23(3):277-85.

Chanavaz M: *Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with ⁸⁵Sr and gamma spectrometry*. J Oral Implantol. 1995;21(3):214-9.

Chen NT, Glowacki J: *The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit*. Plast Reconstr Surg. 1994;93(4):714-22.

Cornelini R, Cangini F, Martuscelli G, Wennström J: *Deproteinized Bovine Bone and Biodegradable Barrier Membranes to Support Healing Following Immediate Placement of Transmucosal Implants: A Short-Term Controlled Clinical Trial*. Int J Periodontics Restorative Dent. 2004;24:555-63.

Cranin AN, Sher J, Shpuntoff R: *Reconstruction of the edentulous mandible with a lower border graft and subperiosteal implant*. J Oral Maxillofac Surg. 1988;46:264-8.

Curtis BF: *Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitic cavities and ununited fractures*. American Journal of Medical Science. 1893;106:30.

de Boer HH, Wood MB: *Bone changes in the vascularised fibular graf*. J Bone Joint Surg Br. 1989 May;71(3):374-8.

de Vernejoul MC, Pointillart A, Golenzer CC, et al.: *Effects of iron overload on bone remodeling in pigs*. Am J Pathol. 1984;116:377-84.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T: *Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts*. Clin Oral Implants Res. 2002a Apr;13(2):203-13.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T: *Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. An experimental study in rat*. Clin Oral Implants Res. 2002b Apr;13(2):185-91.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T: *Augmentation of the rat jaw with autogeneic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration*. Clin Oral Implants Res. 2002c Apr;13(2):192-202.

Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T: *Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration*. Clin Oral Implants Res. 2005;16:133-9.

Engels HB: *Misserfolge in der oralen Implantologie. Ein kleines Brevier zur Vermeidung von Misserfolgen*. In: Engels HB: *Handbuch zum BDIZ / EDI Implantat-Register*. Basic Dent-Verlag, Berlin, Deutschland, 2003:273-93.

Fickl S., Zuhr O, Wachtel H, Stappert C, Stein JM, Hürzeler MB: *Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques*. J Clin Periodontol. 2008;35:906-13.

Franz-Odendaal TA: *Induction and patterning of intramembranous bone*. Front Biosci. 2011;16:2734-46.

Friedmann A, Strietzel FP, Marezki B, Pitaru S, Bernimoulin JP: *Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material.* Clin Oral Impl Res. 2002;13:587-94.

Friedmann A, Gissel K, Soudan M, Kleber BM, Pitaru S, Dietrich T: *Randomized controlled trial on lateral augmentation using two collagen membranes: morphometric results on mineralized tissue compound.* J Clin Periodontol. 2011 Jul;38(7):677-85.

Gaggl A: *Die horizontale Erweiterungs des Kieferkamms durch Kallusdistraction zur präimplantologischen Kieferkammaugmentation.* Dtsch Zahnärztl Z. 2002;57:713-7.

Garg KA: *Knochen - Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie.* Quintessenz Verlag-GmbH, 2006:3-20.

Garofalo GS: *Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for sinus elevation,* Minerva Stomatol. 2007 Jul-Aug; 56(7-8):373-92.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA: *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation.* J Cell Biochem. 2003 Apr 1;88(5):873-84.

Glass Y, Eickholz P, Nentwig GH, Dannewitz B: *Glossar der Grundbegriffe für die Praxis: Knochenersatz- und -aufbaumaterialien.* Parodontologie. 2008;19(4):465-74.

Grimes R, Jepsen KJ, Fitch JL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC: *The transcriptome of fracture healing defines mechanisms of coordination of skeletal and vascular development during endochondral bone formation.* J Bone Miner Res. 2011 Nov;26(11):2597-609.

Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J: *New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration.* Case reports. J Clin Periodontol. 1986;13:604-16.

Gross AE, Allan DG, Catre M, Garbuz DS, Stockley I: *Bone grafts in hip replacement surgery. The pelvic site.* Orthop Clin North Am. 1993 Oct;24(4):679-95.

Hadji P, Rabe T, Ortmann O, Mueck AO, von Holst T, Emons G, Schulz KD: *Möglichkeiten und Grenzen der Osteoporoseprävention durch Östrogene und Gestagene.* Geburtsh Frauenheilk. 2002;436-45.

Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP: *The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants.* Clin Oral Implants Res. 1998;9(3):151-62.

Hämmerle CH, Lang NP: *Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials.* Clin Oral Implants Res. 2001;12:9-18.

Hale TM, Boretsky BB, Scheidt MJ, McQuade MJ, Strong SL, Van Dyke TE: *Evaluation of titanium dental implant osseointegration in posterior edentulous areas of micro swine.* J Oral Implantol. 1991;17(2):118-24.

Haney JM, Nilvéus RE, McMillan PJ, Wikesjö UM: *Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration.* J Periodontol. 1993 Sep;64(9):883-90.

Haring F, Gruhn R, Smidt D: *Das Göttinger Miniaturschwein.* World Rev Anim Prod. 1967;3:76

Hardwick R, Scantlebury TD, Sanchez R, Whitley N, Ambruster J: *Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge.* In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK (eds): *Guided bone regeneration in implant dentistry.* Chicago, Quintessence, 1994:155-88.

Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K: *Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study.* Clin Oral Implants Res. 2008 Dec;19(12):1219-25.

Heberer S, Rühle B, Krekeler L, Schink T, Nelson JJ, Nelson K: *A prospective randomized split-mouth study comparing iliac onlay grafts in atrophied edentulous patients: covered with periosteum or a bioresorbable membrane*. Clinical Oral Implants Res. 2009;20(3):319-26.

Hees H, Sinowatz F: *Histologie-Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte-Verlag Köln, 2000:133-7.

Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA: *Local communication on and within bone controls bone remodeling*. Bone. 2009 Jun;44(6):1026-33.

Herman B: *Resonance energy transfer microscopy*. Meth Cell Biol. 1989a;30:219-43.

Herman B: *Fluorescence Microscopy*. 2. Ed. Edited by Leonard J. Oxford: Bios Scientific, 1998b:1-25.

Hönig JF, Merten HA: *Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung*. Z Zahnärztl Implantol. 1993;9:244-54.

Horch HH, Sader R, Pautke C et al.: *Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws*. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006;35(8):708-13.

Hutmacher D, Hürzeler MB: *Biologisch abbaubare Polymere und Membranen für die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration*. Implantologie. 1995;1:21.

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

Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH: *The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions*. J Bone Joint Surg Am. 1959;41-A:1243-54.

Hyder P, Dowell P, Singh G, Dolby AE: *Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: analysis of properties* J Periodontol. 1992;63:182-6.

Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, Kreja L, Schoengraf P, Lisson P, et al.: *The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro.* J Trauma. 2011 Oct;71(4):952-60.

Jensen J, Sindet-Pedersen S, Oliver AJ: *Varying treatment strategies for reconstruction of maxillary atrophy with implants: results in 98 patients.* J Oral Maxillofac Surg. 1994;52:210-8.

Joos U: *Die Knochenregeneration nach Zystenoperation.* Dtsch Zahnärztl Z. 1985;40:661

Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB: *Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study.* Int J Oral Maxillofac Implants. 1995;10:23-31.

Kahnberg KE, Vannas-Löfqvist L: *Maxillary osteotomy with an interpositional bone graft and implants for reconstruction of the severely resorbed maxilla: a clinical report.* Int J Oral Maxillofac Implants. 2005 Nov-Dec;20(6):938-45.

Katagiri T, Takahashi N: *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation,* Oral Dis. 2002;8:147-59.

Kessler P, Grabenbauer G, Leher A, Schultze-Mosgau S, Rupprecht S, Neukam FW: *Patients with oral squamous cell carcinoma. Long-term survival and evaluation of quality of life-initial results obtained with two treatment protocols in a prospective study.* Mund Kiefer Gesichtschir. 2004 Sep;8(5):302-10. Epub 2004 Aug 10.

Khoury F: *Die modifizierte Alveolar-Extensionsplastik.* Z Zahnärztl Implantol. 1987;3:174-8.

Khoury F: Chirurgische Aspekte und Ergebnisse zur Verbesserung des Knochenlagers vor implantologischen Massnahmen. *Implantologie*. 1994;3:237-47.

Kirchhoff M, Lenz S, Henkel KO, Frerich B, Holzhüter G, Radefeldt S, Gerber T: *Lateral augmentation of the mandible in minipigs with a synthetic nanostructured hydroxyapatite block*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011 Feb;96(2):342-50. doi: 10.1002/jbm.b.31775.

Klinge B, Hultin M, Gustafsson A: *Long-term evaluation of osseointegrated dental implants in the treatment of partly edentulous patients*, *J Clin Periodontol*. 2000 Feb;27(2):128-33.

Knaepler H, Koch F, Bugany H: *Untersuchungen zur HIV-Inaktivierung in allogenen Knochentransplantaten durch chemische Desinfektion und radioaktive Bestrahlung*. *Unfallchirurgie*. 1992;18(1):1-6.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE: Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med*. 2006;10:7-19.

Knoche H: *Leitfaden der histologischen Technik*. Gustav Fischer Verlag, 1979:140-2.

Kübler NR: *Osteoinduction and –reparation*, *Mund Kiefer Gesichtschir*. 1997 Feb;1(1):2-25

Kübler NR, Betz T, Kübler J, Reuther JF: *Autogener Beckenkamm versus AAA-Knochen bei der Sinus-Lift-Operation*. *Z Zahnärztl Implantol*. 1998;14:136-42.

Kugler M, Fischer O, Renner C, Ono S, Ando Y: *Scanning tunneling spectroscopy of Bi(2)Sr(2)CuO(6+delta): new evidence for the common origin of the pseudogap and superconductivity*. *Phys Rev Lett*. 2001 May 21;86(21):4911-4.

Laiblin C, Jaeschke G: *Klinisch-chemische Untersuchungen des Knochen- und Muskelstoffwechsels unter Belastung beim Göttinger Miniaturschwein - eine experimentelle Studie (Clinical-chemical investigations of the metabolism of bone and muscle under stress in the Göttingen miniature pig - an experimental study)*, Berl Münch Tierärztl Wschr. 1979;92:124.

Lane JM, Tomin E, Bostrom MP: *Biosynthetic bone grafting*. Clin Orthop Relat Res. 1999;(367 Suppl):107-17.

Lang NP, Hämmerle CF, Brägger U, Lehmann B, Nyman S: *Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement*. Clin Oral Implant Res. 1994;5:92.

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF: *Bone graft substitutes*. Expert Rev Med Devices. 2006;3(1):49-57.

Lekholm U, Zarb GA: Patient selection and preparation. In: Brånemark PI, Zarb GA, Albrektson T: *Tissue-integrated protheses: osseointegration in clinical dentistry*. Quintessence Publishing, Chicago, 1985:199-209.

Lexer E: *Verwendungsbereich von freien Knochentransplantaten*. In: Lexer, E (Hrsg.): *Die Freien Transplantationen*, Enke, Stuttgart, 1924:120.

Lexer E: 20 Jahre Transplantationsforschung in der Chirurgie. Archiv für klinische Chirurgie, 1925;138:251-302.

Liebich HG: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. 4. Aufl. Stuttgart, 2004.

Lin Y, Soares MP, Sato K, Csiznadia E, Robson SC, Smith N, Bach FH: *Longterm survival of hamster hearts in presensitized rats*. J Immunol. 2000;164(9):4883-92.

Lind M: *Growth factors: possible new clinical tools*. A review. Acta Orthop Scand. 1996;67:407-17.

Lindqvist C, Kaartinen E; Santavirta S: *Bone transplantation in surgery and maxillofacial surgery*, Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl. 1985;73(3):291-300.

Ling L, Hung S, Lee C, Chen Y, Wu K: *The influence of membrane exposure on the outcomes of guided tissue regeneration: clinical and microbiological aspects.* J Periodontal Res. 2003;38:57-63.

Löffler G; Petrides PE, Neumann S: *Stoffwechsel spezifischer Gewebe, Biochemie und Pathobiochemie,* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997.

Lüllmann-Rauch R: *Histologie.* Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 2003.

Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H: *Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study.* Int J Oral Maxillofac Implants. 1996;11:760-6.

MacEwen W: *Observations concerning transplantation of bone: illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored.* Proc Royal Soc, London, 1881;32:232-47.

MacMillan, HW: *The structure and function of the alveolar process,* J nat dent Ass. 1924;11:1059.

Marks SC: *The origin of osteoclasts: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extraskeletal source,* J Oral Pathol. 1983;12:226-56.

Marx RE, Garg AK: *Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology.* Implant Dent. 1998;7:267-76.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR: *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Jun;85(6):638-46.

McAllister BS, Haghghat K: *Bone augmentation techniques.* J Periodontol. 2007;78:377-96.

Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U, Hoenig JF: *Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta-tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants*. J Craniofac Surg. 2001;12(1):59-68.

Mertens C, Steveling HG, Stucke K, Pretzl B, Meyer-Baumer A: *Fixed implant-retained rehabilitation of the edentulous maxilla: 11-year results of a prospective study*. Clin Implant Dent Relat Res. 2012 Dec;14(6):816-27.

Milch RA, Rall DP, Tobie JE: *Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone*, J Bone Joint Surg Am. 1958 Jul;40-A(4):897-910.

Miller SC, Jee WS: *The bone lining cell: a distinct phenotype?* Calcif Tissue Int. 1987 Jul;41(1):1-5.

Misch CE: *Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive bone loading*. Int J Oral Implantol. 1990;6:23-31.

Misch CE, Dietsh F: *Bone-grafting materials in implant dentistry*. Implant Dent. 1993;2(3):158-67.

Misch CE, Dietsh F: *Endosteal implants and iliac crest grafts to restore severely resorbed totally edentulous maxillae - a retrospective study*. J Oral Implantol. 1994;20(2):100-10.

Mosekilde L: *Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research*. Bone. 1995;17:343-52.

Müller M: *Chirurgie für Studium und Praxis -2006/07*. 8. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach am Rhein, 2005.

Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G: *Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone*. Genes Dev. 2005 May 1;19(9):1093-104.

Nelson K, Ozyuvaci H, Bilgic B, Klein M, Hildebrand D: *Histomorphometric evaluation and clinical assessment of endosseous implants in iliac bone grafts with shortened healing periods*. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 May-Jun;21(3):392-8.

Nentwig GH: *Knochenspreizung und Knochenkondensierung zur Verbesserung des Implantatlagers*. Quintessenz. 1996;47:1-7.

Neukam FW, Scheller H, Güney H: *Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Auflagerungsosteoplastik in Kombination mit endossalen Implantaten*. Z Zahnärztl Implantol. 1989;5:245-51.

Neukam FW, Schultze-Mosgau S: *Implantate bei ausgedehnten Knochendefiziten*. In: Koeck, W, Wagner, W (Hrsg.): Praxis der Zahnheilkunde, Bd. 13 (Implantologie), 2. Auflage. Elsevier GmbH, München, 2004:184-228.

Nevins M, Camelo M, De Paoli S, Friedland B, Schenk RK, Parma-Benfenati S, et al.: *A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots*. Int J Periodontics Restorative Dent. 2006;26:19-29.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M: *Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study*. Clin Oral Implants Res. 2001;12:495-502.

Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, Thams U, Neugebauer J, Steveling H, Radespiel-Tröger M, Neukam FW: *Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs*. Clin Oral Implants Res. 2003;14:312-21.

Noble BS, Reeve J: *Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance*. Mol Cell Endocrinol. 2000 Jan 25;159(1-2):7-13.

Norton MR, Gamble C: *Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan*. Clin Oral Implants Res. 2001 Feb;12(1):79-84.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H: *New attachment following surgical treatment of human periodontal disease*. J Clin Periodontol. 1982;9:290-6.

Ollier L: *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. Victor Masson et Fils, Paris, 1867.

Olsen ML, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Hansen AK: *Problems related to an intraoral approach for experimental surgery on minipigs*. Clin. Oral Impl. Res. 2004;15:333-8.

Osborn JF: *Alveolar-Extensionsplastik Teil I. Neue chirurgische Verfahren in der Versorgung kollabierter Alveolen und atrophierter Alveolarkämme*. Quintessenz, 1985;36:9-16.

Ozaki W, Buchman SR: *Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin*. Plast Reconstr Surg. 1998 Aug;102(2):291-9.

Parfitt, AM: *Quantum concept of bone Remodelling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis*. Calcif. Tissue Int. 1979;28:1-5.

Parfitt AM: *Osteonal and hemi-osteonal Remodelling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone*. J Cell Biochem. 1994;55:273-86.

Parfitt AM: *The mechanism of coupling: a role for the vasculature*. Bone. 2000;26:319-23.

Parikh SN: *Bone graft substitutes: past, present, future*. J Postgrad Med. 2002;48(2):142-8.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider EP: *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. Eur cell materials. 2007;13:1-10.

Pfeiffer J: *The reaction of the alveolar bone to flap procedures in man*. Periodontics. 1965;3:135.

Phillips JH, Rahn BA: *Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption*. Plast ReconstrSurg. 1988;82:872-7.

Phillips JH, Rahn BA: *Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft revascularization and bone deposition*. Plast ReconstrSurg. 1990;85:891-7

Piert M, Zittel TT, Becker GA, Jahn M, Stahlschmidt A, Maier G, et al.: *Assessment of porcine bone metabolism by dynamic*. J Nucl Med. 2001 Jul;42(7):1091-100.

Prolo DJ, Rodrigo JJ: *Contemporary bone graft physiology and surgery*, Clin Orthop Relat Res. 1985 Nov;200:322-42.

Rahn BA, Perren SM: *Xylenol Orange, A Fluorochrome Useful in Polychrome Sequential Labeling of Calcifying Tissues*, Stain Technology, Band 46, 1971:125-8.

Rahn BA: *Die polychrome Sequenzmarkierung*. Nova Acta Leopoldina. 1976;44:249.

Rahn BA, Bacellar FC, Trapp L, Perren SM: *Methode zur Fluoreszenz Morphometrie des Knochenanbaus*, Akt. Traumatolog, Band 10, 1980:109-15.

Rahn BA: *Fluorochrome labelling of bone dynamics: European Cells and Materials Vol. 5, Suppl. 2*, 2003:41.

Reichart PA, Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Schliephake H, Schmelzeisen R (Hrsg): *Curriculum Zahnärztliche Chirurgie*, Band I, Quintessenz Berlin, 2001

Reuther JF, Kübler NR: *Die Wiederherstellung des Unterkiefers*. Deutsches Ärzteblatt. 1999;96(16):1054-61.

Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J: *Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and osteoblast-like cells*. Clin Oral Implants Res. 2004;15:443-9.

Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J: *Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes. An experimental study in the rat*. Clin Oral Implants Res. 2005;16:369-78.

Roux W. *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen.*: Engelmann I, Leipzig, 1895.

Rühe B, Heberer S, Bayreuther K, Nelson K: *Effect of dehiscences to the bone response of implants with an Acid-etched surface: an experimental study in miniature pigs.* J Oral Implantol. 2011;37(1):3-17. Epub 2010 Jun 17.

Sailer HF: *A new method of inserting endosseous implantats in totally atrophic maxillae.* J Cranio Maxillofac Surg. 1989;17:299-305.

Sailer HF, Weber FE: *Knochenersatzmaterialien.* Mund Kiefer Gesichts Chir. 2000;4:384-91.

Sambraus HH: *Atlas der Nutzierrassen,* 2001.

Schenk RK, Buser D: *Osseointegration: a reality.* Periodontol 2000. 1998;17:22-35.

Schenk RK, Willenegger K: *Zur Histologie der primären Knochenheilung.* Unfallheilkd. 1977;80:155.

Schliephake H, Aleyt J: *Mandibular onlay grafting using prefabricated bone grafts with primary implant placement: an experimental study in minipigs.* Int J Oral Maxillofac Implants. 1998;13:384-93.

Schmid J, Hammerle CH, Olah AJ, Lang NP: *Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit.* Clin Oral Implants Res. 1994;5:125-30.

Schroeder HE: *Orale Strukturbiologie.* 2 ed. Thieme, Stuttgart, 1982.

Schroeder HE: *The Parodontium,* Handbook of Mikroskopische Anatomie vol. V/5. Springer, Berlin, 1986.

Schwarz F, Rothamel D, Sager M, Becker J: *Evaluation of experimental and clinical examinations of collagen membranes used for guided bone- and tissue regeneration - GBR/GTR*. Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie. 2004;20:112-8.

Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J: *Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). A case series*. J Clin Periodontol. 2006a;33(7):491-9.

Schwarz F, Sager M, Rothamel D, Herten M, Sculean A, Becker J: *Einsatz nativer und quervernetzter Kollagenmembranen für die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration*. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2006b;116:1112-23.

Shulman LB, Jensen OT: *Sinus Graft Consensus Conference. Introduction*. Int J Oral Maxillofac Implants. 1998;13:5-6.

Shirota T, Ohno K, Michi K, Tachikawa T: *An experimental study of healing around hydroxylapatite implants installed with autogenous iliac bone grafts for jaw reconstruction*. J Oral Maxillofac Surg. 1991;49(12):1310-5.

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

Soost F, Koch S, Stoll C, Amthauer H, Grosse-Siestrup C, Zorn P: *Validation of bone conversion in osteoconductive and osteoinductive bone substitutes*. Cell Tissue Bank. 2001;2(2):77-86.

Stevenson S, Shaffer JW, Goldberg VM: *The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone*. Clin Orthop Relat Res. 1996;(326):86-95.

St John TA, Vaccaro AR, Sah AP et al.: *Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting*. Am J Orthop. 2003;32(1):18-23.

Streckbein R: *Das Compress-Implantatsystem*. ZMK - Zahnheilkunde 1-5, 1997.

Strietzel, FP: *Risks and complications of membrane-guided bone regeneration. Retrospective analysis.* MundKieferGesichtschir. 2001;5:2-32.

Stutzle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L: *Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien,* Orthopäde. 1998;27:118-25.

Suzuki HK, Mathews A: *Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein.* Stain Technol. 1966 Jan;41(1):57-60.

Summers RB: *A new concept in maxillary implant surgery: the osteotome technique.* Compendium of continuing education in dentistry, 1994;15:152-62,422-36,698-710,1080-99.

Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, et al.: *A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane.* Biomaterials. 2005;26(31):6158-66.

Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O: *Long-term bio-degradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration.* Clin Oral Implants Res. 2008 Mar;19(3):295-302.

Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjö UM: *Devices for periodontal regeneration.* Periodontol 2000. 1999;19: 59-73.

Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, Morra A, Anderson GI: *In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study.* Int J Oral Maxillofac Implants. 2002;17:321-30.

Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA: *Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite.* J Oral Maxillofac Surg. 2005 Nov;63(11):1626-33.

Umstadt HE, Vollinger J, Muller HH, Austermann KH: *Implants in avascular iliac crest bone transplants. Prospective study of 176 implants.* Mund Kiefer Gesichtschir. 1999;3(1):93-8.

Urist MR: *Boneformation by autoinduction,* Science. 1965;150:893-9.

Verardi S, Simion M: *Management of the exposure of e-PTFE membranes in guided bone regeneration.* Pract Proced Aesthet Dent. 2007;19:111-7.

van Meekeren J: *Heel- en Geneeskonstige Aaenmerkingen.* Commelijjn, Amsterdam, 1668.

von Arx T, Broggin N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D: *Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium.* International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. 2005;20:843-53.

von Arx T, Buser D: *Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients.* Clin Oral Impl Res. 2006;17: 359-66.

von Garrel T, Gotzen L: *Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking.* Unfallchirurg. 1998;101:713-27.

von Walther PF: *Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe,* J Chir Augenheilk. 1821:571.

Walter JB: *Wound healing.* J Otolaryngol. 1976;5:171-6.

Wagner W, Al Nawas B: *Implantmaterialen und Konstruktionsprinzipien der Implantate aus chirurgischer Sicht.* In: Koeck B, Wagner W (Hrsg.): Praxis der Zahnheilkunde, Bd. 13, 2. Auflage. Elsevier GmbH, München, 2004:61-97.

Wang HL, O'Neal RB, Thomas CL, Shyr Y, MacNeil RL: Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating Class II furcation defects. *J Periodontol.* 1994;65:1029-36.

Park SH, Wang HL: *Clinical significance of incision location on guided bone regeneration: human study.* *J Periodontol.* 2007;78:47-51.

Watanabe H, Yanagisawa T, Sasaki J: *Cytoskeletal architecture of rat calvarial osteoclasts: Microfilament, intermediate filaments, and nuclear matrix as demonstrated by detergent perfusion.* *Anat Rec.* 1995;243:165-74.

Weibrich G, Gnoth SH, Trettin R, Werner HD, Wagner W: *Röntgenspektrometrischer Vergleich der aktuell verfügbaren Knochenersatzmaterialien.* *Mund Kiefer Gesichtschir.* 1999;3(2):92-7.

Welsch U: *Knochengewebe.* In: Welsch, U (Hrsg.): *Sobotta Lehrbuch Histologie*, 1. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, 2003:119-33.

Wiltfang J, Gellrich NC. *Plastische und Wiederherstellungschirurgie:* Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Reichart PA, Schliephake H, Schmelzeisen R (Hrsg.): *Curriculum Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Chirurgie Band III.* Quintessenz Verlags-GmbH, 2003:503.

Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G: *Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.* *Hefte zur Unfallheilkunde.* 1990:479-88.

Wolff J: *The law of bone remodelling.* Springer, Berlin 1986, see *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1892;228:2-11.

Wong SS: *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking.* CRC Press Inc., Boca Raton FL, USA, 1991

Würzler KK, Heisterkamp M, Böhm H, Kübler NR, Sebald W, Reuther JF: *Mandibular reconstruction with autologous bone and osseointegrative implant in the Göttingen minipig*. Mund Kiefer Gesichtschir. 2004 Mar;8(2):75-82. Epub 2004 Feb 3.

Yang JW, Park HJ, Yoo HK, Chung K, Jung S, Oh HK, Kim HS, Kook MS: *A comparison study between periosteum and resorbable collagen membrane on iliac block bone graft resorption in the rabbit calvarium*. Head Face Med. 2014 May 10;10(1):15. doi: 10.1186/1746-160X-10-15.

Yiannakopoulos CK, Kanellopoulos AD, Trovas GP, Dontas IA, Lyritis GP: *The biomechanical capacity of the periosteum in intact long bones*. Arch Orthop Trauma Surg. 2008 Jan;128(1):117-20. Epub 2007 Sep 15.

Zarb GA, Schmitt A: *Osseointegration and the edentulous predicament. The 10-year-old Toronto study*. Br Dent J. 1991;170:439-44.

Zijderveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM: *Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts*. Int J Oral Maxillofac Implants. 2005 May-Jun;20(3):432-40.

Zitzmann NU, Scharer P, Marinello PC: *Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study*. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001;16: 355-66.

Zitzmann NU: *Die Folgen der Zahnlosigkeit für das Individuum*. Dtsch Zahnärztl Z. 2004;59:617-24.

6.3. Abkürzungen

ACP	amorphous calcium phosphate
BAP	bone alkaline phosphatase
BFR	bone formation rate
BMP	bone morphogenetic proteins
CSD	critical size defect
FGF	fibroblast growth factor
GBR	guided bone regeneration
GTR	guided tissue regeneration
IGF-1	insulin-like growth factor 1
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KEM	Knochenersatzmaterial
KNR	Knochenneubildungsrate
OCP	octacalcium phosphate
PDGF	platelet derived growth factor
ROI	region of interest
SBEA	Sinusbodenelevation und -augmentation
TGF- β	transforming growth factor β

6.4. Abbildungen

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Lamellenknochens (Brockhaus scolaris intensiv lernen Biologie, Hrsg. Uwe Deppe, 2013).....	12
Abbildung 2: Fluoreszenzmikroskopie.....	28
Abbildung 3: Biopsie Präparat OK mit Membran, Masson-Goldner-Trichromfärbung, Übersichtsfärbung (x 10).....	39
Abbildung 4: schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskops, optische und elektronische Geräte Jülich GmbH, Bonn, Deutschland.....	42
Abbildung 5: Gallery Fluoreszenzmarkierung, Präparat UK ohne Membran (x 20).....	43
Abbildung 6: Vorgehen der Messung, Präparat UK mit Membran (x 10).....	44
Abbildung 7: Messung der Fluoreszenzmarkierung, Präparat OK ohne Membran (x 10).....	45
Abbildung 8: Auswertung der Fluoreszenzmarkierung unter Berücksichtigung der Breite der Calceingrünbande, Präparat UK ohne Membran (x 10).....	45
Abbildung 9: Auswertung der Färbung nach Masson-Goldner, Präparat UK mit Membran (x 40).....	46

6.5. Tabellen

Tabelle 1: Einteilung gängiger Augmentationsmaterialien (Wagner und Al Nawas 2004).....	17
Tabelle 2: Daten der untersuchten Kollagenmembran versus native Bio-Gide® - Membran (Rothamel et al. 2004).....	35
Tabelle 3: Verteilung der Bio-Gide-Pro® - Membran auf die Schweinekiefer.....	49
Tabelle 4: Parameter des Knochenwachstums mittels Fluoreszenzmarkierung.....	50
Tabelle 5: Knochenneuformationsrate in Abhängigkeit der Lokalisation.....	51
Tabelle 6: Knochenneuformation in Abhängigkeit auftretender Dehiszenzen.....	53
Tabelle 7: Resorption in Abhängigkeit der Lokalisation.....	54
Tabelle 8: Resorptionsrate bei vorhandenen Dehiszenzen.....	55

7. Danksagung

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Katja Nelson und PD Dr. Susanne Nahles, sie unterstützten, betreuten und motivierten mich während des schriftlichen Teils dieser Arbeit.

Ein Dank an Frau Dr. Bärbel Rühle und den Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Unterstützung bei den Tierversuchen ebenso wie den Mitarbeitern des Zellkulturlabors, die bei der Herstellung und Aufbereitung der histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Proben anleiteten.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Frank Strietzel für die hervorragende wissenschaftliche Ausbildung, Unterstützung und Zusammenarbeit und Prof. Dr. Andrea-Maria Schmidt-Westhausen sowie Dr. Moritz Hertel für das mehrmalige Lesen der Arbeit während des Entstehungsprozesses.

Meiner Mam möchte ich danken, dass sie immer Zeit für mich und Geduld mit mir hatte und hat!

Meiner Omma möchte ich danken, ich denke jeden Tag an dich!

Meinem Mann Georg möchte ich danken, er brachte mich zum Lachen und munterte mich mit großer Geduld auf, wenn ich keine Lust mehr zum Weiterschreiben hatte!

Ein besonderer Dank gilt Robin Mitchell, der die englische Fassung der Conclusion des Öfteren las und die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglichte.

Meinen Lehrerinnen Dr. Heike Gerber und Kerstin Nagel möchte ich danken für das Verfeinern meiner Orthographie, Interpunktion und Grammatik.

Kathleen, die mich, als ich ihr von meinem Vorhaben Zahnmedizin studieren zu wollen berichtete, mit den Worten: Die einzig wichtigen Ärzte sind Chirurgen und Zahnärzte! bestärkte. Danke! Ich hätte dich gern noch viele Jahre als meine Freundin um mich gehabt, das Schicksal hatte anderes vor. Du fehlst mir!

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Anne Schreckenberger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Histologische Untersuchungen zum Transplantatremodeling nach Ober- und Unterkieferaugmentation mit autologem Beckenkammknochen und einer quervernetzten Kollagenmembran am Göttinger Minischwein“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (URM) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechenden denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den

Anne Schreckenberger