

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Martin Gosau

***in vivo* analysis of the inflammatory tissue reactions to a synthetic non-resorbable PTFE membrane by means of histopathological and histomorphometrical methods**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tadas Korzinskas
aus Klaipeda (Litauen)

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.07.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Beikler

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD. Dr. Till Köhne

Meiner Großmutter Agafija

Inhaltsverzeichnis

Publikationsdissertation

Zusammenfassung Darstellung der Publikationsdissertation 5-17

Zusammenfassung (deutsch/englisch) 18-40

Literaturverzeichnis 30-32

Anhang 41-50

- Erklärung Eigenanteil
- Danksagung 55-60
- Lebenslauf
- Publikationsverzeichnis
- Eidesstattliche Erklärung



Article

In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration

Tadas Korzinskas ^{1,†}, Ole Jung ^{1,†}, Ralf Smeets ¹, Sanja Stojanovic ², Stevo Najman ², Kristina Glenske ³, Michael Hahn ⁴, Sabine Wenisch ³, Reinhard Schnettler ⁵ and Mike Barbeck ^{1,6,*}

¹ Section for Regenerative Orofacial Medicine, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; tadaskorzinskas@yahoo.de (T.K.); ol.jung@uke.de (O.J.); r.smeets@uke.de (R.S.)

² Institute of Biology and Human Genetics, Department for Cell and Tissue Engineering, University of Niš, Faculty of Medicine, 18106 Niš, Serbia; s.sanja88@gmail.com (S.S.); stevo.najman@gmail.com (S.N.)

³ Clinic of Small Animals, c/o Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Justus Liebig University of Giessen, 35390 Giessen, Germany; Kristina.Glenske@vetmed.uni-giessen.de (K.G.); Sabine.Wenisch@vetmed.uni-giessen.de (S.W.)

⁴ Department of Osteology and Biomechanics, University Hospital Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; hahn@uke.de

⁵ University Medical Center, Justus Liebig University of Giessen, 35390 Giessen, Germany; reinhard.schnettler@mac.com

⁶ BerlinAnalytix GmbH, 12109 Berlin, Germany

* Correspondence: mike.barbeck@icloud.com; Tel.: +49-17681022467

† These authors contributed equally to this work.

Received: 24 August 2018; Accepted: 25 September 2018; Published: 27 September 2018

Abstract: The use of non-resorbable polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes is indicated for the treatment of large, non-self-containing bone defects, or multi-walled defects in the case of vertical augmentations. However, less is known about the molecular basis of the foreign body response to PTFE membranes. In the present study, the inflammatory tissue responses to a novel high-density PTFE (dPTFE) barrier membrane have preclinically been evaluated using the subcutaneous implantation model in BALB/c mice by means of histopathological and histomorphometrical analysis methods and immunohistochemical detection of M1- and M2-macrophages. A collagen membrane was used as the control material. The results of the present study demonstrate that the tissue response to the dPTFE membrane involves inflammatory macrophages, but comparable cell numbers were also detected in the implant beds of the control collagen membrane, which is known to be biocompatible. Although these data indicate that the analyzed dPTFE membrane is not fully bioinert, but its biocompatibility is comparable to collagen-based membranes. Based on its optimal biocompatibility, the novel dPTFE barrier membrane may optimally support bone healing within the context of guided bone regeneration (GBR).

Keywords: PTFE membrane; collagen membrane; biocompatibility; tissue reaction; inflammation; macrophage; M1; M2

1. Introduction

Guided bone regeneration (GBR) is widely used in the fields of periodontology, implant dentistry, and maxillofacial surgery. Dental barrier membranes allow for the formation and maintenance of

spaces, which, when filled with bone substitutes, stabilizes blood clots and allow the migration of osteoprogenitor cells in to the space intended for bone regeneration, while preventing the area from soft tissue penetration or collapse [1,2]. In this context, barrier membranes have to fulfill the following main criteria: separation of hard and soft tissue up to the time point of completed bone regeneration, biocompatibility, space-maintenance, cell-occlusiveness, tissue integration, and clinical manageability, amongst other different requirements [3]. Different biological and physical properties of the variety of available barrier membranes contribute to clinical decision making regarding their indications for use.

Resorbable barrier membranes are based on natural or synthetic resorbable polymers, and they are widely used for GBR [4]. Most of the resorbable barrier membranes are based on collagen, which is derived from different sources, i.e., different species such as pigs or cattle, and different harvesting sites such as the subcutaneous connective tissue or the pericardium [5]. Altogether, collagen-based barrier membranes have most often been shown to be very biocompatible biomaterials, and they allow for a comparable degree of bone regeneration, like non-resorbable membranes [6,7]. Collagen membranes avoid the need for second-stage surgery for removal, they are easy to handle, are cost effective, and show less morbidity [8]. However, the disadvantage of the collagen membranes is their lack of ability to maintain spatial stability, which in some cases leads to collapse and therefore diminished grafted bone volume [9]. Resorbable membranes of synthetic origin have also been shown to be suitable for bone regeneration. Polylactic acid (PLA)- or polylactic-co-glycolic-acid (PLGA)-based membranes provide good spatial stability of the graft material [9]. Nonetheless, these biomaterials are degraded by non-enzymatic hydrolysis and cellular metabolization under the release of acidic molecules, which negatively influences their biocompatibility and the healing process [10]. Altogether, most of the currently available resorbable barrier membranes are limited with regard to the treatment of large, non-contained bone defects or multi-walled defects, or in case of vertical augmentations.

Although second-stage surgery is required for their removal, the use of non-resorbable membranes is still indicated for GBR procedures in the case of the afore-mentioned clinical situations, as they offer a higher form of stability and space-maintaining properties [11]. Commercially available non-resorbable barrier membranes are most often made of polytetrafluoroethylene (PTFE). PTFE has been shown to be biocompatible, and it maintain its integrity during and after implantation. Some PTFE membranes are even combined with structural elements such as titanium [9]. In this context, both high density PTFE (dPTFE) and semipermeable expanded PTFE (ePTFE) membranes are available, both providing different advantages [12]. While semipermeable PTFE membranes may support a transmembraneous transport of nutrients, dense PTFE membranes have shown to act as an efficient barrier against bacterial and cellular penetration in different clinical indications, due to its small pore size [13].

Interestingly, PTFE-based biomaterials are stated to be bioinert, which means they do not induce a tissue reaction when introduced to biological tissue [14]. However, it has been shown that nearly every biomaterial induces an inflammatory tissue reaction, which is unique for every material depending on its combination of physical and chemical properties [15]. This tissue reaction to a biomaterial is a cascade including mainly macrophages as key elements, which have been shown to express both pro- and anti-inflammatory molecules depending on material factors such as surface topography or surface chemistry [16–18]. Based on their molecule expression, macrophages are more or less divided into pro-inflammatory M1- and anti-inflammatory M2 subtypes [19,20]. Taken together, it is believed that the successful clinical application of a biomaterial has to be accompanied by an “overall M2 tissue reaction” to promote tissue healing, while a chronic pro-inflammatory tissue response may lead to negative consequences for tissue remodeling, such as fibrous encapsulation [19,20]. Thus, the understanding of the material-specific foreign body reaction, and of the interactions of the immune system with a biomaterial is pivotal to ensure the safety, biocompatibility, and functionality of a medical device.

Interestingly, there are very limited data about the degree of the foreign body response to non-resorbable PTFE membranes. Thus, the present preclinical *in vivo* study aims to analyze the tissue responses to a new synthetic, non-resorbable high-density PTFE barrier membrane. Following

implantation into the subcutaneous connective tissue of BALB/c mice for up to 30 days, the hypothesis of the bioinertness of PTFE-based biomaterials has been evaluated. A commercially available collagenous barrier membrane that has already been examined in different preclinical and clinical studies and described as biocompatible biomaterial was used as control material [21–23]. Established histopathological and histomorphometrical analysis methods, and especially immunohistochemical detection of M1- and M2-macrophages have been applied [24–28].

2. Results

2.1. Histological (Qualitative) Analysis

The results of the histological analysis showed an inflammatory tissue reaction within the implantation beds of the dPTFE membranes at day 10 post-implantation (Figure 1A). A thin reactive tissue wall was detectable surrounding the membranes, which was mainly composed of inflammatory cell types such as macrophages and granulocytes, besides single other cell types such as fibroblasts (Figure 1A). Furthermore, single vessels have been found within the reactive connective tissue (Figure 1A). At this time point, no biomaterial-associated multinucleated giant cells (BMGCs) have been observed. Furthermore, no tissue ingrowth into the membrane has been detected.

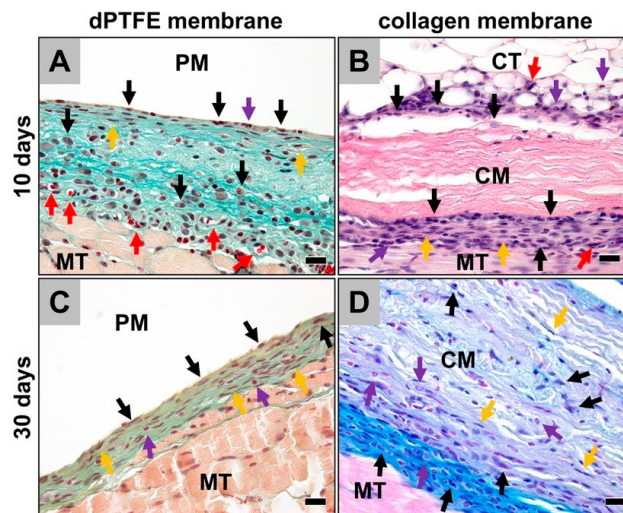


Figure 1. The histological images from the implantation beds of the analyzed membranes, i.e., the dPTFE membrane (PM) and the collagen membrane (CM) within the subcutaneous connective tissue (CT) (MT = muscle tissue). (A) At the surfaces of the dPTFE membrane, a thin layer of mononuclear cells that mainly belonged to the monocyte/macrophage line (black arrows) beside single granulocytes (purple arrow) were observable. Within the reactive peri-implant tissue, mainly macrophages (black arrows) and fibroblasts (yellow arrows) were found, besides small numbers of granulocytes and lymphocytes as well as some small vessels (red arrows) (Movat's Pentachrome-staining, 400× magnification, scale bar = 20 μm). (B) Into the implant beds of the collagen membranes, a comparable tissue reaction, including mainly macrophages (black arrows) besides single eosinophils and fibroblasts (purple/yellow arrows) (haematoxylin and eosin (HE)-staining, 400× magnification, scale bar = 20 μm). At this time point only some single cells have migrated into the outer regions of the membrane body. (C) At day 30 after implantation, the wall of reactive tissue around the dPTFE membranes have visibly been decreased. Macrophages (black arrows) were still observed dominating the tissue reaction beside single eosinophils and fibroblasts (purple/yellow arrows) (Movat's Pentachrome-staining, 400× magnification, scale bar = 20 μm). (D) Also, into the implant beds of the collagen membrane mainly macrophages (black arrows) have been detected at this time point, together with low numbers of eosinophils and fibroblasts (purple/yellow arrows). At day 30 after implantation, more cells have invaded the membranes body, while the material showed no signs of breakdown (Alcian blue-staining, 400× magnification, scale bar = 20 μm).

In case of the collagen membrane (control), a comparable tissue reaction has been observed (Figure 1B). Mainly cell types such as macrophages, eosinophilic granulocytes, and single fibroblasts were found within the thin walls of the reactive tissue adherent to the biomaterial (Figure 1B). Only some single cells penetrated the membrane body at this early post-implantation time point of 10 days outgoing (Figure 1B). Furthermore, no BMGCs were detected at this time point.

The analysis of the immunohistochemically stained slides showed that more CD206-positive M1 macrophages were observable at this early study time point, compared to M2 positively stained with CD163 within the implantation beds of both materials (Figure 2A–D). Interestingly, no differences in the

cell numbers of the CD163 nor the CD206 fractions have been microscopically observed between both study groups.

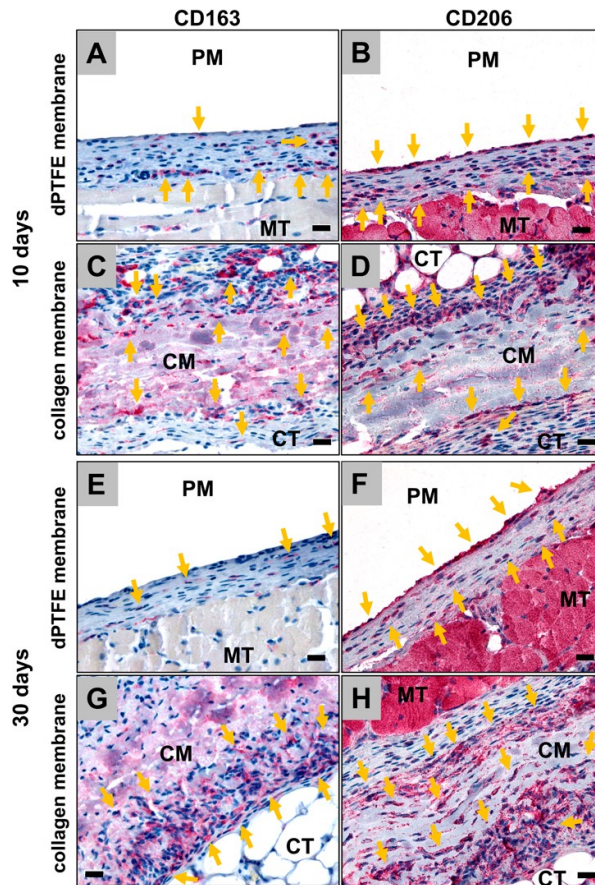


Figure 2. Exemplary images of the detection of M2 (CD163) and M1 (CD206) positive macrophages (yellow arrows) into the implantation beds of the dPTFE and the collagen membrane at day 10 (A–D) and day 30 (E–H) after implantation (all images: 400× magnification, scale bar = 20 μm).

At day 30 post-implantation, the width of the reactive tissue wall adherent to the dPTFE membranes was clearly decreased (Figure 1C). Histopathological analyses showed that the reactive tissue was still composed of the same cell types, i.e., macrophages, granulocytes, and fibroblasts (Figure 1C). However, the numbers of granulocytes and macrophages have visibly been declined indicating a reduction of the degree of inflammation described at day 10 post implantation. At this time point, some single BMGCS have been found to be adherent to the dPTFE membranes. Still, no cell penetration or tissue ingrowth into the membranes was observed.

In case of the collagen membranes a similar tissue reaction compared to that observed at day 10 post-implantation has been detected (Figure 1D). Thus, macrophages, eosinophilic granulocytes and fibroblasts were found within the small walls of reactive tissue that are adherent to the material surfaces (Figure 1D). Moreover, the same cell types have microscopically been observed within the material bodies, but with significantly lower numbers compared to the surface-adherent connective tissue (Figure 1D). Only very low numbers of BMGCS sporadically found at the material surfaces have been found within the implantation beds of the collagen membrane. No ingrowth of complex tissue or any signs of a material breakdown have been detected.

The analysis of the immunohistochemically stained slides showed that the number of CD163-positive M2 macrophages has clearly decreased in the implantation beds of both biomaterials, while still no differences of the cell numbers in both groups could microscopically be detected (Figure 2E–H). Furthermore, it was observed that the numbers of CD206-positive M1 macrophages seemed to be comparable to the numbers of M2 macrophages in both groups (Figure 2E–H).

2.2. Histomorphometrical (Quantitative) Analysis

The histomorphometrical analysis of the occurrence of pro- and anti-inflammatory cells showed that comparable numbers of CD163-positive M2 macrophages were detected in the implantation beds of the dPTFE membrane (1295.0 ± 529.8 cells/mm²) and the collagen membrane (1174.0 ± 476.9 cells/mm²) at day 10 after implantation (Figure 3). Furthermore, comparable numbers of CD206-positive M1 macrophages were found in the implantation beds of both biomaterials (dPTFE membrane: 2339.0 ± 608.6 cells/mm²; collagen membrane: 2159.0 ± 478.8 cells/mm²) at this study time point (Figure 3). In the implantation beds of both materials, significantly higher numbers of M1 macrophages ($*p < 0.05$) compared to the numbers of M2 macrophages per mm² were detected at this time point (Figure 3).

At day 30 post implantation, comparable numbers of M2 macrophages have been found in the implantation beds of both membranes (dPTFE membrane: 968.0 ± 185.0 cells/mm²; collagen membrane: 568.2 ± 320.8 cells/mm²), but without any significance compared to the former study time point (Figure 3). Also, comparable numbers of M1 macrophages have been detected within the implant beds of both analyzed biomaterials (dPTFE membrane: 1182.0 ± 506.7 cells/mm²; collagen membrane: 1208.0 ± 346.5 cells/mm²) and no significant differences compared to the numbers of CD163-positive cells have been measured (Figure 3). Moreover, in case of both biomaterials, the numbers of M1 macrophages decreased significantly compared with day 10 after implantation ($p < 0.001$ and $\bullet p < 0.05$) (Figure 3).

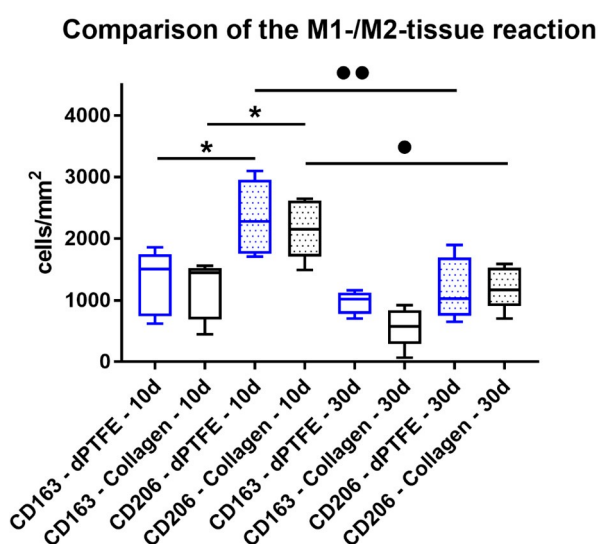


Figure 3. The results of the histomorphometrical analysis of the M1 and M2 macrophages within the implantation beds of both materials ($*p < 0.05$ and $\bullet p < 0.01$).

3. Discussion

Different barrier membranes are available for guided bone regeneration (GBR) procedures, which can mainly be divided into resorbable and non-resorbable materials. Although resorbable membranes are preferred due to the avoidance of a second surgery, clinical situations such as bone defects outside the ridge contour, multi-walled bone defects, or vertical augmentations require maintenance of the spatial barrier, which can be achieved by the application of non-resorbable materials such as PTFE membranes [11]. Furthermore, ethical issues due to the xenogenic origin of collagen membranes make PTFE a preferable GBR-membrane due to its synthetic origin [29]. PTFE-based membranes have been described in manifold to enable successful barrier functionality and associated successful bone regeneration, in various preclinical and clinical studies [1,30,31]. Moreover, the biocompatibility of PTFE materials has widely been studied, although limited knowledge about the underlying cellular responses exists. In this context, PTFE materials have been described to be bioinert [32,33]. However, it has been stated that no material implanted in living tissue is inert, because every biomaterial induces a tissue response [15]. Thus, the present study was conducted to examine the immune responses to a new dPTFE barrier membrane by the means of published histopathological and histomorphometrical analysis methods mainly focusing on immunohistochemical detection of M1- and

M2-macrophages [24–28]. A collagen membrane described as a biocompatible and resorbable biomaterial was used as control [21–23].

The results of the present study show that the dPTFE membrane induced a tissue response, including inflammatory cell types such as macrophages and granulocytes, up to day 30 post implantation. Interestingly, the histomorphometrical detection of both macrophage subtypes showed that more CD206-positive M1 macrophages were present at day 10 after implantation, compared to macrophages expressing the M2 phenotype, and that this tissue reaction pattern was found to be comparable to the control collagen membrane. However, this early pro-inflammatory tissue reaction was not unexpected, as it is known that day 10 displays an early post-implantation phase, which still includes the reactions to the implantation procedure per se. More interestingly, the analysis showed a decrease of pro-inflammation reflected by the significant reduction of M1 macrophages at 30 days in both groups. Although no differences between the numbers of CD206-positive cells within the implantation beds of both biomaterials have been measured, the decrease of M1 macrophages was more pronounced in the case of the dPTFE membrane, as expressed by the higher significance level, as in case of the collagen membrane. Taken together, the significantly higher pro-inflammatory tissue response at day 10 after implantation was reduced at day 30 to a comparable level of M1 and M2 macrophages, even in the case of the dPTFE membrane.

In this context, it has been reported that an initial response of M1 macrophages that have been shown to lead to high levels of pro-inflammatory cytokine expressions to a biomaterial is a necessary process, while a prolonged proinflammatory response is associated with material failures, as it will induce a severe foreign body reaction or fibrous encapsulation [34]. In contrast, M2 macrophages consistently express anti-inflammatory cytokines that lead to a suppression of an inflammatory immune response, and that guide the tissue remodeling process [34]. These results lead to the conclusion that the dPTFE membrane altogether did induce an inflammatory tissue response that was comparable to the collagen membrane, which is considered to be biocompatible [35–37]. The tissue reaction to a non-resorbable biomaterial is comparable to that of a resorbable material, and this might be explained by the degradation mechanism of collagen-based biomaterials, which are mainly processed by physiological enzymes, such as matrix metalloproteinases (collagenases) [37]. This suggests that also in case of collagen membranes not a high level of inflammation is required for their degradation and, thus, the severity of pro- and anti-inflammation is comparable in the case of both biomaterials.

Furthermore, the question arises as to what may be the reasons for the found level of inflammation in the case of a non-resorbable biomaterial such as the analyzed dPTFE membrane. In this context, it has to be recalled that in healthy conditions, a physiological level of inflammation has also been shown to be present. Although the number of material-associated inflammatory cells is higher compared to the cell distribution in the surrounding connective tissue, it is questionable whether the level of expression of pro- and/or anti-inflammatory molecules is really increased in comparison to the immune cells of the healthy connective tissue. In this context, it has to be mentioned that the results of the present study can only give limited information about the degree of the inflammatory response as the immunohistochemical examination method does not allow for any assertion about the (level of) expression of the different cytokines or mediators by macrophages that are involved in the inflammatory tissue response to both analyzed biomaterials. Thus, the immunohistochemical detection method is not an analysis method that allows for the precise quantification of the severity of the foreign body reaction to the biomaterials, although it is a first indicator that allows an insight into the general tissue response to a biomaterial. This leads to the conclusion that a standardized in vitro test system including the cell types that are involved in the foreign body reaction to a biomaterial might also be necessary for analyzing biocompatibility, to prevent the rollout of inadequate biomaterials. Furthermore, specialized in vivo analysis methods, such as laser-assisted cell microdissection, which allows for the measurement of cytokine release from single cells or cell types, are important tools for biomaterial research and development [38,39].

Moreover, the time span up to day 30 post implantation might be not sufficient to make a final statement about the overall tissue reaction, which has to be regarded as a dynamic process. This means that the inflammatory cell or tissue response to the dPTFE membrane might ease after 30 days. However, the application of non-resorbable PTFE membranes is most often restricted to only 30 days after their application, which makes this investigation period justifiable [12,40].

Altogether, the results of the present study showed that the tissue response to the dPTFE membrane involves inflammatory macrophages. However, comparable cell numbers were found in the implant beds of a well-described collagen membrane, whose biocompatibility has been investigated and confirmed in different studies. Although these data indicate that the analyzed dPTFE membrane is not fully bioinert, they show that the device is biocompatible and thus may optimally support bone healing within the context of guided bone regeneration.

4. Materials and Methods

4.1. Barrier Membranes

4.1.1. dPTFE Membrane (Permamem®)

The analyzed synthetic barrier membrane (permamem®, botiss biomaterials, Zossen, Germany) is made of non-resorbable high-density polytetrafluoroethylene (dPTFE) (Figure 4A). The membrane maintains its structural integrity during implantation and acts as an efficient barrier against bacterial and cellular penetration due to its small pore size [41]. The membrane fulfills the requirements of biocompatibility according to EN ISO 10993-1 and EN ISO 7405 [41].

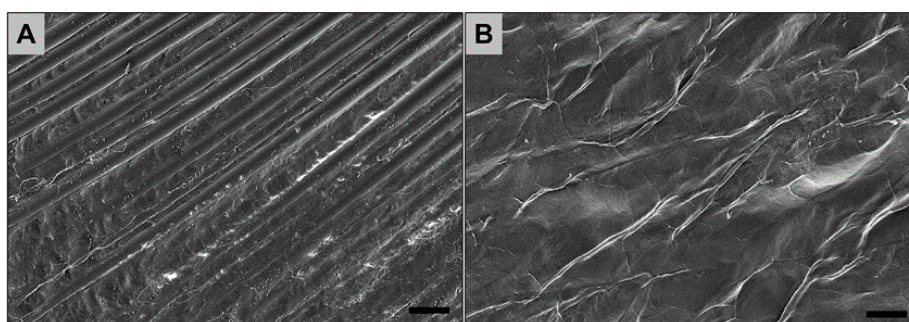


Figure 4. Exemplary scanning electron microscopy (SEM) images of the analyzed membranes.

(A) dPTFE membrane (500× magnification, scale bar = 20 μm); (B) collagen membrane (500× magnification, scale bar = 20 μm).

4.1.2. Pericardium-Based Collagen Membrane (Jason® membrane)

The collagen membrane analyzed in the present study is based on native collagen originating from porcine pericardium (Jason® membrane, botiss biomaterials, Zossen, Germany). The standardized manufacturing process includes an initial selection of the donor animals based on veterinary-controls. During the purification process, the pericardium undergoes a wet-chemical treatment, lyophilization, and sterilization by ethylene oxide gas. The collagen membrane exhibits a natural, multilayered structure with an increased content of collagen type III (Figure 4B). Also, this membrane has shown to fulfill the requirements of biocompatibility, according to EN ISO 10993-1 and EN ISO 7405 [41].

4.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The (ultra-) structure of both biomaterials imaged by scanning electron microscopy (SEM) using a XL30 CP SEM (Philips, Amsterdam, The Netherlands).

4.3. In Vivo Study Design, Subcutaneous Implantation, and Explantation Procedure

The in vivo experiments and animal housing were conducted at the Faculty of Medicine (University of Niš, Serbia). The Local Ethical Committee (Faculty of Medicine, University of Niš, Serbia) authorized the described in vivo experiments, on the basis of the Veterinary Directorate of the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of the Republic of Serbia issued the decision number 323-07-00278/2017-05/6 (Date: 13 July 2017). The animals were kept under standard conditions (water ad libitum, artificial light, and regular rat pellet) and standard pre- and postoperative care was ensured. The Local Ethical Committee (Faculty of Medicine, University of Niš, Serbia) authorized the described in vivo experiments.

In total, 20 female, 6–8 week-old BALB/c mice obtained from the Military Medical Academy (Belgrade, Serbia) were randomly allocated into two study groups. Each of the two study groups

contained 10 experimental animals and five animals were used for implantation of the respective biomaterial per time point ($n = 5$), i.e., 10 and 30 days. The implantation was conducted following the protocol described by Barbeck et al. [24–26,28,42]. In brief, the animals were anesthetized via an intraperitoneal injection (10 mL ketamine (50 mg/mL) with 1.6 mL Xylazine (2%)). After shaving and disinfection, an incision down to the subcutaneous tissue within the rostral subscapular region was made. Subsequently, a subcutaneous pocket was bluntly built by scissors, and the biomaterials were implanted into the pocket. Afterwards, the wounds were sutured.

After the respective study time points, i.e., 10 and 30 days, the animals were euthanized with an overdose of the above-mentioned anesthetics and the implantation area, together with the surrounding tissue, were explanted. Subsequently, the explanted tissue was fixed using a 4% formalin solution for 24 h, and then placed into PBS for the following histological workup process.

4.3.1. Histology and Immunohistochemistry

For the histological workup, the tissue explants were initially cut into two segments of identical dimensions and dehydrated using a series of increasing alcohol concentrations. After a xylol exposure, paraffin embedding was performed, followed by the preparation of sections with a thickness of 3–5 μm , which were prepared by means of a rotation microtome (SLEE, Mainz, Germany). Three sections of every tissue explant were used for histochemical stainings, i.e., haematoxylin and eosin (H&E), and Movat pentachrome and Alcian blue.

Furthermore, four additional sections of every tissue explants were used for the immunohistochemical detection of macrophages and their M1- and M2-subforms by means of antibodies against the pro- and anti-inflammatory molecules, i.e., hemoglobin scavenger receptor (CD163) and mannose receptor (MR, also known as CD206), based on previously published methods [28,42–44]. Briefly, the slides were initially treated with citrate buffer and proteinase K at pH8 for 20 min in a water bath at 96 °C, followed by equilibration using TBS-T buffer. Subsequently, the slides were prepared by H_2O_2 and avidin and biotin blocking solutions (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Incubated with the respective first antibody for 30 min was conducted, followed by incubation with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-B, sc-2040, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Shandon, CA, USA). Afterwards, the avidin–biotin–peroxidase complex (ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) (30 min) was applied, and counterstaining by hematoxylin and blueing was conducted.

4.3.2. Histological Analysis

The histological analyses to study the tissue–biomaterial interactions within the implantation beds of the biomaterials and their surrounding tissue were conducted using an Axio.Scope.A1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), as previously described [24–28]. These analyses focused on the evaluation of the following parameters within the framework of the early and the late tissue response related to the implants: fibrosis, hemorrhage, necrosis, vascularization, and the presence of neutrophils, lymphocytes, plasma cells, macrophages, and biomaterial-associated multinucleated giant cells (BMGCs). Finally, microphotographs were taken with an AxioCam 305 color connected to a computer system running the ZEN Core (Zeiss, Oberkochen, Germany) connected to the microscope.

4.3.3. Histomorphometrical Analysis

The histomorphometrical analyses included the comparative measurements of the occurrence of anti-inflammatory and pro-inflammatory cells within the implant beds of the membranes, as previously described [24–28]. Briefly, “total scans” were generated with the aid of a specialized scanning microscope, which consists of an Axio Scope.A1 microscope combined with a AxioCam 305 color digital camera and an automatic scanning table (Maerzhaeuser, Wetzlar, Germany) connected to a computer system running the ZEN Core software (all: Zeiss, Oberkochen, Germany) containing the complete implant area, as well as the peri-implant tissue. The slides stained by the aforementioned immunohistochemical methods were digitized. To measure the extents of the cells, the amounts of these cells were manually counted using the “count tool” of the Zen Core software, and related to the total implant area (cells/mm^2).

4.3.4. Statistical Analyses

Quantitative data were shown as mean \pm standard deviation after an analysis of variance (ANOVA), which enabled comparison of the data from the study groups via the GraphPad Prism 7.0d software (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA). Statistical differences were designated as significant if the p-values were less than 0.05 (* $p \leq 0.05$), and highly significant if the p-values were less than 0.01 (** $p \leq 0.01$) or less than 0.001 (***) $p \leq 0.001$.

Author Contributions: T.K., S.S., S.N., O.J., R.S. and M.B. conducted animal experiments. T.K. and O.J. conducted the histomorphometrical analysis. T.K., O.J., K.G. and M.B. conducted the histopathological analysis. T.K., O.J., K.G., S.S., S.W., R.S. and M.B. wrote the manuscript. R.S., S.N., S.W., R.S., M.H. and M.B. provided lab space and materials.

Funding: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: The authors want to thank Anne-Kathrin Kopp and Claudia Beutler for their great technical work, and Torsten Müller for his excellent organization support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Buser, D.; Dahlin, C.; Schenk, R.K. Guided bone regeneration in implant dentistry. In *Guided Bone Regeneration*; Chicago Quintessence: Bern, Switzerland, 1994.
2. Jung, R.E.; Fenner, N.; Hämmerle, C.H.; Zitzmann, N.U. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12–14 years. *Clin. Oral Implants Res.* **2013**, *24*, 1065–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Scantlebury, T.V. 1982–1992: A Decade of Technology Development for Guided Tissue Regeneration. *J. Periodontol.* **1993**, *64*, 1129–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hämmerle, C.H.; Karring, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology* **1998**, *17*, 151–175. [[CrossRef](#)]
5. Wessing, B.; Lettner, S.; Zechner, W. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2018**, *33*, 87–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Liu, Q.; Humpe, A.; Kletsas, D.; Warnke, F.; Becker, S.T.; Douglas, T.; Sivananthan, S.; Warnke, P.H. Proliferation assessment of primary human mesenchymal stem cells on collagen membranes for guided bone regeneration. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2001**, *26*, 1004–1010.
7. Imbrunio, A.V.; Todescan, J.H.; Carvalho, C.V.; Arana-Chavez, V.E. Healing of alveolar bone in resorbable and non-resorbable membrane-protected defects. A histologic pilot study in dogs. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4079–4086. [[CrossRef](#)]
8. Liu, J.; Kerns, D.G. Mechanisms of guided bone regeneration: A review. *Open Dent. J.* **2014**, *8*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Elgali, I.; Omar, O.; Dahlin, C.; Thomsen, P. Guided bone regeneration: Materials and biological mechanisms revisited. *Eur. J. Oral Sci.* **2017**, *125*, 315–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hoornaert, A.; d'Arros, C.; Heymann, M.-F.; Layrolle, P. Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Caballé-Serrano, J.; Munar-Frau, A.; Ortiz-Puigpelat, O.; Soto-Penaloza, D.; Peñarocha, M.; Hernández-Alfaro, F. On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J. Clin. Exp. Dent.* **2018**, *10*, e477–e483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Soldatos, N.K.; Stylianou, P.; Koidou, V.P.; Angelov, N.; Yukna, R.; Romanos, G.E. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* **2017**, *48*, 131–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Trobos, M.; Juhlin, A.; Shah, F.A.; Hoffman, M.; Sahlin, H.; Dahlin, C. In vitro evaluation of barrier function against oral bacteria of dense and expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for guided bone regeneration. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kohal, R.J.; Trejo, P.M.; Wirsching, C.; Hürzeler, M.B.; Caffesse, R.G. Comparison of bioabsorbable and bioinert membranes for guided bone regeneration around non-submerged implants: An experimental study in the mongrel dog. *Clin. Oral Implants Res.* **1999**, *10*, 226–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Anderson, J.M.; Rodriguez, A.; Chang, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* **2008**, *20*, 86–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lamichhane, S.; Anderson, J.A.; Vierhout, T.; Remund, T.; Sun, H.; Kelly, P. Polytetrafluoroethylene topographies determine the adhesion, activation, and foreign body giant cell formation of macrophages. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105*, 2441–2450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Jones, J.A.; Chang, D.T.; Meyerson, H.; Colton, E.; Kwon, I.K.; Matsuda, T.; Anderson, J.M. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *83*, 585–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Brodbeck, W.G.; Nakayama, Y.; Matsuda, E.; Colton, T.; Ziats, N.P.; Anderson, J.M. Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine* **2002**, *18*, 311–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Brown, B.N.; Valentin, J.E.; Stewart-Akers, A.M.; McCabe, G.P.; Badylak, S.F. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1482–1491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Badylak, S.F.; Valentin, J.E.; Ravindra, A.K.; McCabe, G.P.; Stewart-Akers, A.M. Macrophage Phenotype as a Determinant of Biologic Scaffold Remodeling. *Tissue Eng. A* **2008**, *14*, 1835–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rothamel, F.; Schwarz, D.; Fienitz, T.; Smeets, R.; Dreiseidler, T.; Ritter, L.; Happe, A.; Zöller, J. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: Results of in vitro and in vivo examinations. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2012**, *27*, 146–154. [[PubMed](#)]
22. Papagiannoulis, N.; Daum, O.; Tadic, D.; Steigmann, M. Vergleich von allogenem und alloplastischem Knochenregenerationsmaterial mit Pericardium Membran in der horizontalen gesteuerten Augmentation von Alveolardefekten. *Dent. Implantol.* **2012**, *16*, 360–369.
23. Rothamel, D.; Schwarz, F.; Smeets, R.; Happe, A.; Fienitz, T.; Mazor, Z.; Zöller, J. Sinus floor elevation using a sintered, natural bone mineral. A histological case report study. *Z. Zahnärztl. Implantol.* **2011**, *27*, 60–70.
24. Barbeck, M.; Dard, M.; Kokkinopoulou, M.; Markl, J.; Booms, P.; Sader, R.A.; Kirkpatrick, C.J.; Ghanaati, S. Small-sized granules of biphasic bone substitutes support fast implant bed vascularization. *Biomater* **2015**, *5*, e1056943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Barbeck, M.; Udeabor, S.E.; Lorenz, J.; Kubesch, A.; Choukroun, J.; Sader, R.A.; Kirkpatrick, C.J.; Ghanaati, S. Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss™) results in an enhanced early implantation bed vascularization. *Ann. Maxillofac. Surg.* **2014**, *4*, 150–157. [CrossRef] [PubMed]
26. Barbeck, M.; Serra, T.; Booms, P.; Stojanovic, S.; Najman, S.; Engel, E.; Sader, R.; Kirkpatrick, C.J.; Navarro, M.; Ghanaati, S. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components—Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 208–223. [CrossRef] [PubMed]
27. Tawil, G.; Barbeck, M.; Unger, R.; Tawil, P.; Witte, F. Sinus Floor Elevation Using the Lateral Approach and Window Repositioning and a Xenogeneic Bone Substitute as a Grafting Material: A. Histologic, Histomorphometric, and Radiographic Analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2018**, *33*, 1089–1096. [CrossRef] [PubMed]
28. Barbeck, M.; Unger, R.E.; Booms, P.; Dohle, E.; Sader, R.A.; Kirkpatrick, C.J.; Ghanaati, S. Monocyte preseeded leads to an increased implant bed vascularization of biphasic calcium phosphate bone substitutes via vessel maturation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 2928–2935. [CrossRef] [PubMed]
29. Uludağ H. Grand challenges in biomaterials. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
30. Ghensi, P.; Stablum, W.; Bettio, E.; Soldini, M.C.; Tripi, T.R.; Soldini, C. Management of the exposure of a densePTFE(d-PTFE)membraneinguided boneregeneration(GBR):A casereport. *Oral Implantol.* **2017**, *10*, 335–342. [CrossRef] [PubMed]
31. Hammerle, C.H.F.; Jung, R.E.; Feloutzis, A. A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *J. Clin. Periodontol.* **2002**, *29*, 226–231. [CrossRef] [PubMed]
32. Monteiro, A.-S.-F.; Macedo, L.-G.-S.; Macedo, N.-L.; Balducci, I. Polyurethane and PTFE membranes for guided bone regeneration: Histopathological and ultrastructural evaluation. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2010**, *15*, e401–e406. [CrossRef] [PubMed]
33. Carbonell, J.M.; Martín, I.S.; Santos, A.; Pujol, A.; Sanz-Moliner, J.D.; Nart, J. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: A literature review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2014**, *43*, 75–84. [CrossRef] [PubMed]
34. Sridharan, R.; Cameron, A.R.; Kelly, D.J.; Kearney, C.J.; O'Brien, F.J. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: A review and suggested design principles. *Mater. Today* **2015**, *18*, 313–325. [CrossRef]
35. Chattopadhyay, S.; Raines, R.T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* **2014**, *101*, 821–833. [CrossRef]
36. Onuki, Y.; Bhardwaj, U.; Papadimitrakopoulos, F.; Burgess, D.J. A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2008**, *2*, 1003–1015. [CrossRef] [PubMed]
37. Parenteau-Bareil, R.; Gauvin, R.; Berthod, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* **2010**, *3*, 1863–1887. [CrossRef]
38. Micke, P.; Ostman, A.; Lundeberg, J.; Ponten, F. Laser-assisted cell microdissection using the PALM system. *Meth. Mol. Biol.* **2005**, *293*, 151–166.
39. Fink, L.; Kinf, T.; Stein, M.M.; Ermert, L.; Hänze, J.; Kummer, W.; Seeger, W.; Bohle, R.M. Immunostaining and laser-assisted cell picking for mRNA analysis. *Lab. Investig.* **2000**, *80*, 327–333. [CrossRef] [PubMed]
40. Zhang, Y.; Zhang, X.; Shi, B.; Miron, R.J. Membranes for guided tissue and bone regeneration. *Ann. Oral Maxillofac. Surg.* **2013**, *1*. [CrossRef]
41. Permamem®—Botiss Dental | Botiss Biomaterials GmbH. (n.d.). Available online: <https://botiss-dental.com/products/permamem/> (accessed on 22 August 2018).
42. Barbeck, A.; Motta, M.; Migliaresi, C.; Sader, R.; Kirkpatrick, C.J.; Ghanaati, S. Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 413–418. [CrossRef] [PubMed]
43. Ghanaati, S.; Barbeck, M.; Detsch, R.; Deisinger, U.; Hilbig, U.; Rausch, V.; Sader, R.; Unger, R.E.; Ziegler, G.; Kirkpatrick, C.J. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: Histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed. Mater.* **2012**, *7*. [CrossRef]
44. Barbeck, M.; Booms, P.; Unger, R.; Hoffmann, V.; Sader, R.; Kirkpatrick, C.J.; Ghanaati, S. Multinucleated giant cells in the implant bed of bone substitutes are foreign body giant cells—New insights into the material-mediated healing process. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105*, 1105–1111. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Zusammenfassende Darstellung der Publikationspromotion

Die vorliegende Dissertation beruht auf der Publikation „*In vivo analysis of the inflammatory tissue reactions to a synthetic non-resorbable PTFE membrane by means of histopathological and histomorphometrical methods*“. Die Publikation wurde in einem international anerkannten *peer-reviewed* Journal veröffentlicht („*International Journal of Molecular Sciences*“, Einflussfaktor: 3.687 (2017)), in welchem vor allem translationale Themen mit klinischem-experimentellem Kontextbezug publiziert. Die Verweise auf englischsprachige Abbildungen (*Figures*) und Tabellen (*Tables*) beziehen sich auf die hier beigefügte englischsprachige Publikation. Gleichnamige deutsche Bezeichnungen nehmen Bezug auf die Zusammenfassung.

1. Einleitung

In verschiedenen Fachgebieten der Medizin, wie beispielsweise der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie oder Oralchirurgie, werden Knochenregenerationen bzw. -augmentationen sehr häufig durchgeführt. So muss zum Beispiel sehr häufig der knöchernen Kieferkamm sowohl im Bereich des Unter- als auch des Oberkiefers vor einer Zahnimplantatinsertion aufgrund von Knochengewebesorptionen nach Zahnverlusten wieder aufgebaut werden. Dies gilt auch im Falle von Defekten im Bereich des Kiefers, welche zum Beispiel durch Unfälle oder Tumorsektionen entstehen (Barbeck et al. 2017, Smeets et al. 2014).

Hierzu kommen je nach Indikation und verschiedenen Einflussfaktoren unterschiedliche Knochenersatzmaterialien (KEM) zum Einsatz (Buser 1994, Jung et al. 2013, Scantlebury 1993, Smeets et al. 2014). Zusätzlich kommen meist auch so genannte Barrieremembranen zum Einsatz, welche das knöchernen Defekt- bzw. Augmentationsareal vor einem verfrühten Einwachsen von Weichgewebe schützen sollen (Abb. 1). Dieser Vorgang wird insgesamt als gesteuerte Gewebe- bzw. Knochenregeneration bezeichnet, wobei zumeist der englische Fachterminus – die sogenannte *Guided Bone-/Guided Tissue Regeneration (GBR/GTR)* – genutzt wird (Hammerle et al. 1998).

Dabei lassen sich grob natürliche von synthetischen sowie resorbierbare von nicht-resorbierbaren Barrieremembranen, unterscheiden (Imbronito et al. 2002, Liu et al. 2011, Wessing et al. 2018). Weltweit wird derzeit aufgrund guter Langzeitergebnisse und der guten Biokompatibilität vor allem auf resorbierbare xenogene Membranen auf Basis von Kollagen aus verschiedenen porcinen und bovinen Ursprungsgeweben, wie z.B. dem Pericard, zurückgegriffen (Wessing et al. 2018). Vor allem die natürliche Resorbierbarkeit dieser Biomaterialklasse macht deren Einsatz so erfolgreich, da Kollagenmembranen einen zweiten operativen Eingriff, wie im Falle der nicht-resorbierbaren Membranen, überflüssig machen (Liu

et al. 2014). Nachteile sind unter anderen die schlechte Volumenstabilität sowie die zum Teil frühzeitige Resorption (Elgali et al. 2017). Barrieremembranen sind auch auf Grundlage anderer resorbierbarer Materialien wie der Polymilchsäure (*Polylactic acid*, PLA) oder Polyester aus D,L-Milchsäure und Glycolsäure (*Polylactic-co-glycolic-acid*, PLGA) erhältlich, welche allerdings sauer degradieren und so die Geweberegeneration hemmen (Hoornaert et al. 2016). Aus diesem Grund werden im Falle bestimmter Indikationen, wie beispielsweise bei mehrwandigen oder ausgedehnten vertikalen Kieferkammdefekten, immer noch nicht-resorbierbare Barrieremembranen eingesetzt, welche eine höhere Formstabilität und einen besseren Volumenerhalt aufweisen (Caballe-Serrano et al. 2018). Insbesondere Barrieremembranen auf Basis des Polytetrafluorethylen (engl. *Polytetrafluoroethylene*, PTFE) werden auf Grund ihrer guten Biokompatibilität, hervorragenden Barrierefunktion gegen Zell- und Bakterienmigration, sowie der Sicherstellung des transmembranösen Transports von Nährstoffen und Kombinierbarkeit mit strukturverstärkenden Elementen, wie z.B. Titan, bevorzugt eingesetzt (Elgali et al. 2017, Soldatos et al. 2017, Trobos et al. 2018).

Interessanterweise werden PTFE-Membranen als bioinerte Biomaterialien beschrieben (Kohal et al. 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nahezu jedes Biomaterial abhängig von dessen physikalischen und chemischen Eigenschaften eine spezifische Entzündungsreaktion hervorruft (Anderson et al. 2008). Die Schlüsselemente der entstehenden Gewebereaktion sind die Makrophagen, welche pro- und antiinflammatorische Moleküle exprimieren und daher grob auch in proinflammatorische (M1) und anti-inflammatorische (M2) Subtypen eingeteilt werden (Badylak et al. 2008, Brodbeck et al. 2002, Brown et al. 2009, Jones et al. 2007, Lamichhane et al. 2017). Es wird angenommen, dass ein erfolgreicher Einsatz von Biomaterialien von dem Vorherrschen einer M2-Gewebsantwort abhängig ist (Brown et al. 2012). Hingegen wird angenommen, dass Biomaterialien, welche eine chronisch proinflammatorische Antwort induzieren, negative regenerative Ergebnisse bedingen, welche unter anderem mit einem Gewebsumbau mit fibröser Inkapsulation des Biomaterials einhergehen können (Badylak et al. 2008, Brown et al. 2009).

Während die inflammatorischen Gewebereaktionen gegenüber anderen und vor allem gegenüber resorbierbaren Biomaterialien in den letzten Jahren eingehend untersucht wurden, existiert nur wenig Wissen bezüglich des Ausmaßes der Fremdkörperreaktion gegenüber PTFE-basierten Biomaterialien wie den Barrieremembranen (Barbeck et al. 2015b, Barbeck et al. 2015c, Rolvien et al. 2018). Daher lag das Ziel der vorliegenden Dissertation in der Analyse der inflammatorischen Gewebereaktion gegenüber einer nicht resorbierbaren PTFE-Membran nach deren Implantation für 10 und 30 Tage in das Subkutane Bindegewebe von BALB/c-Mäusen. Im Besonderen wurde hierbei auf die Hypothese der Bioinertheit der PTFE-Membran eingegangen. Als Kontrollmembran wurde eine in mehreren präklinischen und klinischen

Studien bereits untersuchte und als biokompatibles Biomaterial bewertete resorbierbare kollagenbasierte Membran eingesetzt (Badylak et al. 2008, Brown et al. 2009).

2. Material und Methoden

2.1 Biomaterialien

2.1.1 PTFE-Membran (permamem®)

Die in dieser Studie untersuchte synthetische Barrieremembran [Abb. 1] setzt sich aus sog. *high-density polytetrafluoroethylene* (PTFE) zusammen. Laut Hersteller erfüllt die Barrieremembran die Biokompatibilitätsanforderungen gemäß der EN ISO-Normen 10993 und 7405 (botiss biomaterials GmbH 2019a).

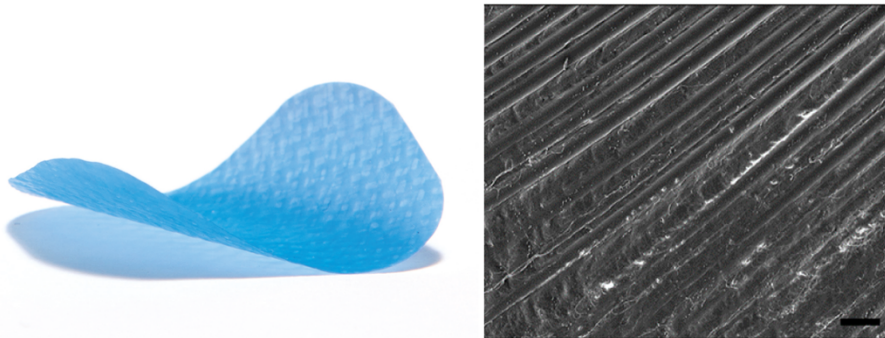


Abbildung 1: Makroskopische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung einer gebräuchlichen PTFE Membran für die GBR/GTR-Technik.

2.1.2 Kollagenmembran (Jason® membrane)

Die in dieser Studie untersuchte Perikard-basierte Kollagenmembran (Jason® membrane, botiss biomaterials, Zossen, Deutschland) weist laut Hersteller eine natürliche Multi-Schicht-Struktur auf und enthält einen hohen Anteil an Kollagen vom Typ 3 [Abb. 2]. Auch dieses Biomaterial erfüllt laut Hersteller Biokompatibilitätsanforderungen gemäß der EN ISO-Normen 10993 und 7405 (botiss biomaterials GmbH 2019b).

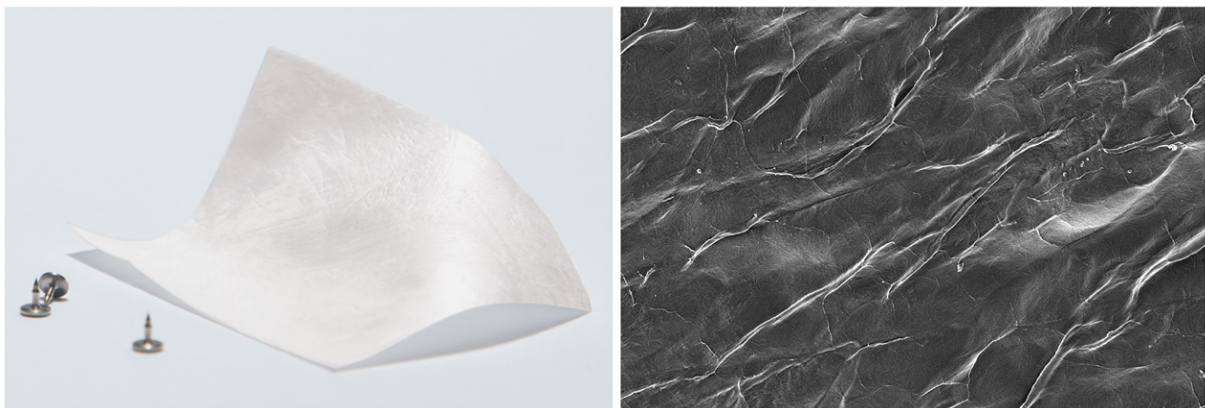


Abbildung 2: Makroskopische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung einer gebräuchlichen porcinen Membran für die GBR/GTR-Technik.

2.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die beiden Biomaterialien wurden auf ihrer physischen Materialeigenschaften mittels des Verfahrens der Rasterelektronenmikroskopie (REM) (Englisch: „*scanning electron microscope*“, SEM) untersucht. Dazu wurden Proben der beiden Biomaterialien zunächst mit einer Goldschicht (K550, Emitech, Judges Scientific plc, West Sussex, UK) überzogen, um anschließend die Aufnahmen mit Hilfe eines REM-Mikroskops (Camscan Series 2, Obducat CamScan Ltd., Cambridgeshire, UK) mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV anzufertigen. Zur Visualisierung der Proben wurde die Detektion von Rückstrahl- oder Sekundärelektronen angewandt.

2.3. Verfahren der subkutanen Implantation und Explantationsverfahren

Für die Untersuchung der Gewebereaktionen gegenüber den beiden Barrieremembranen wurden insgesamt 20 6-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse (Military Medical Academy, Belgrade, Serbia) eingesetzt, welche zufällig in zwei Studiengruppen eingeteilt wurden. Von den 10 Versuchstieren pro Studiengruppe wurden jeweils 5 Mäuse zum Zwecke der Implantation des jeweiligen Biomaterials pro Zeitpunkt (10 und 30 Tage, n = 5) eingesetzt.

Vor der Implantation der Barrieremembranen wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin (10 ml Ketamin (50 mg/ml) mit 1.6 ml 2-prozentigem Xylazin) anästhesiert. Nach Eintreten der vollen Narkosewirkung wurde die Rückenhaut der Versuchstiere rasiert und das Operationsareal mit einem Hautdesinfektionsmittel (Braun Softasept N, Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert. Anschließend wurde mit einem Skalpell ein transversal verlaufender Schnitt unterhalb der Interskapularregion gesetzt. Daraufhin wurde mittels einer Schere stumpf eine Tasche im Unterhautbindegewebe erzeugt. In diese Tasche wurden dann die Biomaterialien eingebracht und schlussendlich wurden der Implantationseinschnitt mit Hilfe eines Nahtmaterials (Prolene 6.0, Ethicon, Deutschland) vernäht.

Nach Ablauf der jeweiligen Untersuchungszeiträume wurden die Versuchstiere mittels einer intraperitoneal verabreichten Überdosis der oben erwähnten Anästhetika euthanasiert und anschließend wurde das komplette Implantationsgebiet inklusive des Biomaterial entnommen. Es folgte eine Fixierung für 24 Stunden mittels einer 4-prozentigen neutral gepufferten Formaldehydlösung, welche gefolgt war von dem Zuschnitt der Explantate in Segmente identischer Größe von circa vier Millimetern Breite. Diese Explantatsegmente wurden zum Zwecke der weiteren histologischen Aufarbeitung in Einbettkassetten (Histosette®, VWR, Deutschland) eingebracht sowie einer Dehydratation mittels einer aufsteigender Alkoholreihe (60-100%) mit anschließender Xylol-Einwirkung und einer initialen Durchdringung des Gewebes mit flüssigem Paraffin unterzogen. Das Ausblocken der Explantatsegmente in

Paraffin ermöglichte die Anfertigung eines Paraffinquaders zur weiteren Herstellung von Schnittpräparaten, wobei die Kassette als Blockunterlage diente. So konnten mittels eines Rotationsmikrotoms (RM2255, Leica, Deutschland) 2 - 4 Mikrometer dicke fortlaufende Schnitte von den Explanatsegmenten inklusive der Biomaterialien angefertigt werden, welche auf Glasobjektträger (AA00000102E, Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht wurden. Nach einem Trocknungs- und einem Entparaffinierungsschritt waren die Schnittpräparate im Folgenden Abschnitt beschriebenen histochemischen und immunhistochemischen Färbetechniken aufbereitet.

2.3.1. Histochemische und immunhistochemische Färbemethoden

Zur Beurteilung der Gewebereaktionen gegenüber den Biomaterialien wurden die folgenden histochemischen und immunhistochemischen Färbungen angewendet: Drei Schnittpräparate jedes Gewebeblocks wurden mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), der Movat Pentachrom-Färbung sowie der Alcian-Färbung angefärbt. Weiterhin wurden zwei Antikörperfärbungen zum Nachweis von pro- (Anti-CD163-Antikörper [EPR19518], abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, Verdünnung: 1:100) und anti-inflammatorischer Makrophagen (Anti-CD206-Antikörper, abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, Verdünnung: 1:50) verwendet, um deren Aufkommen innerhalb der Implantationsareale der Biomaterialien histomorphometrisch bestimmen zu können.

2.3.2. Histopathologische Analytik

Die histopathologische Analytik der Gewebereaktionen gegenüber den untersuchten Barrieremembranen wurde mit Hilfe eines Diagnostiklichtmikroskops (Axio.Scope.A, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Bei diesen qualitativen Untersuchungen standen die vergleichenden Ausprägungen der (inflammatorischen) Gewebereaktionen unter besonderer Berücksichtigung der beteiligten Zellen, der Implantatbettvaskularisierung, eventueller fibrotischer oder nekrotischer Reaktionen, sowie die zelluläre Degradation der Biomaterialien im Vordergrund. Diese Untersuchungen wurden nach bereits mehrfach publizierten Methoden durchgeführt (Barbeck et al. 2016a, Barbeck et al. 2016b, Ghanaati et al. 2012). Des Weiteren wurden histologische Aufnahmen mit Hilfe einer Digitalkamera (Axiocam 305 color, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und eines damit verbundenen Computers mit der Zeiss Zen Software (Axiocam 305 color, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) angefertigt.

2.3.3. Histomorphometrische Messung

Die histomorphometrische Messung beinhaltete die vergleichende Bestimmung des Aufkommens pro- und anti-inflammatorischer Makrophagen-Subtypen innerhalb der Implantationsareale der beiden Barrieremembranen basierend auf einer bereits mehrfach

beschriebenen Technik (Barbeck et al. 2017). Dazu wurden zunächst sog. *“total scans”*, das heißt zusammengesetzte Aufnahmen mit einer 100-fachen Vergrößerung des gesamten Implantationsareals der (Barbeck et al. 2015a, Barbeck et al. 2014, Barbeck et al. 2016b, Tawil et al. 2018) Biomaterialien, mit Hilfe eines speziellen Mikroskops (Axio.Scope.A, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verbunden mit einer Digitalkamera (Axio.cam 305 color, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einem automatischen Scanning-Tisch (Maerzhaeuser, Wetzlar, Germany) sowie einem Computer-System, welches die ZEN Core Applikation (Zeiss, Oberkochen, Germany) ausführte, angefertigt. Hierbei wurden die immungefärbten Schnittpräparate digitalisiert, um anschließend zunächst die Größe des Implantationsareals der Barrieremembranen zu bestimmen (in mm^2). Weiterhin wurde die Anzahl der angefärbten pro- und anti-inflammatorischen Zellen bestimmt, um diese auf das jeweilige Implantationsareal beziehen zu können (in Zellzahl/ mm^2). Diese Daten standen für die im Folgenden beschriebene statistische Auswertung zur Verfügung.

2.3.4. Statistische Auswertung

Die histomorphometrischen Auswertungsdaten wurden zunächst einer Varianzanalyse (ANOVA) zur Analyse unabhängiger Stichproben unterzogen, welche aufzeigte, ob es zwischen den Stichproben signifikante Unterschiede gab. Anschließend wurde ein LSD post Hoc-Test durchgeführt. Für diese Berechnungen wurde die Software GraphPad Prism 7.0d (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Die statistischen Differenzen wurden mit einem P-Wert von $p < 0,05$ (* $P < 0.05$) als signifikant und mit einem P-Wert von $p < 0,01$ (** $P < 0.01$) bzw. einem P-Wert von $p < 0,001$ (***) ($P < 0.001$) als hoch signifikant festgelegt. Abschließend wurde die Software zum Erstellen der Graphen benutzt, wobei die Daten als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der histopathologischen Auswertung

Mittels der histopathologischen Untersuchung konnte in den Implantationsarealen der PTFE-Membran eine entzündliche Gewebsreaktion in den am 10 postoperativen Tag entnommenen Proben nachgewiesen werden (Abb. 3A). Ein dünner reaktiver Zellwall, welcher sich meist aus Makrophagen und Granulozyten, sowie einzelnen anderen Zellentypen, wie z.B. Fibroblasten bestand, umrandete die eingebrachten Membranen (Abb. 3A). Des Weiteren konnten einzelne Gefäße im reaktiven Bindegewebe nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine Biomaterial-assoziierten mehrkernigen Riesenzellen (engl. *biomaterial-associated multinucleated giant cells*, BMGCs) detektiert werden. Es konnte auch kein Einwachsen vom Gewebe in die Barrieremembranen beobachtet werden.

In den Implantationsbetten der Kollagenmembran (Kontrollgruppe) konnte am 10. postoperativen Tag eine ähnliche Gewebsreaktion beobachtet werden (Abb. 3B). In dem dünnen, an das Biomaterial adhärennten reaktiven Gewebe konnten hauptsächlich Makrophagen, eosinophile Granulozyten und einzelne Fibroblasten nachgewiesen werden. Nur einzelne in das Biomaterial migrierte Zellen waren zu diesem Zeitpunkt sichtbar (Abb. 3B). Des Weiteren konnten keine Biomaterial- assoziierten Riesenzellen innerhalb der Implantationsareale der Kollagenmembranen zu diesem Zeitpunkt gesichtet werden.

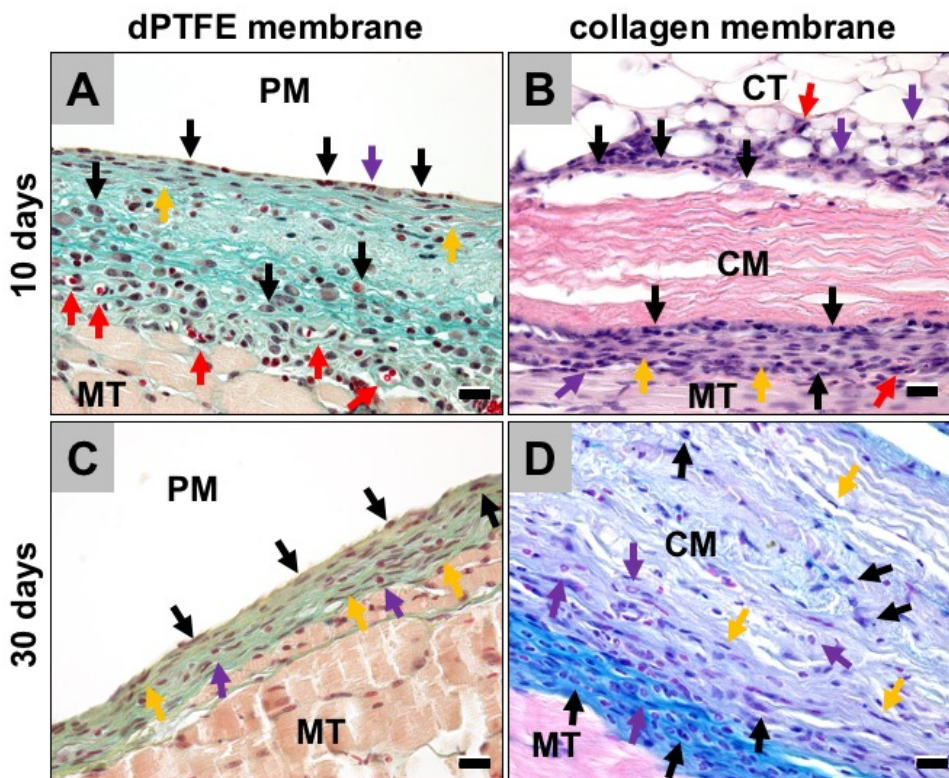


Abbildung 3. Histologische Aufnahmen des Implantationsbetts der untersuchten Membranen (A und C: PTFE Membran (PM) sowie B und D: Kollagenmembran (CM)) am Tag 10 und 30 postoperativ. Abkürzungen und Pfeile: Subkutanes Bindegewebe (CT), Muskelgewebe (MT), Makrophage (schwarzer Pfeil), Granulozyten (purpurner Pfeil), Fibroblasten (gelber Pfeil), Blutgefäße (roter Pfeil). (A und C: Movat Pentachrom-Färbung, 400-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 20µm; B: Hämatoxylin und Eosin-Färbung, 400-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 20µm; D: Alzian Blau-Färbung, 400-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 20µm).

Weiterhin zeigte die histopathologische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate, dass zu diesem Zeitpunkt innerhalb der Implantationsareale der beiden Biomaterialien die Anzahl der CD206-positiven M1-Makrophagen die Anzahl der CD163-positiven M2 Makrophagen überwog (Abb. 4A-D). Interessanterweise konnten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl der CD206- und CD163-positiven Zellen in beiden Studiengruppen zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden.

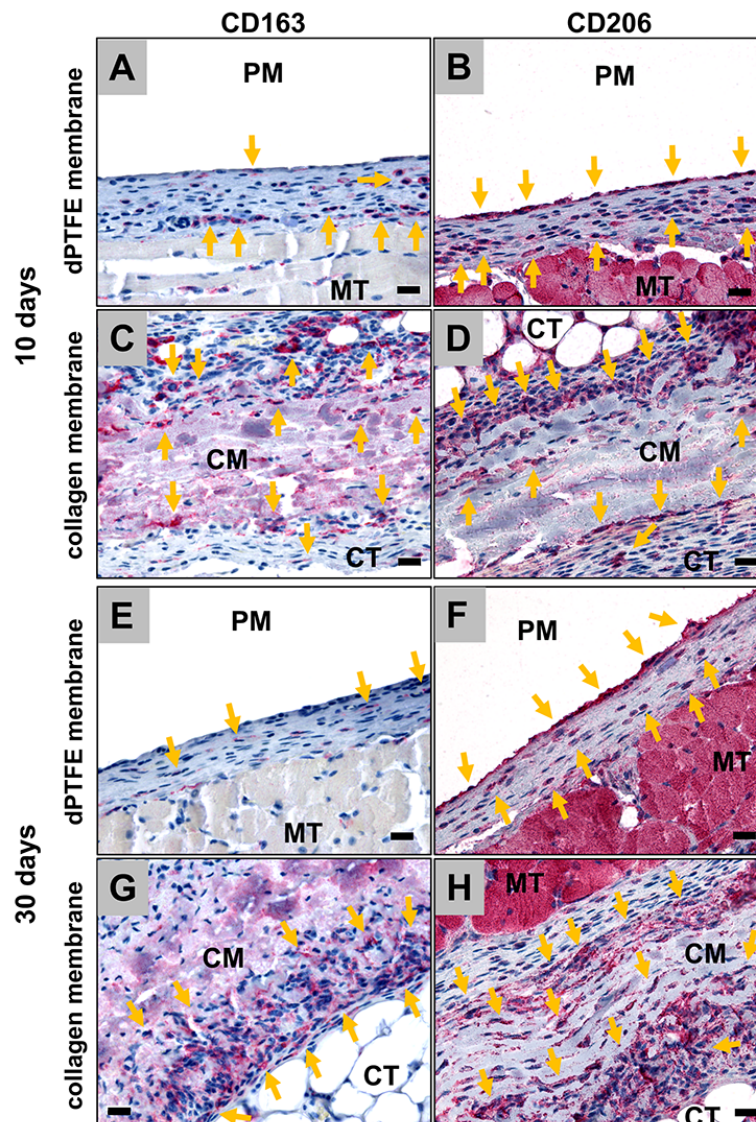


Abbildung 4. Exemplarische Bilder mit immunhistochemisch markierten M2- (CD163) und M1- (CD206)

Makrophagen (gelbe Pfeile) innerhalb der Implantationsareale der PTFE- und der Kollagenmembran am 10. (A-D) und 30. (E-H) postoperativen Tag.

In den am 30. postoperativen Tag entnommenen Proben der PTFE-Membran-Gruppe konnte eine sichtliche Verschmälerung des reaktiven Zellwalls beobachtet werden (Abb. 3C). Durch die histopathologische Untersuchung konnten zwar die gleichen Zelltypen, das heißt Makrophagen, eosinophile Granulozyten und einzelne Fibroblasten, innerhalb der Implantationsareale der nicht-resorbierbaren Membran detektiert werden, jedoch zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Makrophagen- und Granulozytenanzahlen, was im Vergleich zu den Ergebnissen am 10. postoperativen Tag einen deutlichen Rückgang der Entzündung aufzeigte. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich einzelne PTFE-Membran-adhärenente multinukleäre Riesenzellen (Abb. 3C). Es konnte jedoch keine Zelleinwanderung oder Gewebseinsprossung in die Membran beobachtet werden.

Inerhalb der Implantationsareale der Kollagenmembranen (Kontrollgruppe) konnte am 30. postoperativen Tag eine vergleichbare Gewebsreaktion wie bereits am 10. postoperativen Tag beobachtet werden (Abb. 3D). In dem dünnen, dem Biomaterial adhärenenten reaktiven Gewebe, konnten ebenfalls hauptsächlich Makrophagen, eosinophile Granulozyten und einzelne Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 3D). Innerhalb der Biomaterialkörper selbst konnten zu diesem Zeitpunkt die gleichen Zellen nachgewiesen werden, jedoch in einer viel geringeren Anzahl um Vergleich zu den Zellanzahlen innerhalb des umgebenden Bindegewebes (Abb. 3D). Des Weiteren konnte eine geringe Anzahl von multinukleären Riesenzellen weiterhin in dem das Material umgebenden Bindegewebe gesichtet werden. In keinem der Präparate konnte eine Fragmentierung des Biomaterials oder ein Einwachsen von größeren Gewebeanteilen beobachtet werden.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate am 30. postoperativen Tag zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt in den Implantationsarealen beider Biomaterialien die Anzahl der CD163-positiven M2-Makrophagen deutlich reduziert war und vergleichsweise in beiden Studiengruppen war (Abb. 4E und G). Interessanterweise konnten auch keine Unterschiede der mikroskopisch beobachteten Anzahl der CD206-positiven M1-Makrophagen zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (Abb. 4F und H). Des Weiteren schien die Anzahl der M1- und M2Makrophagen in beiden Gruppen ähnlich zu sein.

3.2. Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung der am 10. postoperativen Tag entnommenen Präparate zeigte eine vergleichbare Anzahl von CD163-positiven proinflammatorischen

Makrophagen im Implantationsbett der PTFE-Membran (1295.0 ± 529.8 Zellen/ mm^2) und der Kollagenmembran (1174.0 ± 476.9 Zellen/ mm^2) (Abb. 5). Des Weiteren konnte auch eine vergleichbare Anzahl von CD206-positiven Makrophagen innerhalb der Implantationsareale der beiden Biomaterialien (PTFE Membran: 2339.0 ± 608.6 Zellen/ mm^2 ; Kollagenmembran: 2159.0 ± 478.8 Zellen/ mm^2) nachgewiesen werden (Abb. 5). Weiterhin waren die Anzahl der M1- Makrophagen war zu diesem frühen Zeitpunkt in beiden Studiengruppen signifikant höher (* $p < 0.05$) im Vergleich zu den Anzahlen der M2-Makrophagen (Abb. 5).

In den am 30. postoperativen Tag entnommenen Präparaten konnte einerseits eine ähnliche Anzahl von M2Makrophagen innerhalb der Implantationsareale der beiden Biomaterialien detektiert werden (PTFE Membran: 968.0 ± 185.0 Zellen/ mm^2 ; Kollagenmembran: 568.2 ± 320.8 Zellen/ mm^2) detektiert werden, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den Anzahlen an dem früheren Studienzeitpunkt (Abb. 5). Weiterhin waren die Anzahlen der M1- Makrophagen zu diesem Zeitpunkt in den Implantationsarealen beider Biomaterialien ebenfalls vergleichbar (PTFE Membran: 1182.0 ± 506.7 Zellen/ mm^2 ; Kollagenmembran: 1208.0 ± 346.5 Zellen/ mm^2) ohne signifikanten Unterschied zur Anzahl der CD163-positiven Makrophagen (Abb. 5). Jedoch konnte eine signifikante Reduktion der Anzahl an M1- Makrophagen im Vergleich zu den Anzahlen am 10. postoperativen Tag beobachtet werden (** $p < 0.01$ und * $p < 0.05$) (Abb. 5).

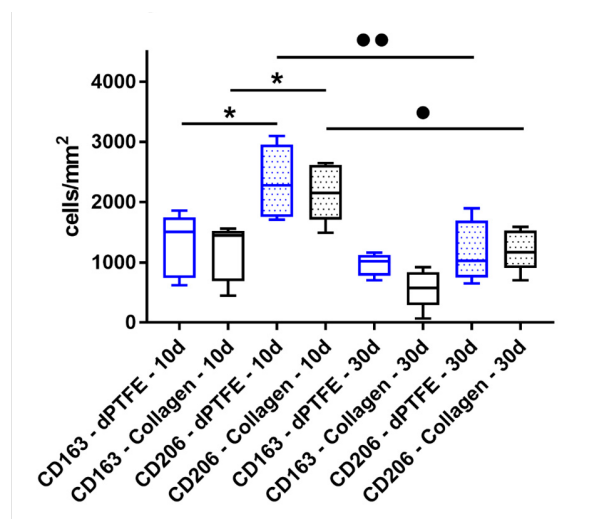


Abbildung 5. Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchung des Aufkommens von M1- und M2-Makrophagen in den Implantationsarealen der beiden Biomaterialien (*/* $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$).

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die PTFE-Membran bis zum Tag 30 eine Gewebeantwort mit Vorhandensein von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen und Granulozyten hervorrief. Darüber hinausgehend zeigte die histomorphometrische Analyse, dass am 10. postoperativen Tag in beiden Studiengruppen vergleichbare Anzahlen an CD163-positiven antiinflammatorischen als auch CD206-positiven proinflammatorischen Makrophagen detektiert wurden, wobei an diesem frühen Zeitpunkt in beiden Gruppen signifikant mehr proinflammatorische Zellen im Vergleich zu den anti-inflammatorischen Makrophagen bestimmt wurden.

Während am Tag 30 vergleichbare Anzahlen an CD163-positiven Makrophagen in beiden Studiengruppen ermittelt wurden, zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen M1-Makrophagen. So konnten an Tag 30 in beiden Gruppen vergleichbare Anzahlen an pro- als auch antiinflammatorischen Zellen detektiert werden. Interessanterweise war die Reduktion der M1-Makrophagen in der Gruppe der PTFE-Membran stärker ausgeprägt als in der Kollagenmembrangruppe.

Einerseits ist die frühe proinflammatorische Gewebsantwort am Tag 10 nicht unerwartet, da in dieser frühen Postimplantations-Phase die Gewebsreaktionen auf den Implantationseingriff selbst zurückzuführen sind. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, dass die initiale M1-Makrophagen Antwort, welche mit hoher Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen auf das Biomaterial einhergeht, einen notwendigen Prozess darstellt, wohingegen aber eine prolongierte proinflammatorische Gewebsantwort mit dem „Versagen“ eines Biomaterials in Verbindung stehen kann und als Folge einer Fremdkörperreaktion eine fibröse Einkapselung bedingen kann (Rolvien et al. 2018).

Daher ist es von entscheidender Bedeutung, dass die signifikant reduzierte proinflammatorische Gewebsantwort am Tag 30 *post implantationem* auf eine vergleichbare Anzahl der M1 und M2 Makrophagen reduziert wurde. Zudem wurde aus den gewonnenen Daten ersichtlich, dass hinsichtlich der Induktion von pro- und antiinflammatorischen Makrophagen keinerlei Unterschiede mehr zwischen der PTFE- und der Kollagenmembran am Tag 30 detektiert wurden.

Es kann also geschlossen werden, dass die dPTFE Membran eine vergleichbare entzündliche Gewebsantwort und damit ähnliche Gewebeverträglichkeit wie die Kollagenmembran, welche als biokompatibel gilt, hervorgerufen hat (Chattopadhyay et al. 2014, Onuki et al. 2008, Parenteau-Bareil et al. 2010).

Die vergleichbare Gewebeantwort auf die zwei verschiedenen Biomaterialien, das heißt die nicht-resorbierbare PTFE-Membran und die resorbierbare Kollagenmembran, kann am ehesten mit dem Degradationsmechanismus der Kollagenmembran erklärt werden, da diese

– im Falle eines physiologischen Abbaus - hauptsächlich durch Enzyme wie die Matrix-Metallproteinase (Kollagenase) degradiert werden (Parenteau-Bareil et al. 2010). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen daher, dass für die Degradation von Kollagenmembranen keine ausgeprägte entzündliche Gewebsantwort nötig ist. Weiterhin stellt sich die Frage nach dem Grad der entzündlichen Gewebsantwort im Falle der PTFE Membran, welche eigentlich als bioinertes Material gilt (Sykaras et al. 2000). Da sich die Anzahl sowohl der pro- als auch der antiinflammatorischen Makrophagen im Falle der Kollagenmembran und der PTFE-Membran nicht unterscheiden und die Biokompatibilität der Kollagenmembran bereits in früheren Untersuchungen bestätigt wurde, kann die PTFE-Membran ebenfalls als biokompatibel angesehen werden (Rothamel et al. 2012).

Jedoch zeigt das Vorhandensein von M1- und M2-Makrophagen im Implantationsbett der PTFE-Membran, dass dieses Biomaterial als nicht bioinert angesehen werden kann. Hierzu muss erwähnt werden, dass auch im gesunden Gewebe Entzündungszellen wie Makrophagen „physiologisch“ vorhanden sind (Gordon et al. 2017). Daraus leitet sich die Frage ab, ob der Grad der Expression von pro- und antiinflammatorischen Molekülen im Falle der PTFE-Membran aber auch der Kollagenmembran höher ist als durch die Immunzellen des gesunden Bindegewebes, auch wenn die Anzahl der entzündlichen Zellen im an das Implantat angrenzende Gewebe höher ist als im umgebenden Bindegewebe.. Hier sollte erwähnt werden, dass die immunhistochemische Untersuchung nur bedingt den Grad der entzündlichen Gewebsantwort wiedergeben kann, da durch diese Methodik keine Möglichkeit der Quantifizierung der Expression von Zytokinen und Entzündungsmediatoren durch die Makrophagen gegeben ist. Daher ermöglichen diese Ergebnisse eher eine grobe Orientierung als eine exakte Quantifizierung der entzündlichen Gewebsantwort. Dies impliziert die Notwendigkeit eines standardisierten *in vitro* Untersuchungssystems für Biokompatibilitätsuntersuchung unter Zuhilfenahme der Zelltypen, welche an der Fremdkörperreaktion teilnehmen. Des Weiteren sind *in vivo* Untersuchungsmethoden, wie die Laser- gestützte Mikrodissektion zur Messung der Zytokinfreisetzung von einzelnen Zellen, für Forschung und Entwicklung von Biomaterialien sehr wichtig.

Weiterhin sollte erwähnt werden, dass die Untersuchungsdauer von 30 Tagen für eine Aussage bezüglich der Gewebsantwort als nicht ausreichend angesehen werden könnte, da diese Reaktion einen dynamischen Prozess darstellt. Da aber der Einsatz der dPTFE Membranen auf 30 Tage begrenzt ist, kann der Untersuchungszeitraum als ausreichend angesehen werden.

Insgesamt kann die PTFE-Membran auf Grundlage der in der vorliegenden Dissertation erhobenen Daten als biokompatibel angesehen werden. Das Vorhandensein von Makrophagen im Implantationsbett zeigt jedoch, dass die PTFE-Membran kein bioinertes Biomaterial darstellt.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Gewebereaktion gegenüber einer nicht-resorbierbaren PTFE-Membran im Vergleich zu einer resorbierbaren Kollagenmembran *in vivo* zu untersuchen. Die Materialien wurden mit Hilfe des subkutanen Implantationsmodells in das Bindegewebe von BALB/c-Mäusen eingebracht am 10. und 30. postoperativen Tag explantiert. Die gewonnenen Proben wurden histochemisch und immunhistochemisch gefärbt. Es folgte eine histopathologische Untersuchung und histomorphometrische Messung mit einer abschließenden statistischen Auswertung.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Biomaterialien bis zum Tag 30 eine inflammatorische Gewebereaktion hervorriefen. Am 10. postoperativen Tag war die proinflammatorische Gewebeantwort in beiden Gruppen vorherrschend, was sich in signifikant höheren Anzahlen von M1-Makrophagen im Gegensatz zu M2-Makrophagen äußerte. Eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen M1-Makrophagen am Tag 30 konnte in beiden Gruppen nachgewiesen werden, während die Anzahlen der M2-Makrophagen in beiden Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau blieben. Die Anzahl der M2-Makrophagen war in beiden Gruppen gleich hoch und die Reduktion der M1-Makrophagen in der Gruppe der PTFE-Membran war signifikant höher als in der Kollagenmembrangruppe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die signifikant höhere proinflammatorische Gewebsantwort am Tag 10 auch in Falle der dPTFE Membran am Tag 30 *post implantationem* auf eine vergleichbare Anzahl der M1-Makrophagen reduziert wurde.

Da im Falle der Kollagenmembran, deren Biokompatibilität erwiesen ist, eine ähnlich hohe Zellanzahl an M1- und M2-Makrophagen wie in der Gruppe der PTFE-Membran nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die PTFE-Membran biokompatibel ist. Das Vorhandensein von Makrophagen im Implantationsbett lässt aber die Einstufung der PTFE Membran als bioinertes Biomaterial nicht zu.

Summary

The present publication aimed to compare the in vivo tissue reaction between a non-resorbable PTFE-membrane and a resorbable collagen membrane. The materials were implanted subcutaneously in BALB/c-mice and were explanted after 10 and 30 days after the operation. After material workup, all test samples were histochemically and immunohistochemically stained before histopathological, histomorphometric and statistical analysis.

Up to day 30, both materials induced an inflammatory tissue reaction. After 10 days, predominant inflammatory tissue reaction was visible in both groups with significant higher M1-macrophages compared to M2-macrophages. After 30 days, significant lower M1-macrophages could be detected in both groups, while the number M2-macrophages remained on an equivalent level. Thereby, the number of M2-macrophages were similar in both groups and the quantitative reduction of M1-macrophages were significantly higher in the PTFE-membrane group.

Summarizing, the PTFE-membrane showed a higher proinflammatory tissue reaction after 10 days, which was reduced on a similar level after 30 days to its collagen pendant.

Since the overall biocompatibility for resorbable collagen membranes could be shown in several previous studies and M1-/M2-macrophagic reaction were similar in both groups, the application of PTFE-membranes can be assumed to be biocompatible. However, the presence of macrophages within the implantation area neglects that PTFE-membranes are inert biomaterials.

Literaturverzeichnis

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 20(2):86-100.

Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, McCabe GP, Stewart-Akers AM (2008) Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng Part A.* 14(11):1835-1842.

Barbeck M, Dard M, Kokkinopoulou M, Markl J, Booms P, Sader RA, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2015a) Small-sized granules of biphasic bone substitutes support fast implant bed vascularization. *Biomater.* 5(e1056943).

Barbeck M, Motta A, Migliaresi C, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2016a) Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? *J Biomed Mater Res A.* 104(2):413-418.

Barbeck M, Najman S, Stojanovic S, Mitic Z, Zivkovic JM, Choukroun J, Kovacevic P, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2015b) Addition of blood to a phylogenetic bone substitute leads to increased in vivo vascularization. *Biomed Mater.* 10(5):055007.

Barbeck M, Serra T, Booms P, Stojanovic S, Najman S, Engel E, Sader R, Kirkpatrick CJ, Navarro M, Ghanaati S (2017) Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components - Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact Mater.* 2(4):208-223.

Barbeck M, Udeabor S, Lorenz J, Schlee M, Holthaus MG, Raetscho N, Choukroun J, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2015c) High-Temperature Sintering of Xenogenic Bone Substitutes Leads to Increased Multinucleated Giant Cell Formation: In Vivo and Preliminary Clinical Results. *J Oral Implantol.* 41(5):212-222.

Barbeck M, Udeabor SE, Lorenz J, Kubesch A, Choukroun J, Sader RA, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2014) Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss) results in an enhanced early implantation bed vascularization. *Ann Maxillofac Surg.* 4(2):150-157.

Barbeck M, Unger RE, Booms P, Dohle E, Sader RA, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S (2016b) Monocyte preseeding leads to an increased implant bed vascularization of biphasic calcium phosphate bone substitutes via vessel maturation. *J Biomed Mater Res A.* 104(12):2928-2935.

botiss biomaterials GmbH. Jason® membrane - botiss dental 2019a [Available from: <https://botiss-dental.com/de/products/jason-membrane-de/>].

botiss biomaterials GmbH. permamem® - botiss dental 2019b [Available from: <https://botiss-dental.com/de/products/permamem-2/>].

Brodbeck WG, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats NP, Anderson JM (2002) Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine.* 18(6):311-319.

Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badylak SF (2012) Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials.* 33(15):3792-3802.

Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF (2009) Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 30(8):1482-1491.

Buser D (1994) Guided Bone Regeneration. In: 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry, Second Edition. (Hrg.) Quintessence Publishing, Chicago,

Caballe-Serrano J, Munar-Frau A, Ortiz-Puigpelat O, Soto-Penaloza D, Penarrocha M, Hernandez-Alfaro F (2018) On the search of the ideal barrier membrane for guided bone regeneration. *J Clin Exp Dent*. 10(5):477-483.

Chattopadhyay S, Raines RT (2014) Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 101(8):821-833.

Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P (2017) Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 125(5):315-337.

Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, Sader R, Unger RE, Ziegler G, Kirkpatrick CJ (2012) The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater*. 7(1):015005.

Gordon S, Pluddemann A (2017) Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*. 15(1):53.

Hammerle CH, Karring T (1998) Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol 2000*. 17(151-175).

Hoornaert A, d'Arros C, Heymann MF, Layrolle P (2016) Biocompatibility, resorption and biofunctionality of a new synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Biomed Mater*. 11(4):045012.

Imbronito AV, Todescan JH, Carvalho CV, Arana-Chavez VE (2002) Healing of alveolar bone in resorbable and non-resorbable membrane-protected defects. A histologic pilot study in dogs. *Biomaterials*. 23(20):4079-4086.

Jones JA, Chang DT, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, Anderson JM (2007) Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *J Biomed Mater Res A*. 83(3):585-596.

Jung RE, Fenner N, Hammerle CH, Zitzmann NU (2013) Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Implants Res*. 24(10):1065-1073.

Kohal RJ, Trejo PM, Wirsching C, Hurzeler MB, Caffesse RG (1999) Comparison of bioabsorbable and bioinert membranes for guided bone regeneration around non-submerged implants. An experimental study in the mongrel dog. *Clin Oral Implants Res*. 10(3):226-237.

Lamichhane S, Anderson JA, Vierhout T, Remund T, Sun H, Kelly P (2017) Polytetrafluoroethylene topographies determine the adhesion, activation, and foreign body giant cell formation of macrophages. *J Biomed Mater Res A*. 105(9):2441-2450.

Liu J, Kerns DG (2014) Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J*. 8(56-65).

Liu Q, Humpe A, Kletsas D, Warnke F, Becker ST, Douglas T, Sivananthan S, Warnke PH (2011) Proliferation assessment of primary human mesenchymal stem cells on collagen membranes for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 26(5):1004-1010.

Onuki Y, Bhardwaj U, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ (2008) A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol.* 2(6):1003-1015.

Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F (2010) Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials.* 3(3):1863-1887.

Rolvien T, Barbeck M, Wenisch S, Amling M, Krause M (2018) Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *Int J Mol Sci.* 19(10):

Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreiseidler T, Ritter L, Happe A, Zoller J (2012) Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 27(1):146-154.

Scantlebury TV (1993) 1982-1992: A Decade of Technology Development for Guided Tissue Regeneration. *J Periodontol.* 64 (Suppl 11):1129-1137.

Smeets R, Hanken H, Jung O, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A, Blessmann M, Heiland M, Klok A (2014) Knochenersatzmaterialien. *Der MKG-Chirurg.* 1(7):53-67.

Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE (2017) Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* 48(2):131-147.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD (2000) Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 15(5):675-690.

Tawil G, Barbeck M, Unger R, Tawil P, Witte F (2018) Sinus Floor Elevation Using the Lateral Approach and Window Repositioning and a Xenogeneic Bone Substitute as a Grafting Material: A Histologic, Histomorphometric, and Radiographic Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 33(5):1089-1096.

Trobos M, Juhlin A, Shah FA, Hoffman M, Sahlin H, Dahlin C (2018) In vitro evaluation of barrier function against oral bacteria of dense and expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for guided bone regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 20(5):738-748.

Wessing B, Lettner S, Zechner W (2018) Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 33(1):87-100.

Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Mein Anteil an der Publikationsdissertation ergibt sich gemäß der Autorenreihenfolge der Publikation. Dabei habe ich bei der Planung und Durchführung der in vivo-Experimente maßgeblich mitgewirkt. Nach Explantation der untersuchten Materialien habe ich bei der histologischen Aufbereitung der Proben geholfen. Nach Einarbeitung habe ich die histologischen, histomorphometrischen sowie histopathologischen Analysen selbständig durchgeführt und statistisch ausgewertet. Neben der vorliegenden zusammenfassenden Dissertation habe die Publikation unter Anleitung meines Betreuers selbständig verfasst, eingereicht sowie prozessiert.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets sowie meinen Betreuern Herrn Dr. rer. nat. Mike Barbeck als auch Herrn Dr. med. Ole Jung für das Vertrauen und die Unterstützung. Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern der Firma botiss biomaterials GmbH für die Hilfe und Mitwirkung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die allumfassende Unterstützung während meines Studiums sowie meiner bisherigen beruflichen Laufbahn.

Lebenslauf

Aus Datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Publikationsverzeichnis

Tadas Korzinskas, Ole Jung, Ralf Smeets, Sanja Stojanovic, Stevo Najman, Kristina Glenske, Michael Hahn, Sabine Wenisch, Reinhard Schnettler and Mike Barbeck. „In vivo analysis of the inflammatory tissue reactions to a synthetic non-resorbable PTFE membrane by means of histopathological and histomorphometrical methods“. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2952; doi:10.3390/ijms19102952

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: