

Biokompatibilität und Biodegradation einer nativen, porkinen Perikardmembran. Ergebnisse einer in-vitro/in-vivo Untersuchung.

D. Rothamel¹, F. Schwarz², M. Herten³

¹Universität Köln, Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Köln

²Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Klinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme, Düsseldorf

³Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Klinik für Orthopädie, Düsseldorf

Das Prinzip der gesteuerten Gewebe- und Knochenregeneration ist seit vielen Jahren zur Behandlung von Knochen- und Parodontaldefekten etabliert. Als Barrieren zur Abschirmung des Weichgewebes und Epithels haben sich neben nicht resorbierbaren Materialien vor allem native und quervernetzte Kollagene durchgesetzt, die sich zum Teil jedoch deutlich hinsichtlich ihrer Barrierefunktion und Biokompatibilität unterscheiden. Ziel der vorliegenden Pilotstudie war die in-vitro und in-vivo Untersuchung einer neuartigen nativen Kollagenmembran, welche aus porkinem Perikard gewonnen wird.

Drei unterschiedliche native Kollagenmembranen (Jason[®] Kollagenmembran [JM], botiss dental GmbH, Berlin, Bio Gide[®] [BG], Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz und Tutodent[®] [TD], Zimmer Dental, Freiburg) wurden mit $1 \cdot 10^4$ SaOs-2 Osteoblast-like Zellen inkubiert und nach 2 Stunden, 3 und 7 Tagen die Proliferation der Zellen auf der Oberfläche bestimmt. Im Falle von JM und BG erfolgten zudem eine Beurteilung des morphologischen Aufbaus im Rasterelektronenmikroskop und eine histologische Untersuchung der Biodegradation 4, 8, 12 und 24 Wochen nach lateraler Augmentation im Hundemodell.

In-vitro zeigte sich eine deutliche Proliferation der Zellen auf JM und TD, welche derjenigen auf BG signifikant überlegen war ($P < 0,05$, ANOVA). Rasterelektronenmikroskopisch war bei JM ein interkonnektives Porensystem erkennbar, während BG eher einen faserigen Aufbau zeigte. Beide Membranen waren an der Oberfläche von einer zellokklusiven, kompakteren Schicht bedeckt. In-vivo wurden beide Membranen reizlos in das umliegende Gewebe integriert. Dabei zeigte sich eine deutliche Biodegradation innerhalb von vier bis acht Wochen bei BG. Die Resorption von JM fand maßgeblich innerhalb der ersten acht bis zwölf Wochen statt.

Es konnte geschlussfolgert werden, dass alle untersuchten Membranen eine hohe Biokompatibilität aufweisen. JM und BG werden entzündungsfrei innerhalb von 8 (BG) bzw. 12 Wochen (JM) resorbiert.

Keywords - Kollagenmembran, Knochenregeneration, GBR, GTR, nativ, Perikard, Biodegradation, Kollagen

EINLEITUNG

Die orale Rehabilitation mit implantatgetragenen Zahnersatz setzt ein adäquates Knochen- und Weichgewebslager voraus, um eine hohe Einheilwahrscheinlichkeit, aber auch eine ausreichende Langzeitstabilität zu gewährleisten. Dem stehen vor allem

die dimensional Hartschubstanzverluste nach Zahnextraktion und der entzündlich bedingte Knochenabbau im Rahmen von marginalen Parodontitiden gegenüber [1, 2]. Neben autogenen Knochentransplantaten hat sich zur Augmentation von Knochendefekten die Verwendung von Knochenersatzmaterialien etabliert, welche osteokonduktiv in die regenerierende Knochenmatrix eingebaut werden [3]. Um die Regeneration des Defektraumes bzw. augmentierten Materials zu verbessern, kann das Augmentat gegen das umgebene Bindegewebe durch Einlagerung von Membranen im Sinne der gesteuerten Knochenregeneration abgeschirmt werden [4, 5]. Hierdurch wird eine bindegewebige Organisation des Augmentationsmaterials vermieden und ein verbesserter knöcherner Umbau ohne starken Volumenverlust erzielt. Als Membranmaterial bietet sich vor allem Kollagen an, da es eine hohe Biokompatibilität zeigt, vom Körper resorbiert wird und ein Zweiteingriff zur Membranentfernung entfällt [6].

Betrachtet man die Summe der derzeit auf dem Markt erhältlichen Kollagenmembranen, so unterscheiden sie sich vor allem hinsichtlich ihres Ursprungsgewebes und der Nativität bzw. Art der Quervernetzung. Als Spendergewebe etabliert sind vor allem bovines und porkines Kollagen Typ I und III. Dieses unterliegt je nach Ursprungsgewebe jedoch einer schnellen Resorption [7]. Eine resorptionsverzögernde Quervernetzung der Kollagenfibrillen kann die Resorptionsdauer verlängern, ist jedoch mit einer schlechteren Gewebsintegration und Blutgefäßinvasion vergesellschaftet. Zudem wurde ein vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen nach Implantation quervernetzter Kollagene beobachtet [8].

Membranen aus Perikardgewebe weisen aufgrund ihres sehr kompakten Ursprungs bereits rein physikalisch eine gewisse Resorptionsstabilität auf. Andererseits zeigen sie eine nur sehr verzögerte Penetration von Blutgefäßen [9], welche die Knochenregeneration im Sinne einer transmembranären Angiogenese unterstützen könnte.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die experimentelle Bewertung einer neuartigen porkinen Perikardmembran, welche aufgrund ihrer nativen Struktur eine hohe Biokompatibilität aufweisen, wegen ihres kompakten Ursprungsgewebes jedoch nur langsam resorbiert werden und dennoch eine schnelle transmembranäre Angiogenese ermöglichen soll.

MATERIAL UND METHODEN

Je vierundzwanzig ausgestanzte Proben (Durchmesser 5,5 mm) dreier unterschiedlicher nativer Kollagenmembranen (Jason® Kollagenmembran [JM], botiss dental GmbH, Berlin; Bio Gide® [BG], Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz und Tutodent [TD], Zimmer Dental, Freiburg] wurden für 5 min in PBS rehydriert und in 96-Well non-binding Zellkultursysteme eingebracht. Die Fixierung am Wellboden erfolgte mittels steriler PMMA-Ringe. Anschließend erfolgte die Inkubation mit $1 \cdot 10^4$ SaOs-2 Osteoblast-like Zellen in DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium, Cambrex Bio Science, Vervies, Belgien), 10 % FKS (Fetales Kälberserum, Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) inkubiert. Die Kultivierung erfolgte standardisiert bei 5 %-iger CO_2 -Konzentration, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 37 Grad Celsius im Brutschrank. Ein Mediumwechsel erfolgte am dritten Tag des Sieben-Tage-Ansatzes. Nach zwei Stunden, drei und sieben Tagen Kulturdauer wurde die LDH-Konzentration im Well über einen speziellen LDH-Assay (CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay, Promega, Mannheim) photometrisch bestimmt und die entsprechende Zellzahl anhand einer Standardkurve errechnet. Zur statistischen Analyse der Daten diente das Statistikprogramm SPSS. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Im Falle von JM und BG erfolgte zusätzlich zur Zellkultur eine Beurteilung des morphologischen Aufbaus. Hierfür wurden die Membranen mit einer Schere zerkleinert, auf einen Kohleträger aufgebracht und mittels eines Low Voltage Cool Sputter Coater mit Gold einer Schichtdicke von 30 nm bedampft. Anschließend erfolgte die Beurteilung der Oberflächenmorphologie unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskopes (Zeiss DSM 950).

Drei Monate nach Zahnextraktion und Defektsetzung im seitlichen anterioren Oberkiefer wurde bei vier Hunden in Intubationsnarkose beidseits nach krestaler Schnittführung ein Mukoperiostlappen gebildet und 0,5 ccm eines xenogenen Knochenersatzmaterials der Granulatgröße 0,5 – 1 mm lateral auf den Kieferkamm aufgebracht. Die Augmentate wurden mit JM oder BG (Jason® Kollagen Membran, botiss) im Sinne der gesteuerten Knochenregeneration abgedeckt. Dabei erfolgte die Rehydrierung von JM vor Applikation, BG wurde erst nach Applikation mit steriler NaCl rehydriert. Der Lappen wurde nach Periostschlitzung readaptiert und der Zugang mittels resorbierbarer Naht (PGA Resorba®, Resorba, Nürnberg) speicheldicht verschlossen. Nach 4, 8, 12 und 24 Wochen wurden die entsprechenden Kieferabschnitte zur weiteren histologischen Aufarbeitung entnommen. Die Gewebe wurden in Formalin fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und hartgewebshistologisch aufbereitet [10]. Die Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte nach Toluidinblaufärbung unter einem Durchlichtmikroskop (BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland) in Verbindung

mit einem Videoaufsatz (SIS Color View2, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland). Zur Auswertung wurde eine spezielle Software (SIS analySIS Auto Software 3.2, Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) verwendet.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen sind in Abb. 1 dargestellt. Nach 2 Stunden zeigte JM signifikant höhere Werte als TD und BG ($P < 0,05$). Nach 3 Tagen wies TD die signifikant höchsten Werte auf ($P < 0,05$), während bei JM und BG ein initialer Abfall der Messwerte feststellbar war. Nach einer maximalen Inkubationszeit von 7 Tagen waren JM und TD der BG-Gruppe signifikant überlegen ($P < 0,05$, ANOVA).

In der rasterelektronenmikroskopischen Analyse zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Makro- und Mikromorphologie von BG und JM. JM wies eher ein interkonnektierendes Porensystem auf, welches über ein dichtes Netzwerk an dreidimensionalen Kollagensträngen miteinander in Verbindung stand (Abb. 2a, b). BG zeigte sich vornehmlich aus einzelnen Kollagensträngen aufgebaut, welche sich bei höherer Vergrößerung in viele schmale Einzelfibrillen differenzieren ließen (Abb. 2c, d). BG zeigte einen bimodalen Aufbau mit glatter Oberseite und deutlich rauerer Unterfläche. Bei JM war ein vergleichbarer Aufbau in geringerer Ausprägung zu beobachten.

In-vivo zeigten beide Membranen nach vierwöchiger Heilungsperiode eine gute Gewebsintegration. In die Zwischenräume der Membrankörper waren vereinzelt

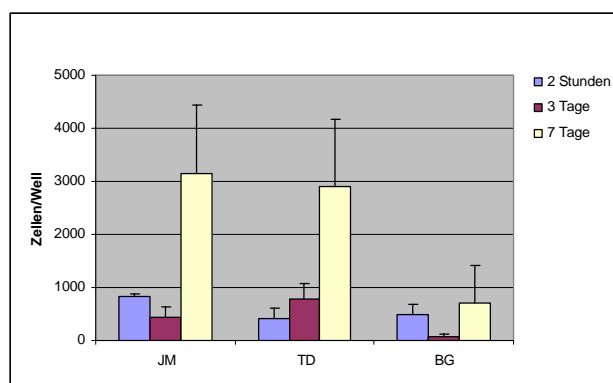


Abb. 1: Zellzahl auf unterschiedlichen Kollagenmembranen nach den jeweiligen Inkubationszeiten

Tabelle 1: Anzahl, Mittelwerte und Standardabw. der Zellzahlen/Well

Time	N	JM	TD	BG
2 Stunden	8	835 ± 50	422 ± 191	484 ± 203
3 Tage	8	444 ± 191	769 ± 307	82 ± 37
7 Tage	8	3147 ± 1301	2910 ± 1273	707 ± 706

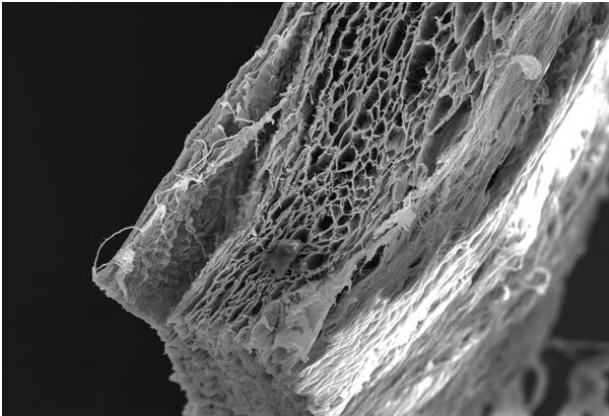


Abb. 2a: REM von JM, Originalvergrößerung 100x

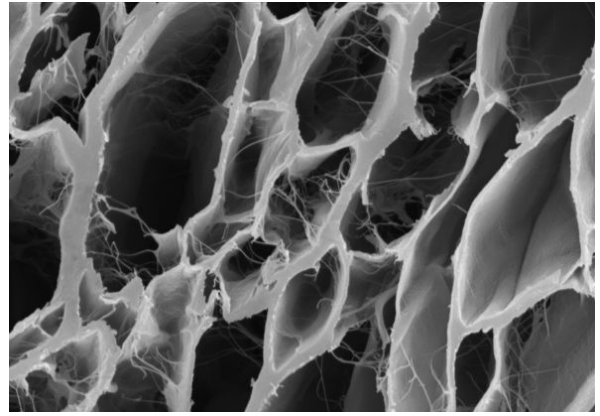


Abb. 2b: REM von JM, Originalvergrößerung 1000x

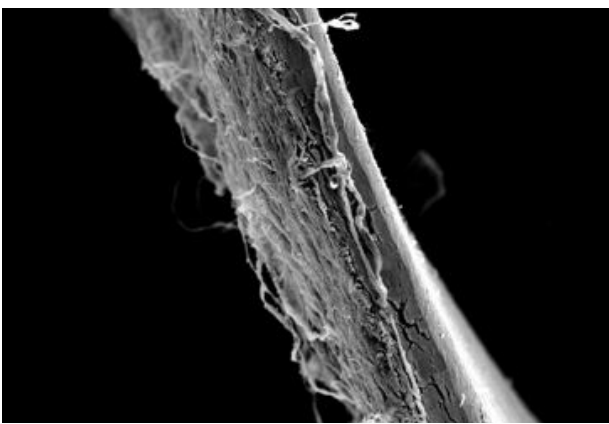


Abb. 2c: REM von BG, Originalvergrößerung 100x

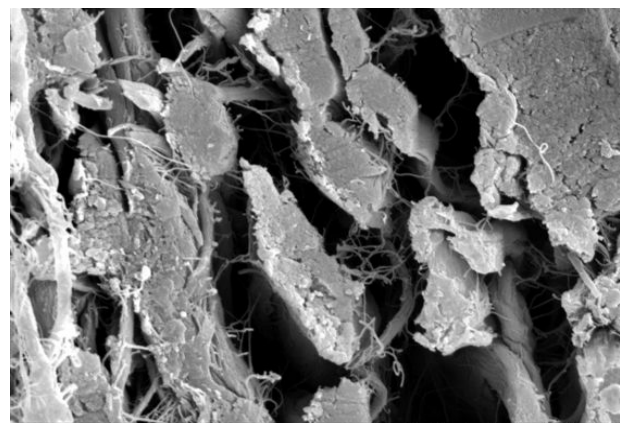


Abb. 2d: REM von JM, Originalvergrößerung 1000x

Blutgefäße eingewachsen. Eine Entzündungsreaktion ließ sich nicht fest stellen (Abb. 3a, b). Im direkten Vergleich erschienen die Kollagenanteile von JM besser abgrenzbar (Abb. 3a), während das Kollagen von BG schon initial resorbiert erschien (Abb. 3b). Nach 8 Wochen war BG annähernd vollständig abgebaut und durch ein kollagenfaserreiches Bindegewebe mit Blutgefäßen ersetzt. JM ließ sich bei Zunahme der Blutgefäßdichte noch deutlich identifizieren, wiederum ohne Nachweis von Entzündungszellen (Abb. 3c). Nach 12 Wochen erschien auch JM weitestgehend resorbiert. An seine Stelle war ein kollagenfaserreiches Periost auf neu gebildetem Knochengewebe getreten. Nur noch vereinzelt waren eher wolkige, faserreiche Strukturen als Überreste des Xenokollagens nachweisbar (Abb. 3d). Nach 24 Wochen ließen sich bei abgeschlossener Knochenregeneration weder Anteile von JM, noch von BG nachweisen.

DISKUSSION

Der in-vitro Anteil dieser Untersuchung wurde durchgeführt, um die Zellanlagerung und Proliferation von SaOs-2-osteoblastenähnlichen Zellen zu untersuchen. Das Biomaterial Kollagen hat sich in der Vergangenheit als sehr geeignetes Material für chirurgische Eingriffe

etabliert. Es konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass Kollagene eine aktive Rolle bei der Aktivierung der Blutgerinnung und damit in der Entstehung des für die Wundheilung wichtigen Blutkoagulums spielen. Zudem hat es eine chemotaktische Wirkung auf PDL-Fibroblasten und Gingivafibroblasten und liefert eine der Hauptkomponenten des parodontalen Halteapparates [11-14]. Tatsächlich war eine signifikante Proliferation auf allen drei getesteten Kollagenen ersichtlich, wenngleich sich das initiale Attachment der Zellen bei JM besser gestaltete als bei BG und TD. Der zunächst beobachtete Abfall der Zellzahl auf JM und BG ist am ehesten durch eine Selektion der Zellen im Rahmen der initialen Zellproliferation zu erklären. Zudem decken sich die Ergebnisse mit anderen Studien, die ebenfalls eine gute Anlagerung und Proliferation von Osteoblasten vor allem auf nicht quervernetzten Membranen beobachten konnten [15-18]. Eine Vernetzung mit Glutaraldehyd hingegen zeigte eine Verringerung der Membran Biokompatibilität bis hin zu zytotoxischen Effekten [18-20]. Wenngleich die SaOs-2-Zellen keine primäre Osteoblastenzelllinie sind, sondern aus einem Osteosarkom isoliert wurden, haben verschiedene Arbeiten sie als Zelllinie mit sehr knochenzellähnlichen Eigenschaften charakterisiert [21, 22].

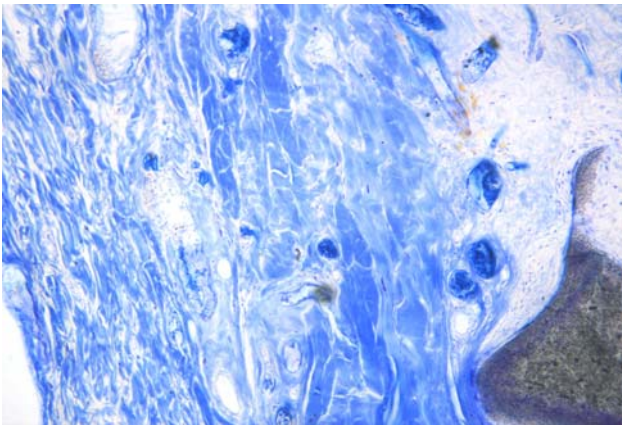


Abb. 3a: JM nach 4 Wochen Heilungsperiode, Vergr. 100x

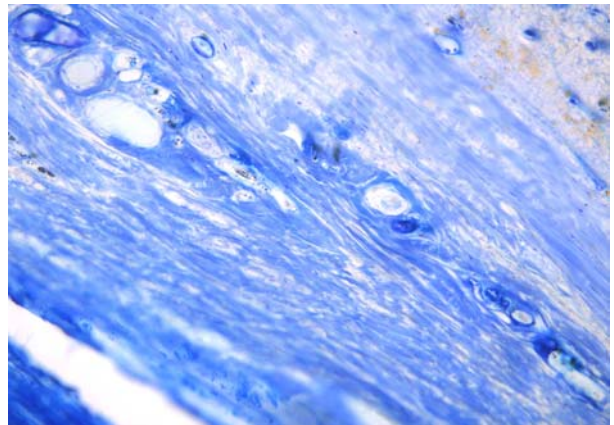


Abb. 3b: BG nach 4 Wochen Heilungsperiode, Vergr. 200x

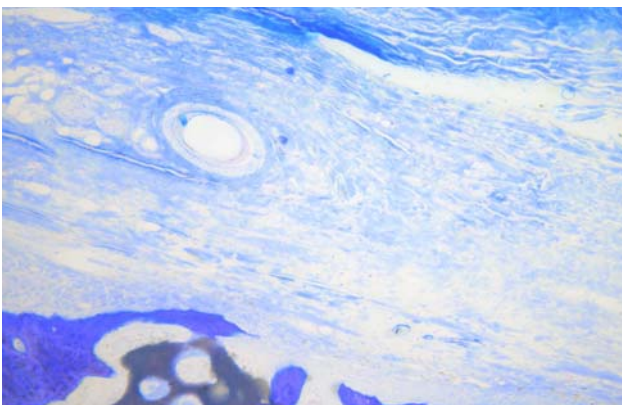


Abb. 3c: JM nach 8 Wochen Heilungsperiode, Vergr. 200x

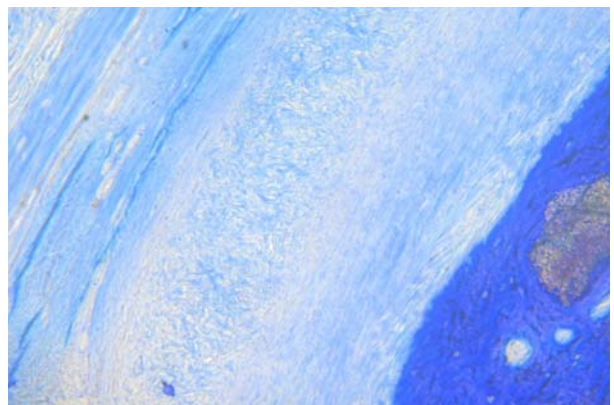


Abb. 3d: JM nach 12 Wochen Heilungsperiode, Vergr. 400x

Die in-vivo Anteile der vorliegenden Arbeit hatten zum Ziel, die Biodegradation, Gewebeintegration, zelluläre Reaktion und Vaskularisierung zu untersuchen. Es zeigte sich eine vergleichbare Gewebeintegration und Vaskularisierung von JM und BG, ohne dass zellentzündliche Vorgänge identifiziert werden konnten. Für BG wurde eine sehr eingeschränkte Barrierefunktion mit initialer Resorption bereits nach 4 Wochen Heilungsperiode fest gestellt. Diese Beobachtung deckt sich mit einer anderen Tierstudie, in der BG in chirurgisch gebildete Taschen bei Hunden implantiert wurde [23]. Die Autoren beschrieben eine mittelmäßige bis starke Biodegradation von BG innerhalb von vier bis acht Wochen. Nach subkutaner Implantation in Ratten ließ sich eine Resorption innerhalb der ersten 4 Wochen fest stellen, während eine ebenfalls native porcine Perikardmembran eine deutlich längere Barrierefunktion aufrecht erhielt [8].

Die beobachtete kurze Barrierefunktion steht in gewissem Widerspruch zu dem ursprünglich beschriebenen GTR-Prinzip der Einlage einer mechanischen Barriere zur Fernhaltung unerwünschter Zelltypen [4, 5]. Auf der anderen Seite erlaubt die rasche Vaskularisierung und Biodegradation einer offenporigen Membran eine schnelle Wiederherstellung der Ernährungsfunktion von Seiten des aufliegenden Periostes. Dies könnte einen

Vorteil für die Hartgewebsheilung nach GTR- und GBR-Eingriffen darstellen [24]. In verschiedenen histologischen Studien wurde nachgewiesen, dass auch die Anwendung von BG in Verbindung mit porösen Knochenersatzmaterialien zu einer knöchernen oder auch parodontalen Regeneration mit Ausbildung neuer Sharpey'scher Fasern führt [25, 26] und eine Knochenregeneration trotz schneller Biodegradation unterstützt [27, 28].

Kommt es zu einer Exposition zur Mundhöhle, so wird der Abbau von Kollagenmembranen stark beschleunigt. [29]. Hierbei sollen vor allem kollagenasebildende parodontopathogene Keime beteiligt sein [18]. Dabei wurde für eine enzymatisch stabilisierte Membran eine sekundäre Epithelialisierung des exponierten Areals vom Randbereich und ein sekundärer Wundverschluss mit unmittelbar unterliegender knöcherner Regeneration beobachtet [30, 31].

Quervernetztes Kollagen zeigt eine im Vergleich zu BG deutlich verlängerte Biodegradationszeit [8, 32-34]. Auf der anderen Seite geht diese reduzierte Resorption mit einer Verringerung der Gewebeintegration einher. Zudem war bei chemisch quervernetzten Membranen ein deutlich entzündlicher Abbau mit Einwanderung von mehrkernigen Riesenzellen zu beobachten [8]. Die Interaktion der Entzündungszellen schränkt die

Anlagerung und Proliferation von Fibroblasten ein und kompromittiert über eine verringerte Kollagenproduktion die Festigkeit des Gewebverbundes [35]. Allerdings konnte histologisch auch gezeigt werden, dass sowohl die Anwendung von BM als auch von BG in-vivo bei periimplantären Dehiszenzen zu einer verbesserten Knochenregeneration führt [36]. Auch in einer groß angelegten Vergleichsstudie zur periimplantären Dehiszenzdefektaugmentation zeigte sich für verschiedene Membranen letztlich immer eine knöcherne Regeneration der Augmentate [37].

In der vorliegenden Arbeit zeigten BG und JM eine vergleichbare, frühzeitige Angiogenese. Dabei ist anzumerken, dass eine solche transmembranäre Blutgefäßpenetration den Anschluss der Blutgefäße des Wundgebietes zum gebildeten Mukoperiostlappen erlaubt und die Geweberegeneration bei oral- und parodontalchirurgischen Eingriffen positiv beeinflussen könnte [38]. Diese Hypothese wird durch die Grundlagen der Knochenentstehung unterstützt. Es wurde berichtet, dass sich osteogenetische Zellen aus undifferenzierten mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmarkstroma und aus Perizyten kleinerer Blutgefäße des Bindegewebes entwickeln können [39-41]. Zudem besteht eine enge räumliche und zeitliche Verbindung zwischen der Neubildung von Blutgefäßen und extraskelletaler Knochenneubildung [42]. So wird aus klinischer Sicht in verschiedenen Studien die Perforation der unterliegenden kompakten Knochenstruktur bei GTR/GBR-Eingriffen empfohlen [43, 44]. Die Eröffnung der Knochenmarkräume soll über eine beschleunigte Vaskularisation eine verbesserte Knochenregeneration ermöglichen. Andere Studien ließen diese Beobachtung jedoch nicht bestätigen [45].

SCHLUSSFOLGERUNG

Es lässt sich schlussfolgern, dass JM, BG und TD eine Proliferation von Zellen auf ihrer Oberfläche unterstützen und sich somit durch eine hohe Biokompatibilität auszeichnen. Während die faserig aufgebaute BG-Membran entzündungsfrei innerhalb von vier bis acht Wochen degradiert wird, ließ sich eine Resorptionsdauer der interkonnektiv-porigen JM bei gleicher Gewebsintegration und Blutgefäßinvasion innerhalb von acht bis zwölf Wochen fest stellen.

LITERATURNACHWEIS

1. Araujo, M.G. and J. Lindhe: Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 32(2): 212-8 (2005)
2. Schwartz, Z., J. Goultschin, D.D. Dean, et al.: Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 14: 158-72 (1997)
3. Garofalo, G.S.: Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation:

literature review, current status and prospects. *Minerva Stomatol.* 56(7-8): 373-92 (2007)

4. Dahlin, C., A. Linde, J. Gottlow, et al.: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 81(5): 672-6 (1988)
5. Gottlow, J., T. Karring, and S. Nyman: Guided tissue regeneration following treatment of recession-type defects in the monkey. *J Periodontol.* 61(11): 680-5 (1990)
6. Bunyaratavej, P. and H.L. Wang: Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology.* 72(2): 215-29 (2001)
7. Tatakis, D.N., A. Promsudthi, and U.M. Wikesjo: Devices for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000. 19: 59-73 (1999)
8. Rothamel, D., F. Schwarz, M. Sager, et al.: Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 16(3): 369-78 (2005)
9. Schwarz, F., D. Rothamel, M. Hertel, et al.: Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 17(4): 403-9 (2006)
10. Donath, K.: The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Sage-Schliff (sawing and grinding) technique). *Pathol Res Pract.* 179(6): 631-3 (1985)
11. Yaffe, A., J. Ehrlich, and S. Shoshan: Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *Journal of Periodontology.* 55(11): 623-8 (1984)
12. Hutmacher, D., M.B. Hutzler, and H. Schliephake: A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants.* 11(5): 667-78 (1996)
13. Locci, P., M. Calvitti, S. Belcastro, et al.: Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology.* 68(9): 857-63 (1997)
14. Postlethwaite, A.E., J.M. Seyer, and A.H. Kang: Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 75(2): 871-5 (1978)
15. Wang, H.L., M. Miyauchi, and T. Takata: Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an *in vitro* study. *Journal of Periodontal Research.* 37: 340-344 (2002)
16. Takata, T., H.L. Wang, and M. Miyauchi: Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *Journal of Periodontal Research.* 36(5): 322-7 (2001)
17. Takata, T., H.L. Wang, and M. Miyauchi: Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clinical Oral Implants Research.* 12(4): 332-8 (2001)

18. Rothamel, D., F. Schwarz, A. Sculean, et al.: Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res.* 15(4): 443-9 (2004)
19. Speer, D.P., M. Chvapil, C.D. Eskelson, et al.: Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 14(6): 753-64 (1980)
20. Wiebe, D., J. Megerman, G.J. L'Italien, et al.: Glutaraldehyde release from vascular prostheses of biologic origin. *Surgery.* 104(1): 26-33 (1988)
21. Murray, E., D. Provvedini, D. Curran, et al.: Characterization of a human osteoblastic osteosarcoma cell line (SAOS-2) with high bone alkaline phosphatase activity. *J Bone Miner Res.* 2(3): 231-8 (1987)
22. Rodan, S.B., Y. Imai, M.A. Thiede, et al.: Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* 47(18): 4961-6 (1987)
23. Owens, K.W. and R.A. Yukna: Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent.* 10(1): 49-58 (2001)
24. Hurley, L.A., F.E. Stinchfield, A.L. Bassett, et al.: The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am.* 41-A: 1243-54 (1959)
25. Camelo, M., M.L. Nevins, R.K. Schenk, et al.: Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 18(4): 321-31 (1998)
26. Camelo, M., M.L. Nevins, S.E. Lynch, et al.: Periodontal regeneration with an autogenous bone-Bio-Oss composite graft and a Bio-Gide membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 21(2): 109-19 (2001)
27. Zitzmann, N.U., P. Scharer, C.P. Marinello, et al.: Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 21(3): 288-95 (2001)
28. Ersanli, S., V. Olgac, and B. Leblebicioglu: Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *J Periodontol.* 75(5): 750-6 (2004)
29. Paul, B.F., J.T. Mellonig, H.J. Towle, 3rd, et al.: Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 12(2): 123-31 (1992)
30. Friedmann, A., F.P. Strietzel, B. Marezki, et al.: Observations on a new collagen barrier membrane in 16 consecutively treated patients. Clinical and histological findings. *J Periodontol.* 72(11): 1616-23 (2001)
31. Friedmann, A., F.P. Strietzel, B. Marezki, et al.: Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clin Oral Implants Res.* 13(6): 587-94 (2002)
32. Paul, B.F., J.T. Mellonig, H.J. Towle, 3rd, et al.: Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry.* 12(2): 123-31 (1992)
33. von Arx, T., N. Broggini, S.S. Jensen, et al.: Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 20(6): 843-53 (2005)
34. Pitaru, S., H. Tal, M. Soldinger, et al.: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *Journal of Periodontology.* 59(6): 380-6 (1988)
35. Franke Stenport, V. and C.B. Johansson: Enamel matrix derivative and titanium implants. An experimental pilot study in the rabbit. *J Clin Periodontol.* 30: 359-363 (2003)
36. Breithaupt-Faloppa, A.C., J. Kleinheinz, and O. Crivello, Jr.: Endothelial cell reaction on a biological material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 76(1): 49-55 (2006)
37. Schwarz, F., D. Rothamel, M. Herten, et al.: Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 19(4): 402-15 (2008)
38. Hardwick, R., T.V. Scantlebury, R. Sanchez, et al.: Guided bone regeneration in implant dentistry. *Quintessenz Pub.,* (1994)
39. Long, M.W., J.A. Robinson, E.A. Ashcraft, et al.: Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest.* 95(2): 881-7 (1995)
40. Reilly, T.M., R. Seldes, W. Luchetti, et al.: Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop.* (346): 95-103 (1998)
41. Rickard, D.J., M. Kassem, T.E. Hefferan, et al.: Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res.* 11(3): 312-24 (1996)
42. Schmid, J., B. Wallkamm, C.H. Hammerle, et al.: The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res.* 8(3): 244-8 (1997)
43. Buser, D., U. Bragger, N.P. Lang, et al.: Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1(1): 22-32 (1990)
44. Schmid, J., C.H. Hammerle, A.J. Olah, et al.: Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 5(3): 125-30 (1994)
45. Lundgren, A.K., D. Lundgren, C.H. Hammerle, et al.: Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. *Clin Oral Implants Res.* 11(2): 99-106 (2000)