Aus der Klinik für Parodontologie und periimplantäre Erkrankungen

Direktorin Prof. Dr. N. B. Arweiler
im Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. H. Korbmacher-Steiner)
des Fachbereiches Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zur Resorption von Poly (D, L) lactid-poly Glycolid Copolymer durch parodontopathogene Bakterien – In-vitro-Untersuchung –

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Walter Wille-Kollmar
aus Innsbruck
Marburg 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am:15 Mai 2023

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner
Referentin: Frau Prof. Dr. N. B. Arweiler
1.Koreferent/in: Herr Prof. Dr. R. Frankenberger

Meinen Eltern und meiner Familie, besonders meiner Frau Ute, die nie an mir gezweifelt hat, gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite 4-5
I. ABKÜRZUGSVERZEICHNIS	6
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7-8
III. TABELLENVERZEICHNIS	9
1. Einleitung	10-11
2. Literaturübersicht	12-27
2.1 Parodontale Erkrankungen	12-16
2.2 Therapieziele	16-20
2.3 Nichtchirurgische und chirurgische Therapiemethoden	20-22
2.4 Entstehungsgeschichte der Guided Tissue Regeneration (GTR)	23-24
2.5 GTR-Membranen	25-26
2.6 Einfluss bakterieller Esterasen	26-27
3. Versuchsplanung	28-29
4. Material und Methode	30-42
4.1 Verwendete Mikroorganismen und Nährmedien	31
4.1.1 Auswahl der Bakterienstämme, Charakterisierung und Herkunft der Bakterien	30
4.1.2 Verwendete Nährmedien und Inkubationsbedingungen zur Herstellung der Bakterienkulturen	31
4.2 Nachweis der Esteraseaktivität von bestimmten Bakterienstämmen der Mundhöhle	31-35
4.2.1 Enzym-Test durch Pipettieren mit verschiedenen Farbstoffen	32-33
4.2.2 Gelelektrophorese	33-35
4.3 Versuchsmembranen	36-42
4.3.1 Industriell gefertigte Versuchsmembranen	36
4.3.2 Herstellung der 50:50 (D, L) laktid-glycolid Membran	36-37
4.3.3 Sterilisation der Versuchsmembranen und Vorbereitung für den Versuch	37
4.3.4 Inkubationsausrüstung für den Versuch	38
4.3.5 Hygieneplan für die In-vitro-Versuche	38-39
4.3.6 Kontrolle auf Verunreinigungen und Aktivität	40

4.3.7 Ablauf des Hauptversuchs: Einsetzen, Umsetzen und Entnahme der Folien 40-41
4.3.8 Auswertungsmethoden 41-42
5. Ergebnisse 43-57
5.1 Nachweis der Esteraseaktivität von Bakterienstämmen der Mundhöhle 43-47
5.1.1 Visueller Nachweis im Enzymtest durch Farbstoffe und Quantifizierung der Farbreaktion durch UV-Absorptionsmessung 43-46
5.1.2 Nachweis durch Gelelektrophorese 46-47
5.2 Degradation der Versuchsmembranen und der Vicryl®-Netze durch Hydrolyse und unter dem zusätzlichen Einfluss von Bakterien 47-52
5.2.1 Selbst hergestellte Versuchsmembranen 47-51
5.2.2 Industriell gefertigte Versuchsmembranen (Netze) 51-52
5.3 Veränderungen der Oberflächen der selbst hergestellten Versuchsfolien während der Degradation (REM-Aufnahmen) 53-57
5.3.1 Versuchsfolien neu, steril 53
5.3.2 Versuchsfolien während der Degradation 54-57
6. Diskussion und Schlussfolgerung 58-63
6.1 Methoden-Diskussion 58-61
6.2 Ergebnis-Diskussion 61-63
7. Zusammenfassung 64-65
7.1 Deutschsprachige Zusammenfassung 64
7.2 Englischsprachige Zusammenfassung 65
8. Literaturverzeichnis 66-74
9. Anhänge 75-77
9.1 Anhang A: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen
9.2 Anhang B: Geräte
10. Lebenslauf 78-79
11. Verzeichnis der akademischen Lehrenden 80
DANKSAGUNG 81

I. ABKÜRZUGSVERZEICHNIS

A 65	Actinomyces naeslundi
A 90	Actinomyces viscosus
BW	Bakterienwachstum
(D, L)	laktid-glycolid Membran
ePTFE	e-Polytetrafluorethylen
et al.	und andere
GTR	Guided Tissue Regeneration
	(übersetzt: „gesteuerte Geweberegeneration“)
N	nass
PAR	Parodontitis
PC 1000	Capnocytophaga gingivalis
T	trocken
mM	Molmassen

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1: Pathogenese der Parodontitis

Abb. 2.2: Flowchart zur chirurgischen Therapie von Resttaschen

Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Studienablaufes

Abb. 4.1: Inkubationsgefäß für die Versuchsmembranen

Abb. 4.2: Einbringen der Versuchsfolien-Membranen in die angeimpfte Nährlösung und Bebrütung der Gläser

Abb. 5.1: Visueller Esterasenachweis mit p-Nitrophenylester in einem Enzymtest (Reihe 1 bis 3 bezieht sich auf die Durchgänge 1 bis 3). Im ersten Durchgang wurden 10 Bakterienstämme untersucht, in den folgenden Durchgängen nur noch die 3 für den Hauptversuch ausgewählten. Eine negative und positive Kontrolle wurde mitgeführt.

Abb. 5.2: Visueller Esterasenachweis mit alpha-Naphthylester in einem Enzymtest

Abb. 5.3: Bestätigung der visuellen Auswertung des ersten Durchgangs aus Abb. 4.1 durch UV-Absorptionsmessung

Abb. 5.4: Bestätigung der visuellen Auswertung des zweiten Durchgangs aus Abb. 3.2. durch UV-Absorptionsmessung

Abb. 5.5: Mittelwerte der Farbintensitäten der untersuchten Proben mit Standard-abweichungen im Vergleich zur negativen und positiven Kontrolle

Abb. 5.6: Gelelektrophorese mit angefärbten Estertasebanden von A 65, A 90, PC 1000 und der Schweineleber

Abb. 5.7: Prozentuale Gewichtsabnahme der Versuchsfolien aller vier Versuchsreihen
Reihe 1 = Kontrollversuch ohne Bakterien
Reihe 2 = mit PC 1000
Reihe 3 = mit A 90
Reihe 4 = mit A 65

Abb. 5.8: Vicryl®-Netze bei der Entnahme nach drei Wochen. Von links nach rechts sind die Fälle dargestellt: ohne Bakterien, mit PC 1000, mit A 90, mit A 65.

Abb. 5.9: Vicryl®-Netz vor dem Einsetzen (klare Netzstruktur und hohe Festigkeit)

Abb. 5.10: Versuchsfolie neu, steril

Abb. 5.11a: Kontrollfolie ohne Bakterien nach 7 Tagen

Abb. 5.11b: Kontrollfolie ohne Bakterien nach 18 Tagen

Abb. 5.12: Versuchsfolie mit A 65 beimpft nach 7 Tagen

Abb. 5.13: Versuchsfolie mit A 90 beimpft nach 7 Tagen

Abb. 5.14: Versuchsfolie mit PC 1000 geimpft nach 7 Tagen. Der Pfeil deutet auf eine Lakunenbildung hin. Das untere Bild ist eine Ausschnittsvergrößerung.

Abb. 5.15: Kontrollfolie ohne Bakterienbeimpfung am Ende ihrer Einsatzzeit nach 35 Tagen mit deutlichen Zeichen der Auflösung durch Hydrolyse.

Abb. 5.16: Versuchsfolie mit PC 1000 geimpft nach 35 Tagen mit unterschiedlichen Vergrößerungen.

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4.1: Im Hauptversuch verwendete Bakterienstämme

Tab. 4.2: Nachweis der Esterase durch Pipettieren mit Farbstoffen

Tab. 4.3: Aufschluss der Bakterienpellets für den Hauptversuch

Tab. 4.4: Bestückung des Gels (12.10.95); Gel I und Gel II 8-25% nativ.
(Die Positionen 1, 4, 6 und 7 von den insgesamt acht Positionen
sind für den Versuch nicht von Bedeutung.)

Tab. 4.5: Rezeptur für das Anfärben des Gels zur Sichtbarmachung der aktiven Esterase

Tab. 4.6: Versuchsablauf

Tab. 5.1: Ergebnisse der visuellen Auswertung an den selbst hergestellten
Versuchsmembranen

Tab. 5.2: Ermittlung des prozentualen Gewichtsverlustes der Versuchsfolien

1. Einleitung

Seit den letzten 30 Jahren spielt die Erhaltung von Zähnen nach Knochenverlust immer mehr eine wichtige Rolle. Die gesteuerte Geweberegeneration (Guided Tisssue Regeneration) und die gesteuerte Knochenregeneration (Guided Bone Regeneration) ist in der heutigen chirurgischen Parodontaltherapie zur Standardtherapie geworden. Dabei wird eine Barrieremembran eingesetzt, um die langsam profilierenden regenerativen Zelltypen wie Osteoplasten und die parodontalen Zellen von den schnell profilierenden Epithel- und Bindegewebszellen zu trennen und dadurch eine vorhersehbare Regeneration des verlorengegangenen Gewebes zu schaffen.

In der Anfangszeit (die erste Generation von Membranen) wurden ausschließlich Barrieremembranen aus nicht resorbierbaren Materialien wie expandiertem Polytetraflourethylen (ePTFE) und Celluloseacetat oder Titan verwendet. Für diese Art von Membranen ist es entscheidend, dass sie einen Hohlraum schaffen, diesen abschirmt und der Technik entgegenkommt. Die entscheidenden Eigenschaften sind ihre Biokompartibilität, Gewebeintegration, Nährstofftransfer, Zellokklusivität, Raumschaffung und Erhalt sowie die Handhabung. Leider ist die geringe Biokompatibilität und Gewebeintegration der nichtresorbierbaren Membranen nachteilig. Aus diesem Grund kommt es sehr häufig zur Membranfreilegung und folglich zu einer verminderten Knochenregeneration. Darüber hinaus muss man in einer Zweitoperation die Membran wieder entfernen, was ein erneutes Trauma des Patienten bedeutet.

Seit 1982 stehen alternativ resorbierbare Membranen zu Verfügung. Die erste Verwendung einer chemisch vernetzten bovinen Kollagenmembran bei der Behandlung von Parodontaldefekten wurde 1990 von Blumenthal (Periogen, Collagen Cooperation, Palo Alto, USA) veröffentlicht.

Resorbierbare Membranen aus Polylactiden, Polyglycoliden, Copolymeren sowie chemisch vernetzte Kollagenmembranen wurden Anfang der 90iger Jahre entwickelt und klinisch erforscht.

Wegen ihrer besseren Handhabung, des einmaligen chirurgischen Eingriffs und einer besseren Biokompartibilität haben sich bis heute die resorbierbaren Membranen durchgesetzt. Doch auch bei ihrem chirurgischen Einsatz kommt es zur Exposition der Membran und somit zu einer

beschleunigten Auflösung dieser in der Mundhöhle. Dies hat natürlich Auswirkungen auf das klinische Ergebnis, abgesehen von der Entzündungsreaktion, die gleichzeitig stattfindet. Wie weit dieser Abbau von den Bakterien in der Mundhöhle, die sich im Biofilm an der expositionierten Membran anheften, beschleunigt wird, bzw. inwieweit er eine Rolle für das klinische Ergebnis spielt, sollte in vitro in der folgenden Studie mit dem resorbierbaren Membranmaterial Poly (D, L) lactid-polyglycolid Copolymer (klinische Membran Vicryl-Netze) untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Parodontale Erkrankungen

Unter Parodont wird der Zahnhalteapparat verstanden, dessen wesentliche Elemente der Kieferknochen (Alveolarknochen), das Zahnfleisch (Gingiva), die Wurzelhaut (Desmodont oder Parodontalligament) und das Wurzelzement sind. Das Parodont hat die Aufgaben, den Zahn zu ernähren, im Kieferknochen zu halten und bei Belastung abzufedern.

Die Parodontitis ist eine chronische, multifaktorielle entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die letztlich durch Attachmentverlust, also durch einen destruktiven Abbau des Zahnhalteapparates, gekennzeichnet ist. Die mannigfaltigen Wechselwirkungen zwischen Bakterien, unserem Immunsystem, genetischen Prädispositionen und verschiedenen umweltbedingten oder erworbenen Faktoren sind ursächlich für die Progression der Erkrankung (Albandar 2002).
Es herrscht Einigkeit darüber, dass Bakterien eine entscheidende, aber nicht ausreichende Voraussetzung zur Ausbildung einer Parodontitis sind (Page 1991). Zusätzlich bedarf es Risikofaktoren, welche die Entstehung einer Parodontitis begünstigen. Dazu können Stoffwechselerkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder Infektionskrankheiten, wie AIDS/HIV gehören (Genco und Löe 1993). Weitere wichtige Risikofaktoren sind Nikotinabusus, Adipositas, Osteoporose und Stress (Albanda 2002; Al-Shammari et al. 2005; Boyapati und Wang 2007; Genco 1996; Ogawa et al. 2002). Die Parodontitis ist eine Entzündungserkrankung als Folge einer opportunistischen Infektion, die je nach Aggressivität der Pathogene und individuellen Fähigkeiten der Immunabwehr eine direkte Gewebsschädigung induziert oder aber durch eine überschießende Immunantwort eine autodestruktive Entzündungsreaktion stimuliert (Genco 1992; Page und Kornman 1997).
Aktuellere Studien, die sich mit der ätiologischen Betrachtungsweise beschäftigen, richten ihr Augenmerk vermehrt auf die Genetik sowie die Immunologie der Parodontitis.
Der Fokus liegt auf molekularer Ebene der lokalen und systemischen Abwehrmechanismen (Meyle und Chapple 2015). Es wurde nachgewiesen, dass Bakterienprodukte die Zellen der angeborenen Immunabwehr zu einer unspezifischen Immunantwort provozieren können, was die These belegt, dass die Pathogenese der Parodontitis eine Abfolge einer angeborenen entzündlichen Antwort und einer folgenden spezifischen, erworbenen Immunantwort ist (Takashiba et al. 1999).

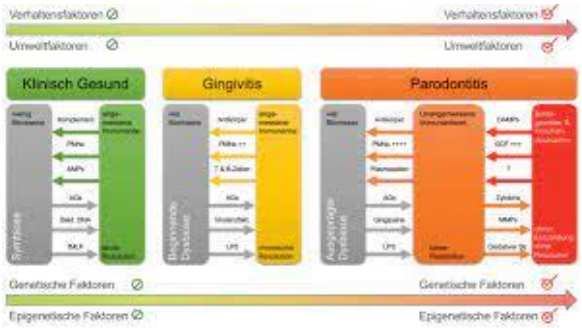


Abb. 2.1: Pathogenese der Parodontitis (modifiziert nach Meyle und Chapple 2015) (aus: Kanev 2019, S. 14)

Die parodontalen Erkrankungen gehören zu den häufigsten Zivilisationskrankheiten. In einer Querschnittsstudie des Instituts der Deutschen Zahnärzte (IDZ)/Köln, die 1997 aus bevölkerungsrepräsentativen Zufallsstichproben verschiedener Altersgruppen erhoben wurde, wurde bei 14,1% der Erwachsenen und bei 24,4% der Senioren eine schwere Form der Parodontitis festgestellt (DMS III, 1999). Parodontitis ist eine Erkrankung, die nicht ausschließlich den Zahnhalteapparat schädigt. In der Studie wird unter anderem festgestellt, dass „der Bezug zu koronaren Herzerkrankungen…sehr deutlich war“. In der Kurzfassung der Vierten Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV, 2006) wird von einer deutlichen Zunahme von Parodontalerkrankungen seit der letzten Erhebung 1997 berichtet. Danach leiden heute unter den Erwachsenen 52,7% unter mittelschweren und 20,5% unter schweren Formen der Parodontitis. Bei den Senioren sind 48% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Erkrankung betroffen.

Beim Vergleich älterer Untersuchungen verschiedener Institutionen muss berücksichtigt werden, dass es bis vor wenigen Jahren keine einheitliche, international anerkannte Definition der parodontalen Erkrankungen gab. Deshalb hat der „International Workshop for Classification of Periodontal Diseases“ – eine internationale wissenschaftliche Gruppe von Parodontologen – sich 1999 auf eine neue Einteilung der vielfältigen Formen von Zahnfleischerkrankungen weltweit verständigt. Diese Klassifikation mit acht Kategorien (Kleber 2001) wurde Anfang 2001 von Seiten der deutschen Hochschullehrer übernommen. Die acht Hauptpunkte dieser Einteilung, die jeweils in viele Unterkategorien gegliedert sind, lauten:

- Gingivale Erkrankungen
- Chronische Parodontitis
- Aggressive Parodontitis
- Parodontitis als Symptom einer systematischen Erkrankung
- Nekrotisierende parodontale Erkrankungen
- Abszess des Parodontiums
- Kombinierte parodontale endodontale Läsionen
- Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Bei den gingivalen Erkrankungen (I) wird unterschieden zwischen Plaque induzierten Erkrankungen ohne Stützgewebeverlust oder mit Stützgewebeverlust ohne Progression und solchen, die nicht durch Plaque induziert sind. Chronische Parodontitis (II) zeichnet sich aus durch vorwiegend langsame Progression, wobei allerdings Aktivitätsschübe vorkommen können. Bei der aggressiven Parodontitis (III) ist der Patient sonst klinisch gesund, zeigt aber eine rasch fortschreitende Gewebsdestruktion.

Die derzeit aktuelle Klassifikation der Parodontopatienten ist das Resultat eines langen Nomenklaturstreits, der darauf zurückzuführen ist, dass das Verständnis der Parodontitis im letzten Jahrhundert – und im Grunde auch noch bis heute – ständigen neuen, wissenschaftlichen Erkenntnissen unterliegt und damit einem steten Wandel unterzogen ist.

Der Wissenszuwachs der letzten Jahrzehnte und das verbesserte Verständnis der Paradontitis führten schließlich zu einer neuen Klassifikation, welche kürzlich publiziert wurde.
Die Klassifikation von parodontalen und periimplantären Erkrankungen und Zuständen definiert die parodontale Diagnose.
Dieses komplett neue Konzept der Einteilung der parodontalen Erkrankung wurde auf dem World Workshop im Jahr 2017 verabschiedet (Caton et al., 2018; Chapple et al., 2018; Jepsen et al., 2018; Papapanou et al., 2018).

Der Klassifikation folgend ergeben sich die Falldefinitionen (anlehnend an Deutsche Gesellschaft Parodontologie e.V. (2021) : Die Behandlung von Parodontitis Stadium I-III. Die deutsche Implementierung der S3-Leitlinie „Treatment of Stage I-III Periodontitis“der European Federation of Periodontology (EFP). European Federation of Periodontology (EFP)):

- Definition der Parodontalen Gesundheit: Fehlen einer klinisch messbaren Entzündung (BOP [Bluten auf Sondieren] bei weniger als 10% der Messstellen) bei gleichzeitigen Fehlen von Knochen- und Attachmentverlust durch eine vorangegangene Parodontitis
- Definition der Gingivitis: Eine gingivale Entzündung liegt vor. Der BOP an ≥ 10 % der Messstellen bei gesunden Parodont (kein Attachment- und Knochenverlust durch eine vorangegangene Parodontitis). Man spricht von einer lokalisierten Gingivitis, wenn BOP an 10 % bis 30 % der Messtellen vorliegt. Eine generalisierte Gingivitis liegt vor, wenn BOP an > 30 % der gemessenen Stellen entspricht.
- Definition der Parodontitis: Verlust der parodontalen Gewebe. Dies wird durch den radiologischen Knochenabbau oder klinisch beim Sondieren durch den approximalen Verlust an klinischen Attachementlevel (CAL) bestimmt. Zusätzlich gibt es weitere wichtige parodontale Befunde: die Anzahl der Zähne mit Knochentaschen, die Anzahl der Zähne mit Furkationsbefall Grad II und Grad III, die Anzahl der Zähne, die aufgrund von Parodontitis verloren gegangen sind und letztlich Anzahl und Anteil von Zähnen mit Sondierungstiefen ab einem bestimmten Schwellenwert (meist > 4 mm mit BOP und ≥ 6 mm).

  Jeder Fall einer Parodontitis sollte durch Staging und Grading der Erkrankung genau individuell bestimmt werden. Unter Staging versteht man das Stadium bzw. Ausdehnung der parodontalen Erkrankung (vierstufige Einteilung), während Grading die Grade bzw. das tatsächliche oder erwartete Fortschreiten (Progredienz: Grad A-niedriges Progressionsrisiko bis Grad C-hohes Progressionsrisiko) bestimmt. Vereinfacht ist das Staging (abhängig vom Schweregrad/Komplexität der Erkrankung) die Grundlage für den spezifischen Behandlungsplan. Dabei ist entscheidend, dass die wissenschaftliche Evidenz für unterschiedliche therapeutische Interventionen berüchsichtig warden. Die Risikofaktoren und die Progressionsrate individuell dem Patienten zugeordenet, werden durch das Grading erfasst und geben zusätzliche Informationen zur Bewertung des Falles. Diese ist daher die Grundlage für individuelle Strukturierung der Betreuung (Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Es gibt keine Unterschiede zwischen „chronischer“ und „aggressiver“ Parodontitis. Wissenschaftlich gibt es keinen Hinweis das es sich dabei tatsächlich um unterschiedliche Erkrankungen handelt.

Zukunft orientiert ist die sowohl für ein normales als auch ein reduziertes Parodontium eingeführte Definition für parodontale Gesundheit. Es wurde darüberhinaus eine Klassifikation für peri-implantäre Gesundheit und Erkrankung geschaffen. Eine eigene Klassifikation für die mukogingivalen Defekte beziehungsweise Rezessionen rundet alles ab.
Der stabiler Parodontitispatient ist nach erfolgreicher Therapie klar charakterisiert durch gingivale Gesundheit bei reduziertem Parodont (BOP < 10 % der Messtellen, flache Sondierungstiefen ≤ 4 mm und keine Stellen mit Sondierungstiefen von 4 mm und BOP).
Auch ein stabiler Parodontitispatient hat ein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten der Erkrankung. Daran kann eine Klassifikation und Diagnostik nichts ändern. Bei Entzündung der Gingiva müssen geeignete Maßnahmen zur Kontrolle ergriffen werden. Ein Rezidiv der Erkrankung ist auf jeden Fall entgegenzutreten.

2.2 Therapieziele

Mit der deutschen Implementierung der S3-Leitlinie „Treatment of Stage I-III Periodontitis“ der European Federation of Periodontology (EFP) hat die Fachgesellschaft DG Paro (Deutsche Gesellschaft Parodontologie e.V.) im Dezember 2021 die neuen Behandlungsrichtlinien „Die Behandlung von Parodontitis Stadium I-III“ an ihre Mitglieder weitergegeben, um eine Umsetzung in die Praxis zu erstreben.
Die Behandlungsrichtlinien regeln die formale Ebene der PAR-Therapie (Parodontitistherapie). Inhaltliche Hilfestellung leistet die S3-Leitlinie der EFP zur Behandlung von Parodontitis Stadium I-III.

Nach Gillmann (1961) kann eine Wundheilung auf zwei verschiedene Arten erreicht werden: durch Reparation und durch Regeneration. Eine Reparation liegt vor, wenn Gewebe neu gebildet wird, das in Struktur und Funktion dem ursprünglichen nicht gleichkommt. Bei einer Regeneration wird verlorengegangenes Gewebe in seiner Struktur und Funktion wiederhergestellt.

Das niedrigste Therapieziel beim Vorliegen einer Parodontitis ist die Eliminierung bzw. Minimierung klinisch erkennbarer entzündlicher Prozesse (Blutung). Durch die Abheilung der Entzündung kommt es zu einer Schrumpfung der parodontalen Gewebe, aber zu keiner Geweberegeneration. Die Heilung ist ein Teilerfolg, aber wegen der bleibenden Taschen besteht die Gefahr einer Reinfektion.

Das nächste Therapieziel ist das Aufhalten des Attachmentverlusts auf dem bestehenden Niveau. Es kommt zu einer Heilung mit langem Saumepithel. Das Ergebnis ist eine etwas verringerte Sondierungstiefe bei unverändertem Attachment. Dabei besteht weiterhin die Gefahr eines Wiederaufflammens des Infekts.

Das dritte Therapieziel kann mit den Begriffen „Reattachment“ und „New Attachment“ beschrieben werden. Reattachment bedeutet das Wiederanheften desmodontaler Strukturen von teilweise zerstörtem, aber noch nicht infiziertem Gewebe. New Attachment bedeutet die echte Neubildung parodontaler Strukturen auf einer vorher bearbeiteten Wurzeloberfläche (Nyman et al. 1982 und Isidor et al. 1985). Ein New Attachment kann mit der Methode der Guided Tissue Regeneration (GTR; übersetzt „gesteuerte Geweberegeneration“) erreicht werden.

Eine vollständige Wiederherstellung des Parodonts (restitutio ad integrum) umfasst neben der Gingiva den Zement, die Wurzelhaut und den Kieferknochen. Dabei würde es sich um eine echte Regeneration und nicht wie in den zuvor beschriebenen Fällen meist um eine Reparatur handeln. Dieses Fernziel zu erreichen wird mit dem sog. „Tissue Engineering“ angestrebt (Lynch et al. 1999). Dabei sollen Signalmoleküle (Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren) eine Matrixbildung und Gewebsneubildung ermöglichen.

Das Ziel einer Parodontitisbehandlung wird aus gegenwärtiger Sicht mittels des Therapieablaufs der Parodontitis der Stadien I, II und III definiert und eindeutig abgegrenzt. Nach der Festlegung des klinischen Behandlungspfades **(Tonetti & Sanz, 2019)** hinsichtlich der Diagnose von Parodontitis der folgenden vier aufeinanderliegenden Stufen:

1. Erkennen eines Patienten mit Verdacht auf Parodontitis,
2. Verifizierung der Verdachtsdiagnose
3. Staging des Parodontitisfalls,
4. Grading des Parodontitisfalls

und nachdem im Zuge der Differenzialdiagnose eine Abgrenzung dieser von anderen Erkrankungen erfolgt ist, wird ein Therapiekonzept durchgeführt, das stufenweise abläuft und aufeinander aufbaut. Die folgende nicht vollständige Liste führt die abgegrenzten Erkrankungen auf:

- Zahnhalskaries (Jepsen et al., 2018)

- Zementablösungen (Jepsen et al., 2018)
- vertikale Wurzelfraktur (Jepsen et al., 2018)
- externe Wurzelresorptionen (Jepsen et al., 2018)
- Tumoren oder andere systemische Erkrankungen, welche das Parodont betreffen können (Jepsen et al., 2018)
- endodontal-parodontale Läsionen (Herrera et al., 2018)
- Gingivitis (Chapple et al., 2018)
- parodontale Abszesse (Herrera et al., 2018)
- nekrotisierende Parodontalerkrankungen (Herrera et al., 2018)
- traumatisch induzierte lokale Rezession (Jepsen et al., 2018) traumatisch induzierte lokale Rezession (Jepsen et al., 2018)

Die Therapiestufen hängen vom Schweregrad ab, wobei jedes Stadium unterschiedlicher Interventionen bedarf.

Das Ziel der ersten Therapiestufe liegt darin, das Verhalten des Patienten dadurch zu verändern, dass er zu der Umsetzung von Maßnahmen zur Entfernung des supragingivalen Biofilms und der Kontrolle von Risikofaktoren angeregt wird. Die Maßnahmen sind:

- Kontrolle des supragingivalen Biofilms
- Maßnahmen zur Verbesserung der Effektivität der Mundhygiene
- unterstützende Therapien bei gingivaler Entzündung
- fachmännische mechanische Plaquereduktion
- Kontrolle der Risikofaktoren, zusätzlich Maßnahmen zur Änderung des Gesundheitsverhaltens des Patienten

Diese erste Stufe der Therapie sollte stadiumunabhängig bei allen Parodontitispatienten durchgeführt und das Ergebnis der Behandlung regelmäßig reevaluiert werden.
Die Ziele der ersten Therapiestufe:

- Kontinuierlicher Aufbau der Adhärenz und Motivation des Patienten bzw. Sondierung der Alternativen, mit deren Hilfe Barrieren abgebaut werden können.
- Verbesserung der Kompetenz des dentalen Biofilms, und sofern nötig, modifizierende Einwirkung

- Ermöglichung einer angemessenen Reaktion für die folgenden Therapiestufen

Bei der zweiten Therapiestufe (ursachenbezogene Therapie) geht es darum, den subgingivalen Biofilm und den Zahnstein (subgingivale Instrumentierung) zu kontrollieren (Reduktion/ Elimination). Darüber hinaus können die folgenden Interventionen erforderlich sein:

- systemisch wirksamer Antibiotika
- unterstützende Anwendung physikalischer oder chemischer Mittel,
- immunomodulatorischer Mittel,
- in die Parodontaltasche eingebrachte lokale Antibiotika,

Auch für die zweite Stufe der Therapie gilt, dass sie unabhängig vom Stadium der Erkrankung bei sämtlichen Parodontitispatienten erfolgen sollte, allerdings lediglich an Zähnen, die einen Verlust von parodontalem Stützgewebe aufweisen und/oder parodontale Taschen ausgebildet haben. Das Ziel ist die Ausheilung des parodontalen Gewebes. Es gilt, die Reaktion auf die zweite Therapiestufe zu bewerten, erst dann kann nötigenfalls eine dritte Therapiestufe durchgeführt werden; eine parodontale Reevaluation sollte erfolgen.

Nach einer erfolgreichen zweiten Therapiephase mit Erreichen aller Therapieziele, ist es wichtig den Patienten in einer unterstützenden Parodontaltherapie (UPT) weiter zu betreuen.

Eine dritte Therapiestufe wird erst dann in Erwägung gezogen, wenn die zweite Therapie nicht erfolgreich war (keine parodontalen Taschen > 4 mm mit BOP oder keine tiefen parodontalen Taschen ≥ 6 mm) Diese beschränkt sich auf die Behandlung der Bereiche der Dentition, welche nicht wie geplant auf die zweite Therapiestufe reagiert haben (Taschentiefe > 4 mm mit BOP oder tiefe parodontale Taschen ≥ 6 mm**).** Dabei muss das Ziel sein, den Zugang für die subgingivale Instrumentierung zu verbessern oder die Läsionen, die zur Schwere der Parodontitis und Parodontalbehandlung beitragen (Knochentaschen und Furkationsbefall), regenerativ und resektiv zu therapieren.

Die Maßnahmen sind folgende:

- wiederholte subgingivale Instrumentierung mit/ohne zusätzliche Therapien
- Parodontalchirurgie: Zugangslappen
- resektive Parodontalchirurgie,

- regenerative Parodontalchirurgie.

Im Fokus der dritten Therapiestufe steht die Indikation für ein chirurgisches Vorgehen. Bei Parodontitis Stadium III können die Ziele der Therapie möglicherweise nicht bei sämtlichen Zähnen erreicht werden. Das Ziel der unterstützenden Parodontaltherapie nach den drei Therapiestufen (UPT) ist die Aufrechterhaltung der parodontalen Stabilität bei sämtlichen Parodontitispatienten.

2.3 Nichtchirurgische und chirurgische Therapiemethoden

Heute ist es klar geregelt, wann wir nichtchirurgische und chirurgische Therapiemethoden einsetzen. Die Regelung erfolgt im Therapieablauf einer Parodontitis der Stadien I, II und III. In der ersten und zweiten Therapiestufe kommen nur nichtchirurgische Therapiemethoden zur Auswahl. Erst in der dritten Therapiestufe werden chirurgische Therapiemethoden eingesetzt. Die Wahl der Therapiemethode hängt davon ab, ob die Ziele der Therapiestufen (1. Therapiestufe, 2. Therapiestufe) erreicht wurden oder auch nicht.
Natürlich spielt die der Schwere und Ausdehnung der Erkrankung eine Rolle. Es wird Wert gelegt auf minimal-invasive Methoden, d.h. auf eine größtmögliche Schonung nicht erkrankter Gebiete. Ein solches Vorgehen führt in der Regel zu einer erhöhten Compliance des Patienten für den Eingriff und sollte natürlich vor einem chirurgischen Geschehen abgeklärt werden.

Häufig angewandte nichtchirurgische Behandlungsmethoden sind das subgingivale Scaling (geschlossene Wurzelreinigung) und die gingivale Kürettage. Bei seichten Taschen genügt das subgingivale Scaling, bei sehr tiefen oder ungünstig gelegenen Taschen ist das Arbeiten ohne Sicht problematisch. Dann wird eine offene Wurzelreinigung chirurgisch durchgeführt, z.B. mit der sog. modifizierten Widman-Operation (access flap). Dabei wird ein direkter Zugang zu den paradontitisch befallenen Wurzeloberflächen gebildet. Nach dem eigentlichen Eingriff wird der Lappen wieder in seiner ursprünglichen Position vernäht. Man unterscheidet zwischen Mukoperiostlappen, welche mit dem darunterliegenden Periost (Knochenhaut) fest verbunden sind und sog. „Spaltlappen“, bei denen nur die Schleimhaut – nach trennender Präparation vom Periost – mobilisiert wird.
Bei der gingivalen Kürettage wird das Taschenepithel und das eventuell infizierte Bindegewebe ausgeschält. Diese Maßnahme ist keine alleinige Parodontitistherapie, sondern wird im Zusammenhang mit einer geschlossenen oder offenen Wurzelbehandlung durchgeführt.

Wegen der Vielzahl spezieller Anforderungen gibt es eine Vielzahl chirurgischer Spezialmethoden bis hin zu rein ästhetischen Eingriffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die sog**.** regenerative Parodontalchirurgie von Bedeutung. Sie dient der (teilweisen) Wiederherstellung des Aufbaus und der Funktion des Zahnhalteapparates durch chirurgisches Einbringen von Knochenersatzmaterialien und/oder der gesteuerten Geweberegeneration (GTR) mittels Membranen zur Beseitigung von tiefen Zahnfleisch- und Knochentaschen. (Siehe Kap. 1.2 „New Attachment“).

Gaßmann et al. (2004) haben in einer klinisch kontrollierten 5-Jahres-Split-mouth-Fallstudie allerdings gezeigt, dass für die parodontale Regeneration der chirurgische Eingriff allein nicht ausreicht. Regelmäßige Nachuntersuchungen und eine gewissenhafte Zahnpflege sind für einen dauerhaften Heilungserfolg unerlässlich.

„Dieses Flowchart wurde eigens für dieses Dokument von der DG PARO als adaptiert Version der Originalpublikation (Sanz et al 2020) erstellt und ist nicht Teil der offiziellen Leitlinienversion der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF).“Erläuterung zu Begriffen und grafischen Elementen: ***Versorgungslevel*** steht für das *Angebot zur bestmöglichen Versorgung* von Patienten Darunter versteht man, dass ein minimales Versorgungsangebot im Sinne einer nicht-chirurgischen Parodontitistherapie unterbreitet werden sollte. Gegebenen Falles könnte eine Zuweisung an spezialisierte Kollegen zur weiterführenden chirurgischen Therapie nötig werden. Die ***gestrichelte Linie mit einem Pfeil*** zeigt *optionale Entscheidungsmöglichkeiten* auf. Die ***durchgezogene Linie mit einem Pfeil*** zeigt den *nächsten Schritt zur Therapieempfehlung* an. Die ***durchgezogene Linie mit zwei Pfeilen***, zeigt *miteinander verbundene Maßnahmen* an.

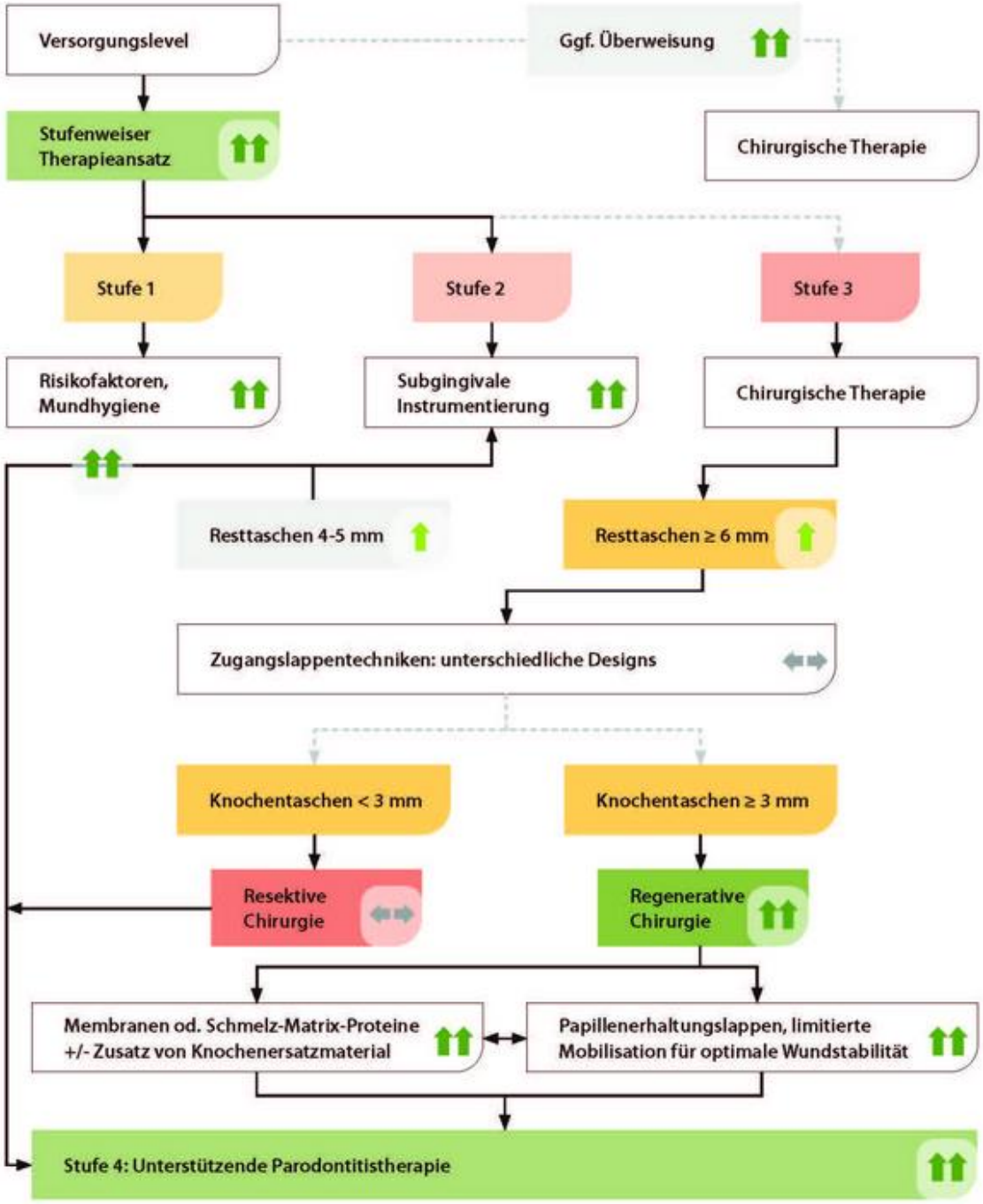


Abb. 2.2: Flowchart zur chirurgischen Therapie von Resttaschen

(aus: Deutsche Gesellschaft für Paradontologie e.V. 2021, S. 92)

2.4 Entstehungsgeschichte der Guided Tissue Regeneration (GTR)

Bis Ende der 70er-Jahre wurde das Ziel einer Restitution des parodontalen Stützgewebes durch subgingivale Kürettage und Lappenoperationen versucht. Auch in Kombination mit Knochenersatzmaterialien wurden diese Verfahren angewandt. Patur und Glickmann (1962) beschrieben eine röntgenographische Methode zur Evaluation der Ergebnisse solcher Parodontalbehandlungen. Außerdem spielten bei dem Vergleich der Befunde vor und nach der Behandlung klinische Parameter wie Sondierungstiefe und Attachmentlevel eine wichtige Rolle (Wade 1966, Ellegaard und Löe 1971, Hiatt et al. 1978). Rosling et al. (1976) haben in einer Zweijahresstudie mit 24 Patienten den Effekt einer systematischen Plaque-Kontrolle auf die Knochenregeneration im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit nur einmal jährlich durchgeführter Prophylaxe ausgewertet. Die positiven Befunde dieser frühen Studien (Elimination der Taschen und Entzündung, Knochenneubildung und damit verbundener Rückgang der Zahnlockerung) wurden in der Folge kritisch hinterfragt und zum Teil relativiert. Listgarten (1980) hinterfragte die Zuverlässigkeit der Methoden, mit denen klinisch die Sondierungstiefe gemessen wurde. Er fand bei zunehmendem Grad einer vorliegenden Entzündung einen deutlichen Anstieg von Fehlmessungen und vermutete, dass verringerte Messwerte beim Sondieren der Sulci oder Taschen, die nach einer durchgeführten Parodontalbehandlung gefunden wurden, häufig auf eine verringerte Penetrationsbereitschaft der ausgeheilten gingivalen Gewebe hindeuten und nicht das Ergebnis eines „New Attachment“ waren. Canton et al. (1980) untersuchten an Rhesusaffen vier parodontale, regenerative Behandlungsmethoden (modifizierte Lappenoperationen nach Wittman mit und ohne Knochentransplantation, sowie mit der Implantation von Beta Trikalziumphosphat und außerdem den Fall einer wiederholten Wurzelglättung und Weichgewebskürettage) auf die Möglichkeit einer Regeneration des bindegeweblichen Attachments. Sie fanden, dass „die Heilung nach den verschiedenen regenerativen Behandlungsmethoden eine Neuformation des Epithels als neues Saumepithel erreichte. Es kam jedoch zu keinem neuen bindegeweblichen Attachment.“ In einem weiteren Versuch mit Rhesusaffen (Canton et al. 1980) konnte bei angulären Knochendefekten bis zu einem gewissen Grad eine Knochenauffüllung beobachtet werden (bone fill). Auch dabei kam es in keinem Fall zur Bildung bindegeweblichen Attachments.

Wiederum in einem Tierversuch konnten Nyman et al. (1982a) den Beweis erbringen, dass die Bildung von neuem Zement und einem funktionellen Faserapparat doch möglich ist. Das

Prinzip dieses Versuchs wurde noch im selben Jahr auf den Menschen übertragen (Nyman et al. 1982b). Es führte erstmals zu einer Attachmentneubildung nach chirurgischer Behandlung parodontaler Erkrankung beim Menschen. Bei einem Unterkieferfrontzahn, bei dem bereits längere Zeit eine fortgeschrittene Parodontalerkrankung existierte, erfolgte eine Behandlung mit einer neuartigen chirurgischen Technik. Diese verhinderte, dass es im Heilungsprozess zu einer Berührung des dentogingivalen Epithels und des gingivalen Bindegewebes mit der kürettierten Wurzeloberfläche kam. Erreicht wurde dies mittels eines angepassten Millipore®-Filters, der nach sogfältigem Scaling für die Abdeckung und das Verschließen der Wurzeloberfläche sorgte. Nachdem der Zahn histologisch analysiert wurde, konnte festgestellt werden, dass sich neuer Zement mit inserierenden Fasern an der zuvor erkrankten Oberfläche angelegt hatte.

Damit war gezeigt, dass eine Attachmentneubildung auch auf einer schon einmal paradontitisch infizierten Wurzeloberfläche möglich ist. In einem weiteren Tierversuch (Isidor et al. 1985) wurde gezeigt, dass die Neubildungspotenz des fibrösen Attachments an geglätteten Wurzeloberflächen bei Zähnen mit vorhergegangener Paradontalkrankheit und vorher gesunden, bei denen das Attachment ebenfalls chirurgisch entfernt wurde, etwa gleich ist.

Mit der hier angewandten operativen Technik wurde hinfort der Begriff Guided Tissue Regeneration (GTR) verbunden. Überließe man nach dem chirurgischen Eingriff die Heilung sich selbst, so würde die Wunde möglichst schnell mit Epithel überzogen und dadurch geschlossen. Die Gewebearten des Parodonts regenerieren mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Das Prinzip der GTR beruht auf dem Einsetzen einer physikalischen Barriere, die das Tiefenwachstum des Epithels verhindern soll. Diese Barriere wird in Form einer Membran dicht an die zervikale Wurzeloberfläche gelegt und dort fixiert. So erhalten alle geschädigten Gewebe des Zahnhalteapparates die benötigte Zeit für ihre Regeneration. Technische Weiterentwicklungen bezogen sich seither im Wesentlichen auf die Materialien und Formen der Abdeckfolien oder Membranen.

2.5 GTR-Membranen

Grundsätzlich ist zu unterscheiden zwischen zwei Arten von Membranen: nicht resorbierbaren, die nach einer initialen Heilungsphase von 4-6 Wochen durch einen zweiten chirurgischen Eingriff entfernt werden müssen, und bioresorbierbaren Membranen.

Zur ersten Art gehört das oben erwähnte Millipore®-Filter sowie das aus e-Polytetrafluorethylen (ePTFE) hergestellte Gore-Tex® Periodontal Material der Fa. W. L. Gore & Associates GmbH, Putzbrunn, Deutschland. Vor allem wegen der Belastung des Patienten, aber auch des Heilungsprozesses durch die zweite Operation setzt sich mehr und mehr die zweite Art, die der bioresorbierbaren Membranen durch.

Nach Hutmacher und Hürzeler (1995) unterscheidet man zwei Arten von biologisch resorbierbaren Polymeren: die synthetischen Polymere (z.B. Polyester) und die natürlichen Polymere (z.B. Kollagen). In der vorliegenden Arbeit wurden Membranen aus aliphatischem Polyester untersucht.
Eine solche Membran wird von der Fa. Ethicon unter dem Namen Vicryl® angeboten. Es ist ein synthetisches Material, welches aus einem Copolymer von Glycolid und Lactid im Verhältnis 9 : 1 zusammengesetzt ist. Dies führte zum Namen Polyglactin 910. Vicryl® wird als feines Filament hergestellt, aus dem Netze geflochten werden. Vicryl® ist ein in der Chirurgie vielfach bewährtes Nahtmaterial. Über Anwendungen von Vicryl®-Netzen in der Zahnheilkunde berichten unter anderem Schneider et al. (1990); Quinones (1990); Caton et al. (1990); Schultz et al. (1990); Zappa (1991) sowie Calagione (1992). In diesen Studien wurde gezeigt, dass Vicryl® während seiner Auflösung nur zu einer milden Gewebereaktion führt und als GTR-Material geeignet ist. Der Abbau erfolgt durch Hydrolyse der Esterbindungen. Dabei entstehen Glycol- und Milchsäure, die im Zitratzyklus zu CO_2 und H_2O metabolisiert werden (Christgau et al. 1995). Es wurden sowohl Tierversuche (Hunde, Affen), als auch Studien an Menschen durchgeführt. Vicryl®-Netze, die nach einem Monat noch sichtbar und funktionsfähig waren, waren nach drei Monaten vollständig resorbiert. Kronenthal (1975) beschreibt die Polymerdegradation in vivo als einen Prozess, der in vier Stufen abläuft.

Neben Publikationen über industriell hergestellte GTR-Membranen (außer Vicryl® ist z.B. Resolut XT® von W.L. Gore & Associates, Flagstaff, USA zu nennen) gibt es zahlreiche Publikationen über selbst hergestellte GTR-Membranen oder -Folien. Mikos et al. (1993 und

1994) haben ein Herstellungsverfahren für 50:50 (D, L) lactid-glycolid Membranen beschrieben. Robert et al. (1993) haben untersucht, wie durch Änderung der Zusammensetzung von GTR-Membranen deren Resorptionszeit variiert werden kann. Zur hydrolytischen Degradation dieser Membranen liegen umfangreiche Untersuchungen von Li et al. (1990) und von Grizzi et al. (1995) vor. Einen Vergleich der In-vitro-Ergebnisse von Li mit In-vivo-Versuchen bei Kaninchen haben Therin et al. (1992) vorgelegt. Dabei fanden sie vergleichbare Ergebnisse.

Die Zeit für den Abbau einer resorbierbaren Membran ist von größter Wichtigkeit. Eine Diskrepanz mit der erforderlichen Zeit für die Regeneration verhindert den Heilungserfolg.
So berichteten Vuddhakanok et al. (1993) über einen In-vivo-Einsatz von polylactide: polyglycolide 50:50-Membranen an 17 menschlichen Zähnen. Die Barriere war 10 bis 14 Tage nach dem Einsetzen noch klinisch erkennbar, aber nicht mehr nach 17 Tagen. Die Nachuntersuchung ergab keinen Attachmentgewinn. Dagegen berichteten Canton et al. (1994) vom erfolgreichen Einsatz von Vicryl®-Membranen, die noch nach 4 Wochen, aber nicht mehr nach 6 Wochen klinisch erkennbar waren. Sie behandelten mit der GTR-Methode an 20 Patienten Molare mit Furkationsbefall vom Grad II. Einer gleichen Behandlung, aber ohne GTR-Membranen wurde eine Kontrollgruppe ebenfalls aus 20 Patienten unterzogen. Das Ergebnis nach sechs Monaten: In der GTR-Gruppe wurden 15 der 20 Furkationen der Gruppe II in solche der Gruppe I umgewandelt, während in der Kontrollgruppe nur in einem einzigen Fall eine vergleichbare Verbesserung auftrat.

2.6 Einfluss bakterieller Esterasen

Über den Einfluss von bakteriellen Esterasen auf den Abbau bioresorbierbarer Polyester gibt es bislang nur wenige Untersuchungen. Grimm et al. (2004) haben den bakteriellen Einfluss bei der Degradation und Biofilmbildung auf verschiedenen Kunststoff-Barriere-Membranen in vitro untersucht. Es wurden sulfat-reduzierende Bakterien (Becher et al. 2005) mit Bakterien aus dem „red complex“ nach Socransky et al. (1998) verglichen. Die biochemischen Eigenschaften verschiedener Spezies Streptococcus aus der dentalen Plaque unter Einschluss der Esterase wurden von Cvitkovitch et al. (1994) beschrieben. In dieser Arbeit wird aber kein Bezug auf GTR genommen. Kleeberg (1999) hat den mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen Copolyestern durch Esterasen bei der Kompostierung untersucht. Umfangreiche

Studien über Esteraseaktivitäten von Bakterien wurden in der Lebensmittelchemie, vor allem in der Milchwirtschaft durchgeführt (Siehe Kap.4: Diskussion).

Es gibt zahlreiche Studien über die Anlagerung von Bakterien an GTR-Membranen. Distler et al. (1995) haben die Bakterienadhäsion an verschiedene GTR-Materialien qualitativ und quantitativ untersucht. Mit ähnlicher Zielsetzung zeigte Wang et al. (1994) die Anlagerung von 15 verschiedenen oralpathogenen Bakterien an drei unterschiedliche GTR-Membranen. An diese Studie wurde eine In-vivo-Studie mit 10 Patienten angeschlossen (Chen et al. (1997)). Unter In-vivo-Bedingungen konnten Unterschiede, die sich in der vorausgehenden In-vitro-Studie gezeigt hatten, nicht bestätigt werden, und alle drei GTR-Materialien zeigten keine Unterschiede in der Bakterienanlagerung und ihrem Verhalten. Grimm et al. (2000) haben eine klinische 18-Monats-Studie mit sulfatreduzierenden Bakterien und zwei verschiedenen bioresorbierbaren GTR-Membranen veröffentlicht. Hierbei wurden nach 18 Monaten keine statistisch relevanten klinischen Unterschiede mit und ohne Bakterienbelastung gefunden, obwohl eine Bakterienanlagerung auf beiden Membrantypen beobachtet wurde.

Für die vorliegende Arbeit sind nur solche Bakterien von Interesse, deren Zusammenhang mit Parodonditis belegt ist. Es wird hier verwiesen auf das Standardwerk „Contemporary Oral Microbiology and Immunology“, herausgegeben von Slots und Taubmann (1992) und den „Red Complex“ nach Socransky et al. (1998).

In vitro lässt sich der Einfluss einzelner Bakterien auf die Degradation einer GTR-Membran unter klar definierten Bedingungen untersuchen. Der Einfluss von Bakterien unter In-vivo-Verhältnissen ist allein schon wegen der Vielzahl der dort einwirkenden Bakterienarten und der undefinierten chemischen Bedingungen nur mit sehr großen Unsicherheiten möglich. Darum sind für die Bewertung von In-vitro-Ergebnissen nach Möglichkeit immer auch klinische Fallstudien heranzuziehen. Als solche sind für die vorliegende Arbeit die klinisch kontrollierte 5-Jahres-Split-mouth-Fallstudie von Gaßmann et al. (2004), die 4-Jahres-follow-up-split-mouth-Studie von Sculean et al. (2001) sowie ein Vergleich der Langzeitergebnisse der GTR-Therapie mit resorbierbaren und nicht resorbierbaren GTR-Therapien von Eickholz et al. (2001) zu nennen.

3. Versuchsplanung

Die vorliegende klinische In-vitro-Studie untersuchte die Resorption von Poly (D, L) lactid-poly GlycolidCopolymer durch pseudopathogene Bakterien.

Die Arbeit beschränkt sich auf In-vitro-Untersuchungen mit GTR-Polyester-Membranen, die wie Vicryl® auf der Grundsubstanz Poly (D, L) lactide polyglycolide basieren. Den Versuchen lag die Hypothese zugrunde, dass bakterielle Esterasen, die im Zusammenhang mit der Parodontitis gefunden werden, die Spaltung des Polyesters Lactid-Glycolid in den Membranen katalysieren können. Dies würde eine Beschleunigung der Degradation der GTR-Membranen und eine Verminderung ihrer Standfestigkeit zur Folge haben.

Zuerst wählten wir Bakterien aus, bei denen Esteraseaktivitäten nachweisbar waren. In einem zweiten Schritt sollte der Abbauprozess von Membranen des genannten Typs unter sterilen Kautelen und anaeroben Bedingungen mit und ohne Bakterien in vitro verglichen werden.

In der nachfolgenden schematischen Darstellung (Flussdiagramm) wird der Studienablauf in die Hauptabschnitte des Versuches Einarbeitungsphase, Hauptversuch und Auswertung klar untergliedert. Die Einarbeitungsphase, in der alle wichtigen Vorbereitungen für den Hauptversuch erarbeitet wurden, ist ausschlaggebend dafür, dass der Hauptversuch zielführend zu einem Ergebnis kommt.

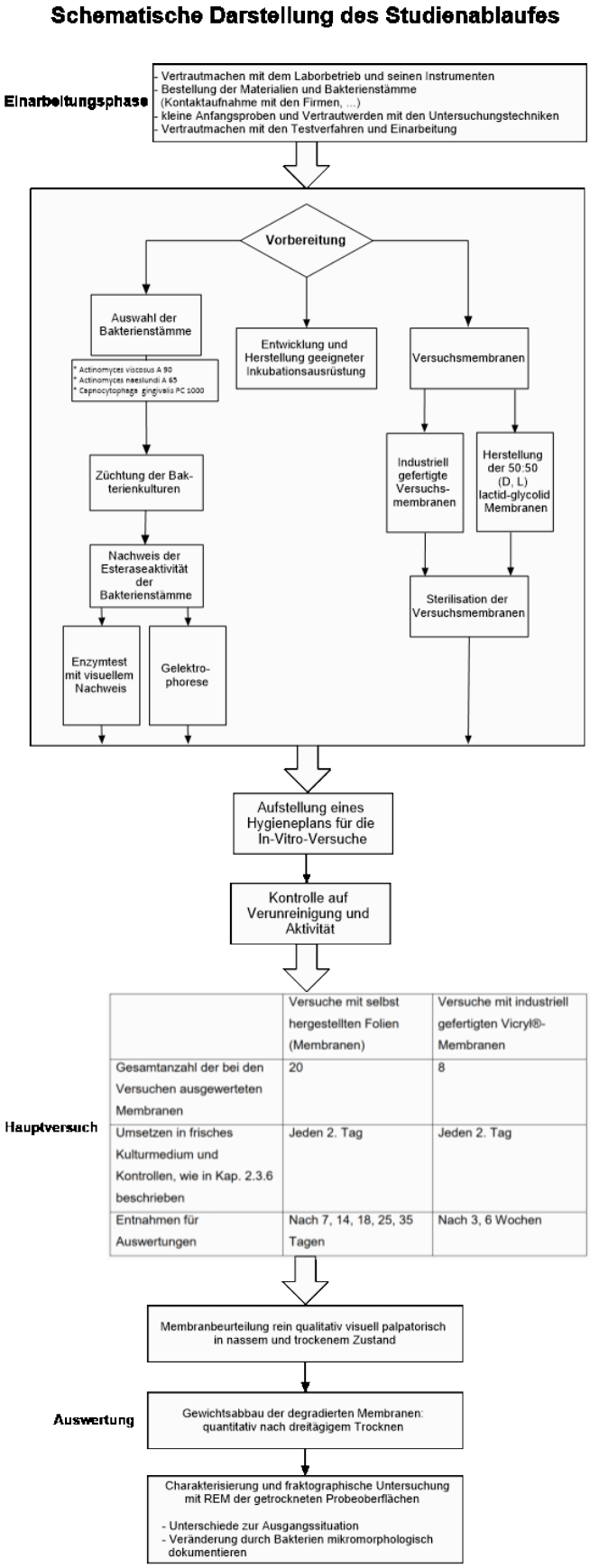


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Studienablaufes

4. Material und Methode

4.1 Verwendete Mikroorganismen und Nährmedien

4.1.1 Auswahl der Bakterienstämme, Charakterisierung und Herkunft der Bakterien

Bei der Auswahl der Bakterienstämme wurden die folgenden Kriterien zu Grunde gelegt:

1.) belegter Zusammenhang mit Parodontitis
2.) sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien. Bei der Membranexposition sollte ein möglichst breites Spektrum von Bakterien zum Einsatz kommen.
3.) Aus einem vorhandenen Pool von Mikroorganismen, der die Kriterien 1) und 2) erfüllt (A 90, A 65, Sm 249, SM 441, SS 34, PC 1000, Sm GS 5, H 1 und Sm 10449), wurden nach Vorversuchen drei Bakterien ausgewählt, die am deutlichsten eine Esteraseaktivität zeigten.

Die für den Hauptversuch ausgewählten Bakterien und ihre Herkunft sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Tab.4.1: Im Hauptversuch verwendete Bakterienstämme

Bakterienstämme				
Actinomyces viscosus A 90	12.1.90	Prof. Schaal	Köln	grampositiv
Actinomyces naeslundi A 65	2.9.82/30.6.87	„	„	grampositiv
Capnocytophaga gingivalis PC 1000	1.921: (A 90, A 65, Sm 249, SM 441, SS 34, PC 1000, Sm GS 5, H 1 und Sm 10449).85	Dr. Paul E. Kolenbrander	Bethesada, Maryland	gramnegativ

4.1.2 Verwendete Nährmedien und Inkubationsbedingungen zur Herstellung der Bakterienkulturen

Wir verwendeten das industriell vorgefertigte Nährmedium Bakto® Hirn-Herz-Glukose-Bouillion. Dieses stellte sich für alle untersuchten Bakterienarten als zufriedenstellendes Wachstumsmedium heraus.

Inkubationsbedingungen:
Als Kulturgefäße dienten sterile 10ml-Röhrchen und sterile 100ml-Gläschen, deren Deckel während der Kultivierung lose aufgeschraubt wurden, um einen Gasaustausch mit der anaeroben Umgebung zu ermöglichen. Die Inkubation der Bakterien erfolgte anaerob mittels Gas-Pack-System (BBL Microbiology Systems) in Batchkulturen bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank. Die Anzüchtung erfolgte über Nacht.

Die Reinheit einer Kultur wurde durch mehrmaliges Überimpfen gewährleistet und durch ständige Kontrollen im Phasenkontrastpräparat am Laminar Flow im Mikroskop überprüft (Laminar Flow von der Fa. Steag). Erfolgreich getestete, gut angewachsene Subkulturen eines Stammes wurden bei 20°C aufbewahrt und somit sichergestellt, dass genug Keime für alle Versuche vorhanden waren.

Dabei wurde entsprechend der folgenden Impfanweisung verfahren: 1ml Baktkultur zum Überimpfen auf 10ml für das Anzüchten, 5ml angezüchtete Kultur auf 100ml für die Versuche. Aus je 20 ml der angezüchteten Bakterienkulturen wurden durch Abzentrifugieren Bakterienpellets gepresst.

4.2 Nachweis der Esteraseaktivität von bestimmten Bakterienstämmen der Mundhöhle

Der Nachweis einer Esteraseaktivität der Bakterien wurde durch folgende zwei Untersuchungsmethoden geführt:

1. Enzym-Test mit visuellem Nachweis durch Farbstoffe und Überprüfung des visuellen Nachweises durch UV-Absorptionsmessung.
2. Gelelektrophorese

Die Nachweisgenauigkeit mit der Gelelektrophorese ist größer als mit der ersten Methode. Die ersten Untersuchungen, die an zehn Bakterienstämmen durchgeführt wurden, dienten einer

Groborientierung, in dem Sinne, dass die drei aktivsten Stämme herausgefunden werden sollten. Deren Esteraseaktivität wurde mittels einer Gelelektrophorese überprüft.

4.2.1 Enzym-Test durch Pipettieren mit verschiedenen Farbstoffen

Die Herstellung der Proben aus den gezüchteten Bakterienkulturen erfolgte in folgenden Schritten:

1. Abzentrifugieren von Pellets aus je 20 ml Medium
2. Zweimaliges Waschen der Pellets mit PBS Puffer (50 mmol Phosphatpuffer; ph 7,4).
3. Resuspendierung der Pellets mit PBS auf 1ml.

Für den Enzymtest wählten wir zwei Farbstoffe: p-Nitrophenylester und α-Naphtylester. Es wurden drei Messreihen durchgeführt, die erste nur für den Nachweis mit p-Nitrophenylester, die beiden folgenden mit p-Nitrophenylester und mit alpha-Naphthylester. Nach der ersten Messreihe mit zehn Bakterienstämmen wurden drei Bakterienstämme ausgewählt. Ab der zweiten Messreihe wurden alle Versuche nur noch mit diesen ausgeführt.

Um den Grad der Esteraseaktivität korrelierend zur Farbintensivität visuell abschätzen zu können, ordneten wir dem verwendeten PBS-Puffer mit dem jeweiligen Farbstoff (Kontrolle 1) den Grad 1 zu und einer Mischung aus Puffer, Farbstoff und einer zugegebenen Esterase (Kontrolle 2) den Grad 4. Somit war es möglich, visuell die Esteraseaktivität den Graden zwischen 1 und 4 zuzuordnen. Der visuell ermittelte Farbumschlag wurde zusätzlich durch UV-Spektometrie überprüft und quantifiziert. Für die Photometrie wurden die Proben in 1:1 Ethanol zentrifugiert. Die Versuchsreihe mit α-Naphthylester wurde bei 491 nm, die mit p-Nitrophenylester bei 398,5 nm gemessen (UV 1202 Spektrometer SHIMADZU). Für jede Farbreaktionsmessung wurden je 100 µl aus der jeweiligen Suspension entnommen. Im Fall der Kontrolle 1 bestand die Probe aus Wasser oder PBS, bei der Kontrolle 2 aus Esterase 1:100.

Tab.4.2: Nachweis der Esterase durch Pipettieren mit Farbstoffen

Pipettieren mit p-Nitrophenylester	**Pipettieren mit α-Naphthylester**
5ml PBS 400 µl p-Nitrophenylester 100 µl Probe	2,5 ml PBS 400 µl α-Naphthylester 100 µl Probe Dann 10 Minuten inkubieren lassen, mischen, erst danach 400µl Fast-Blue-RR-Lösung zugeben.
Bis zum Eintritt der Farbreaktion wurden die Proben abgedunkelt, um evtl. Lichtreaktionen auszuschließen.	Bis zum Eintritt der Farbreaktion wurden die Proben abgedunkelt, um evtl. Lichtreaktionen auszuschließen.
Farbumschlag ohne/mit Esterase: gelb/weiß	Farbumschlag ohne/mit Esterase: gelb/rot
Beurteilung: Einordnung in eine Farbskala mit den Graden 1 bis 4 oder photometrische Auswertung	**Beurteilung: Einordnung in eine Farbskala mit den Graden 1 bis 4 oder photometrische Auswertung**

4.2.2 Gelelektrophorese

Es wurde die native Gelelektrophorese mit „Phast System“ (LKB Pharmacia) verwendet. Dieses setzt sich aus Polyacrylamide Gelen (Phast Gel Gradient 8-25; Phast Gel Gradient 10-15; Phast Gel Native Puffer Strips) zusammen. Das Phast Gel 8-25 ist so ausgelegt, dass eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsdistanz eines Proteins und dem Logarithmus seines Molekulargewichts besteht. Diese Linearität besteht für native Proteine mit Molekulargewichten zwischen 50000mM und 750000mM. Proteine über 750000 sind zu groß, um in das Gradientengel einzutreten. Für kleinere Proteine gilt der lineare Zusammenhang mit dem Logarithmus des Molekulargewichts nicht mehr. Viele Enzyme (Esterasen) können mit

Hilfe eines spezifischen Substrats (z.B. α-Naphthylester) und gekoppelten Diazo-Farbstoff-Reaktionen direkt im Gel spezifisch und mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden.

Die Elektrophorese wurde in einem Puffersystem, das mit 0.112 M Acetat und 0.112 M TRIS belegt war, bei einem pH-Wert von 6,4 und 400 V bei 170 Vh durchgeführt. Im Übrigen wurde nach den Beschreibungen der Fa. Pharmacia Biotech zum Phast System vorgegangen. Der Nachweis der Esterasen auf dem Gel erfolgte durch die oben beschriebenen farbmetrischen Verfahren.

Beim Aufschluss der Bakterienpellets wurde wie folgt vorgegangen:

Der Aufschlusspuffer bestand aus einem Grundpuffer aus 0,2 M Tris Phosphatpuffer pH 7,5 bei 4°C + 0,02 % Azid, dem die folgenden weiteren Zusätze zugegeben wurden:

DTT:	20 mM	entspricht 30,85 mg/10 ml
Lysozym:	0,2 % w/v	entspricht 20 mg/10 ml
FDF:	3 mM	entspricht 156 µl einer193mM/10 ml
Pefabloc:	5,0 mM	entspricht 12 mg/10 ml MG = 239.68
Dnase 1:	15000 M/ ml soll 75 M/ml→ 50 µl/ 10ml	

Nähere Angaben zu den verwendeten Substanzen und die Bezugsquellen der Chemikalien sind in Anhang A zusammengestellt.

Für die Herstellung von Rohextrakten aus den Bakterienpellets wurden pro Pellet 5 ml dieses Aufschlusses und 0,5 g Glasperlen zugegeben. Danach wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Lysozym wirkte. Als weiterer Schritt wurde 5- bis 10-mal mit dem Ultraschallrüssel auf Stufe 8 durchgerührt und 15 Sekunden im Eisbad gekühlt. Der zentrifugierte zellfreie Überstand wurde direkt für die native Gelelektrophorese mit dem „Phast System“ verwendet.

Tab.4.3: Aufschluss der Bakterienpellets für den Hauptversuch

A 65	auf Brain Heart Medien gewachsen vom 12.9.95	Aufschluss 27.9.95
A 90	auf Brain Heart Medien gewachsen vom 29.3.95	Aufschluss 27.9.95
PC 1000	auf Brain Heart Medien gewachsen vom Juli 1995	Aufschluss 9.10.95

Tab.4.4: Bestückung des Gels (12.10.95); Gel I und Gel II 8-25% nativ. (Die Positionen 1, 4, 6 und 7 von den insgesamt acht Positionen sind für den Versuch nicht von Bedeutung.)

Position 2	A 65
Position 3	A 90
Position 5	PC 1000
Position 8	Esterase der Schweineleber 1:1000 verdünnt entspricht 1M

Tab.4.5: Rezeptur für das Anfärben des Gels zur Sichtbarmachung der aktiven Esterase

	Rezeptur für Phastgele Gradientengele 8-25 % mit Sammelgel
0,2 M Tris-HCl pH 7,4 (Merk)	0,4 ml
Wasser bidest.	9,4 ml
α- Naphtylacetat (1% in Äthanol)	0,2 ml
Fast Blue RR oder Fast Garnet (ergibt gelblichen Hintergrund)	5 ml
Insgesamt:	**10 ml**

Bei der Anfärbung der Esterasebanden auf dem Gel waren folgende Vorschriften beziehungsweise Erfahrungen zu beachten: Die Farblösung (siehe Tab. 4.5) sollte gegen Ende der Gellaufzeit frisch zubereitet werden. Da die Reaktion sehr schnell ist, wurde die Farblösung schon nach fünf Minuten mit Wasser versetzt. Danach wurde das Gel mit Wasser gewaschen und in einer Lösung aus 10% Essigsäure + 8% Glycerin + 82% Wasser für die Trocknung konserviert.

4.3. Versuchsmembranen

4.3.1. Industriell gefertigte Versuchsmembranen

Es standen industriell gefertigte Membranen in Form von Netzen aus Vicryl® von der Fa. Ethicon zur Verfügung. Diese wurden neben den im nächsten Absatz beschriebenen Membranen aus eigener Herstellung in allen Versuchen verwendet. Die Vicryl®-Netze zeigten nach dem Zerschneiden in quadratische Stücke von 2cm Kantenlänge eine hohe Instabilität, die im Lauf der Hydrolyse noch stark zunahm. Dadurch war ihre Handhabbarkeit während der Versuche sehr eingeschränkt und eine quantitative Bestimmung der Gewichtsabnahme nicht möglich. Sie konnten daher bei der Auswertung nur für einen qualitativen Vergleich der Degradationsabläufe herangezogen werden.

4.3.2 Herstellung der 50:50 (D, L) lactid-glycolid Membran

Die Herstellung unserer Versuchsfolie erfolgte entsprechend der Rezeptur nach Mikos et al. (1993). Das Grundmaterial bezogen wir von Boehringer.

Für die Herstellung waren folgende Materialien notwendig:

- Polymer (Boehringer Ingelheim D6507) Resomer R RG 503, Chargen Nr./LotNr.15094
- Chloroform
- Polyethylenform (zum Ausgießen)
- Ultraschallbad
- Abzug
- Elektronische Präzisionswaage

Für die Herstellung einer ca. 5 cm auf 10 cm großen, 1-2 mm starken Folie wurden fünf Mal 0,5 g Polymer abgewogen. Jeder Teilmenge wurde in einem Reagenzglas 4 ml Chloroform zugegeben und anschließend die Gläser mit Gummipfropfen fest verschlossen. In einem warmen Ultraschallbad wurde das Polymer im Chloroform gelöst. Dieser Vorgang wurde innerhalb von ungefähr einer Minute ausgeführt. Die so entstandene leicht zähflüssige Flüssigkeit aus den Reagenzgläsern wurde unter dem Abzug in eine Polyethylenform mit den oben genannten Maßen gleichmäßig ausgegossen. Nach 48 Stunden unter dem Abzug wurde

die Folienplatte von der Polyethylenform durch vorsichtige Unterminierung mittels eines Metallspatels getrennt. Die Folie kam schließlich zum Trocknen für mindestens 3 Tage in einen Exsikkator, um die Restfeuchtigkeit zu entziehen. Durch das Vakuumtrocknen bei 13 Pa wurden auch Chloroform Rückstände beseitigt. Danach wurde die getrocknete Platte in Versuchsfolien von 2 cm^2 Größe zerschnitten.

4.3.3. Sterilisation der Versuchsmembranen und Vorbereitung für den Versuch

An den auf Maß zurechtgeschnittenen Membranen wurden zur Vorbereitung für den Versuch die folgenden Handhabungen vorgenommen:

- Die selbst hergestellten Membranen wurden mit der Kofferdammstanze zentral gelocht. Durch die zentrale Lochung sollte der Auflösungsprozess später optisch besser abgeschätzt werden können und die Handhabbarkeit bei fortschreitender Degradation besser gewährleistet werden. Die Vicryl®-Netze wurden nicht gelocht. Dadurch wäre ihre Instabilität weiter erhöht worden.

- Die erste Wiegung der Membranen erfolgte vor ihrer Sterilisation nach Trocknung im Exsikkator, weil bei einer Wiegung unmittelbar vor dem Versuch die Gefahr einer erneuten Kontamination zu groß gewesen wäre.

- Verpackung der Membran in einem Polyethylentütchen

- Polyethylentütchen wurden doppelt in Sterilisationstaschen verpackt und eingeschweißt

- Beschriftung des Sterilisationsgutes

- Sterilisation im Zentralsteri der Uniklinik mit Ethylenoxid

- Lagerung in einer trockenen Umgebung bei Raumtemperatur, ohne Druck auf die Verpackung auszuüben.

4.3.4. Inkubationsausrüstung für den Versuch

Für die Inkubation der Versuchsmembranen wurden 100 ml-Flaschen mit Plastikverschraubdeckel vorbereitet. Dazu wurden in die Deckel je 3 Haken unterschiedlicher Länge aus KFO Draht mit 1 mm Durchmesser eingeklebt. Der Längenunterschied wurde so gewählt, dass die Folien sich nicht berührten. Die Befestigung erfolgte auf der *Außen- und – Innenseite* mit Pattern-Resin-Kunststoff. Die Haken wurden auf der Deckelaußenseite durch eine Beschriftung gekennzeichnet. Anschließend wurden Flaschen und Deckel sterilisiert.

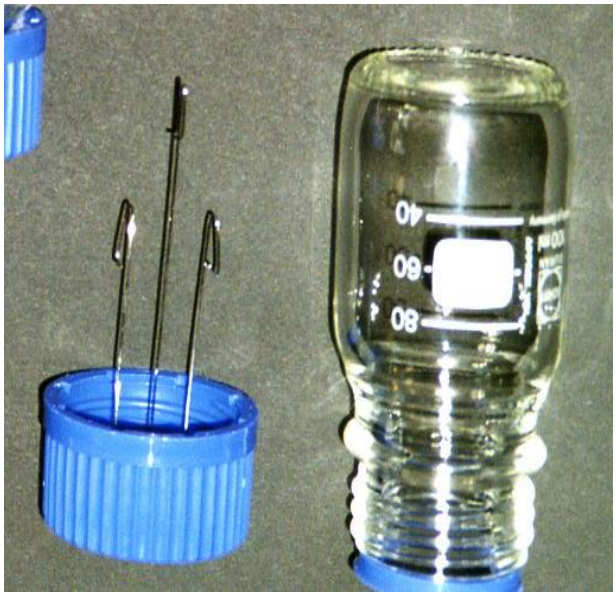


Abb. 4.1: Inkubationsgefäß für die Versuchsmembranen

4.3.5. Hygieneplan für die In-vitro-Versuche

Um eine eventuelle Kontamination der angeimpften Bakteriensuspension durch Luftkeime auszuschließen, wurden die Versuche unter Einhaltung eines standardisierten Protokolls durchgeführt:

Die Versuchsflaschen mit dem Nährmedium wurden vor der Impfung mit der Bakterienkultur sterilisiert. Die Anaerobierbehälter, in denen diese inkubiert wurden, wurden zuvor einer Oberflächendesinfektion unterzogen. Vor dem Einsetzen der Versuchsmembran wurden die Kulturen auf Aktivität und Verunreinigungen durch Luftkeime kontrolliert. Das Einbringen und die Umsetzung der Membranen erfolgte im Laminar Flow (Fa. Steag, Laminarflow-Prozesstechnik). Die Ablagen für die Versuchsgläser und der Laminar Flow wurden vor jedem

erneuten Versuchsabschnitt einer Behandlung mit Flächendesinfektionsmittel (10 Minuten Einwirkzeit) unterzogen. Die Versuchsgläser wurden direkt nach ihrer Entnahme (sterile Handschuhe) aus dem Kulturgefäß auf ein steriles Tuch gestellt und mit einem solchen abgedeckt. Ich selbst kleidete mich wie für eine Operation (steriler Mantel und Handschuhe, OP-Haube) ein. Alle für den Versuch benötigten Verbrauchsmaterialien wurden aus der hausinternen Sterilisation bezogen.

Das Einsetzen der Membrane in die vorab im Autoklav sterilisierten Versuchsgläser erfolgte mit einer sterilen Pinzette unter den oben genannten Kautelen. Die Versuchsmembranen wurden genauso wie die industriell gefertigten Membranen aus einer sterilen Doppelpackung entnommen, um einer Kontamination im Vorfeld vorzubeugen.

Durch das Design der Aufhänger war gewährleistet, dass die Membranen beim Umsetzen nicht mit dem Versuchsglasrand in Berührung kommen konnten und ein sehr schneller Wechsel in das frische Batch möglich war.

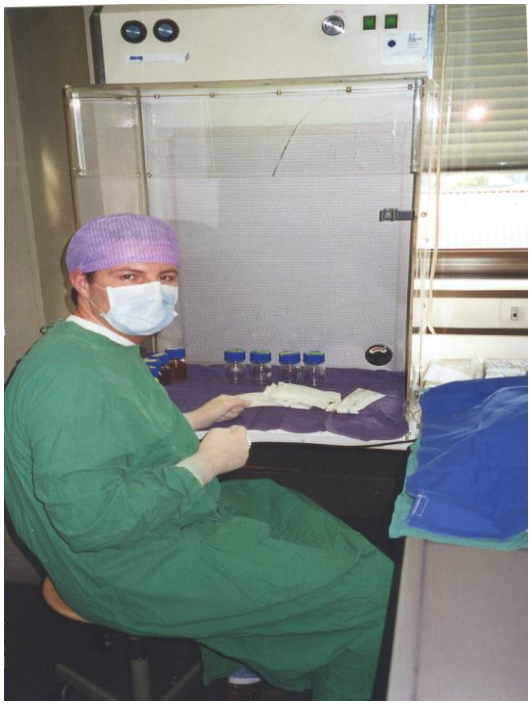


Abb.4.2: Einbringen der Versuchsfolien-Membranen in die angeimpfte Nährlösung und Bebrütung der Gläser

4.3.6. Kontrolle auf Verunreinigungen und Aktivität

Die Umsetzung der Membranen erfolgte alle zwei Tage in ein frisch angeimpftes Kulturmedium.
Der festgelegte Rhythmus, 1. Tag Animpfen (am Abend) - Anwachsenlassen über Nacht - Wechsel am 2. Tag, regelte auch die Kontrolle auf Verunreinigungen besonders durch Luftkeime. Die Kontrollen erfolgten beim Umsetzen in ein neues Versuchsglas durch ein Abstrichspräparat visuell unter dem Mikroskop. Zusätzlich wurde vor dem Einsetzen der Membran in das angeimpfte Nährmedium dessen Aktivität überprüft. Die jedes Mal neu angezüchteten Bakterienpopulationen für das Animpfen und die neu hergestellten sterilen Nährmedien wurden ebenso kontrolliert. Um zu gewährleisten, dass der Versuch auch bei einer Störung durch eine Verunreinigung fortgesetzt werden konnte, wurden angeimpfte Reservenährmedien mitgeführt.

4.3.7. Ablauf des Hauptversuchs: Einsetzen, Umsetzen und Entnahme der Folien

Im Hauptversuch wurde unter gleichen Bedingungen eine Versuchsreihe mit selbst gefertigten Lactid-Glycolid-Membranen und eine mit industriell gefertigten Netzen aus Vicryl® durchgeführt. Die Zeitpunkte, an denen Membranen oder Netze für Auswertungen entnommen wurden, sind Tab. 4.6 zu entnehmen. Selbst hergestellte Folien wurden fünfmal und Vicryl®-Netze zweimal für Auswertungen entnommen. Neben den Versuchslösungen A 65 + Nährmedium, A 90 + Nährmedium und PC 1000 + Nährmedium wurde eine Kontrolllösung aus reinem Nährmedium mitgeführt, um die reine Hydrolyse mit der Zersetzung unter Bakterieneinfluss vergleichen zu können. Somit wurden von den selbst hergestellten Folien 5x4=20 Stück und von den Vicryl®-Netzen 2x4=8 Stück für die Auswertungen benötigt. Da maximal drei Membranen in einem Versuchsglas Platz hatten, mussten wir für die selbst hergestellten Folien 8 Gläser und für die Vicryl®-Netze 4 Gläser für den Hauptversuch einsetzen.

Tab.4.6: Versuchsablauf

	Versuche mit selbst hergestellten Folien (Membranen)	Versuche mit industriell gefertigten Vicryl®-Membranen
Gesamtanzahl der bei den Versuchen ausgewerteten Membranen	20	8
Umsetzen in frisches Kulturmedium und Kontrollen, wie in Kap. 2.3.6 beschrieben	Jeden 2. Tag	Jeden 2. Tag
Entnahmen für Auswertungen	Nach 7, 14, 18, 25, 35 Tagen	Nach 3, 6 Wochen

4.3.8 Auswertungsmethode

Der Einfluss der drei ausgewählten Bakterienstämme auf die Degradation der selbsthergestellten Folien wurde in drei Teilschritten untersucht:

Zuerst beurteilten wir die Membranen rein qualitativ visuell und palpatorisch mittels einer Pinzette im nassen und später im trockenen Zustand. Die Kriterien waren bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit: glatt, rau, aufgequollen, zerfasert, blätterteigartig, porös und bezüglich der Festigkeit: glasartig, hart, fest, elastisch, gummiartig, weich.

Danach wurde der Gewichtsabbau der degradierten Membranen quantitativ ausgewertet. Bevor sie zum Trocknen in den Exsikkator gelegt wurden, wurde der Bakterienrasen mit einem sanften Spülstrahl Aqua dest. aus einer Laborflasche und durch ein vorsichtiges Ultraschallbad (Membran in einem kleinen Glasgefäß) entfernt. Es sollte dadurch vermieden werden, dass Bakterienreste das Ergebnis beeinflussen. Je länger die Membranen in der Bakterienlösung waren, umso intensiver und vorsichtiger musste diese Reinigung vorgenommen werden. Die Membranen wurden drei Tage getrocknet, um Flüssigkeits- rückstände ganz zu beseitigen. Das Wiegen erfolgte wie die Wiegung vor dem Einsatz unmittelbar nach der Entnahme aus dem Exsikkator.

In einem letzten Schritt wurden die getrockneten Probenoberflächen einer Charakterisierung und fraktographischen Untersuchung mit dem REM (Leitz ISI SR 50® Akashi, Japan) unterzogen. Dazu wurden Proben mit Leit C® auf Probenträger aufgeklebt und mit Gold gesputtert, um eine elektronische Aufladung zu vermeiden. Bei der Betrachtung wollten wir die Unterschiede zur Ausgangssituation aufzeigen und Veränderungen durch Bakterien mikromorphologisch dokumentieren.

Bei den industriell gefertigten Membranen war keine quantitative Auswertung der Gewichtsabnahme möglich.

5. Ergebnisse

5.1 Nachweis der Esteraseaktivität von Bakterienstämmen der Mundhöhle

5.1.1 Visueller Nachweis im Enzymtest durch Farbstoffe und Quantifizierung der Farbreaktion durch UV-Absorptionsmessung

Die Reaktionszeiten für den Farbumschlag lagen bei ca. einer halben Stunde; nur beim PC1000 war eine Reaktion schon nach wenigen Minuten erkennbar.

In Abb. 5.1 und Abb. 5.2 sind die Ergebnisse des Enzym-Tests mit visuellem Nachweis durch Farbstoffe dargestellt. Es wurden drei Messreihen durchgeführt, die erste nur für den Nachweis mit p-Nitrophenylester, die beiden folgenden mit p-Nitrophenylester und mit alpha-Naphthylester.

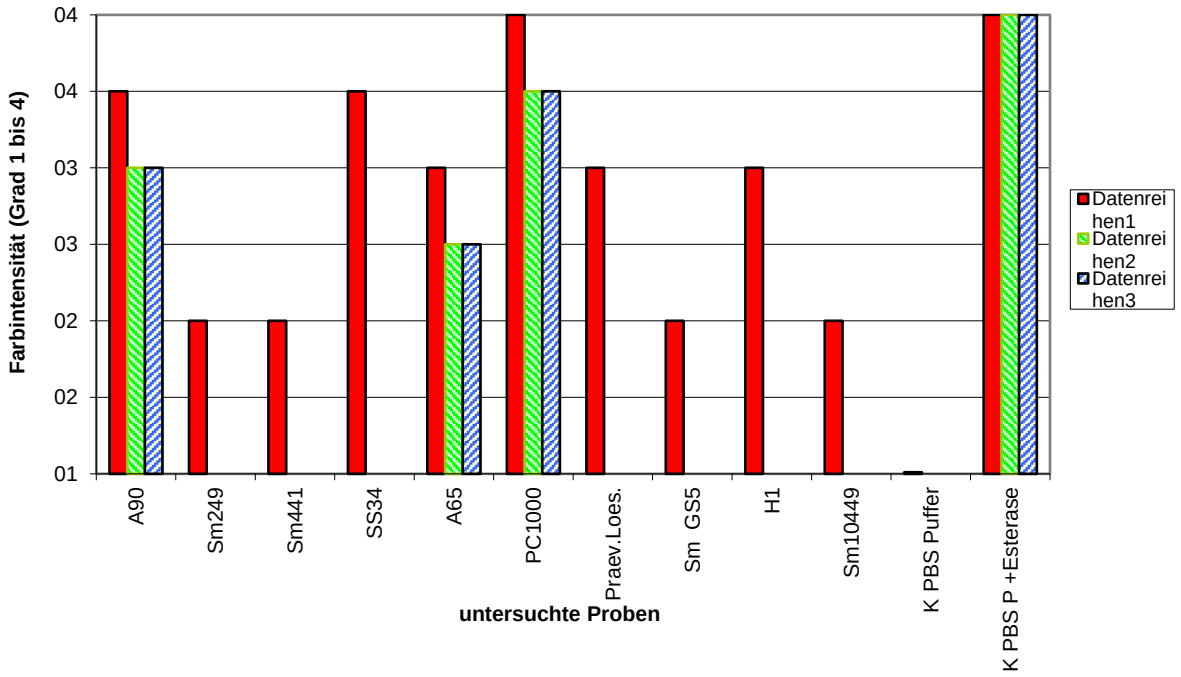


Abb: 5.1: Visueller Esterasenachweis mit p-Nitrophenylester in einem Enzymtest (Reihe 1 bis 3 bezieht sich auf die Durchgänge 1 bis 3). Im ersten Durchgang wurden 10 Bakterienstämme untersucht, in den folgenden Durchgängen nur noch die 3 für den Hauptversuch ausge- wählten. Eine negative und positive Kontrolle wurde mitgeführt.

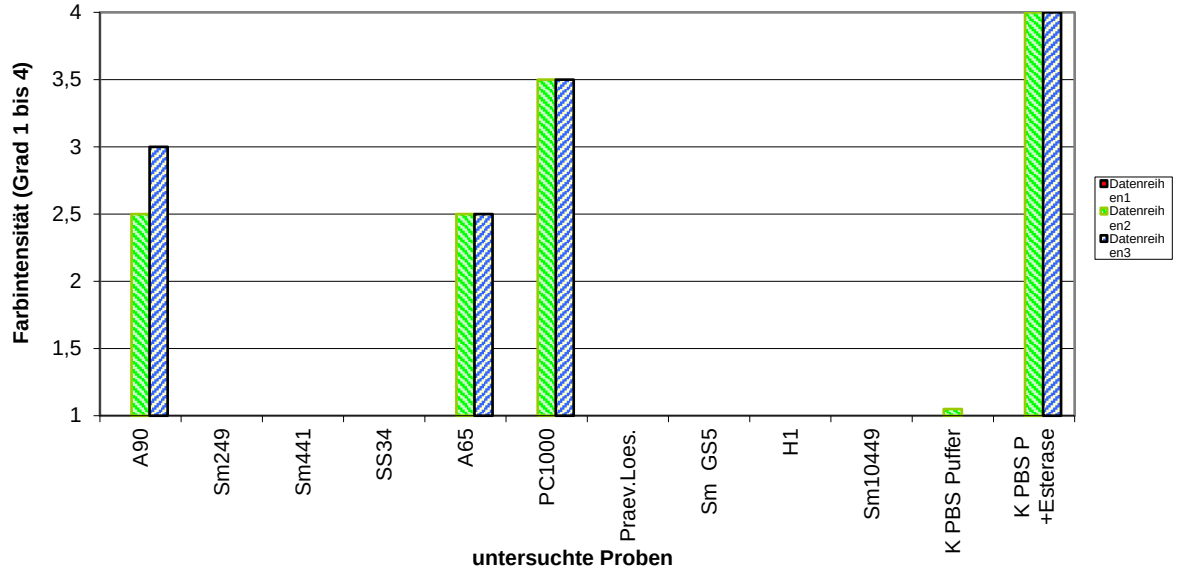


Abb. 5.2: Visueller Esterasenachweis mit alpha-Naphthylester in einem Enzymtest

An den roten Säulen in Abb. 5.1, der ersten durchgeführten Messreihe, sind in sechs der zehn untersuchten Proben deutliche Hinweise auf eine Esteraseaktivität zu erkennen. Nach dieser Messreihe wurde eine Vorauswahl unter den Bakterienstämmen getroffen. Vor dieser Entscheidung wurde die visuell abgeschätzte Farbintensität und Einteilung in vier Grade durch UV-Absorptionsmessung überprüft und quantifiziert (siehe Abb. 5.3).

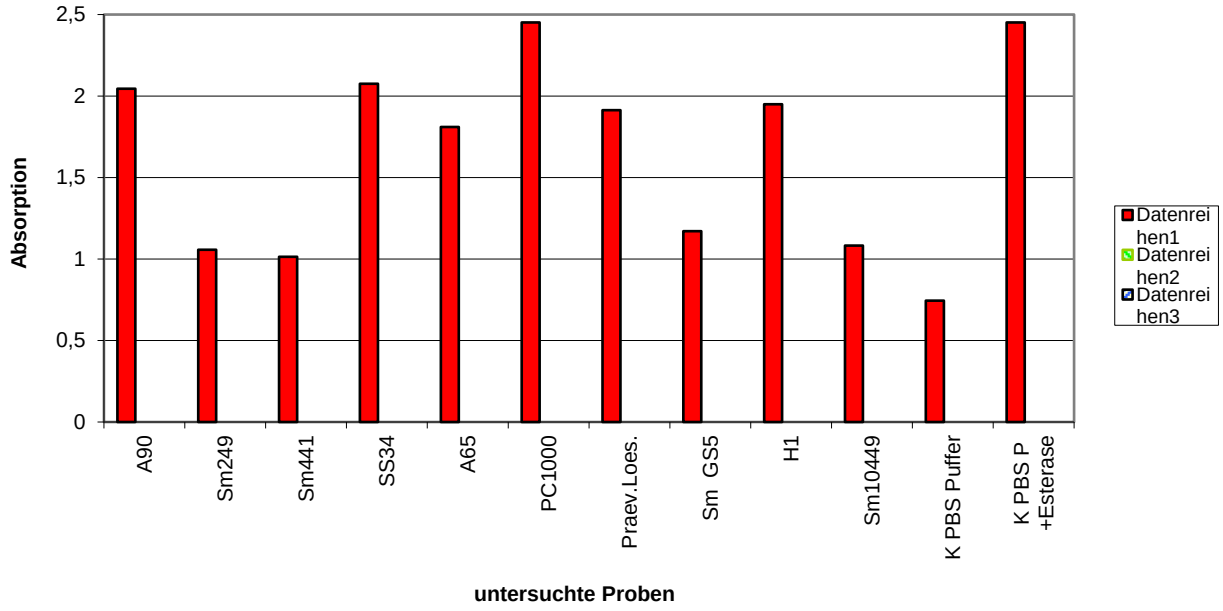


Abb. 5.3: Bestätigung der visuellen Auswertung des ersten Durchgangs aus Abb. 5.1 durch UV-Absorptionsmessung

Es wurden die visuellen Befunde bestätigt und für alle weiteren Untersuchungen die Bakterienstämme A 90, A 65 und PC 1000 ausgewählt. Der erste Durchlauf mit alpha-Naphthylester, das sind die grünen Säulen in Abb. 5.2, wurde ebenfalls einer UV-Absorptionsmessung unterworfen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.4 dargestellt und bestätigen ebenfalls die Befunde von Abb. 5.2.

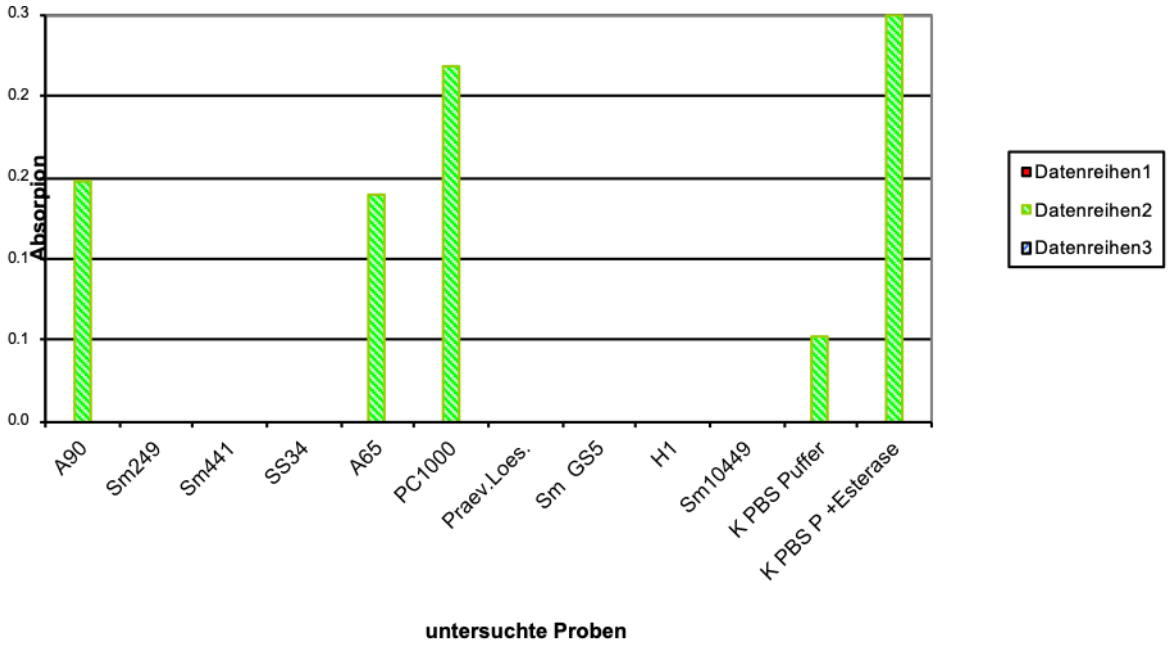


Abb. 5.4: Bestätigung der visuellen Auswertung des zweiten Durchgangs aus Abb. 5.2. durch UV-Absorptionsmessung

In Abb. 5.5 sind für die ausgewählten drei Bakterienstämme die Mittelwerte der Farbintensität mit den Standardabweichungen dargestellt, die sich aus den fünf Messreihen ergeben. Auch bei Berücksichtigung der Standardabweichungen bleibt ein großer Abstand zur negativen Kontrolle.

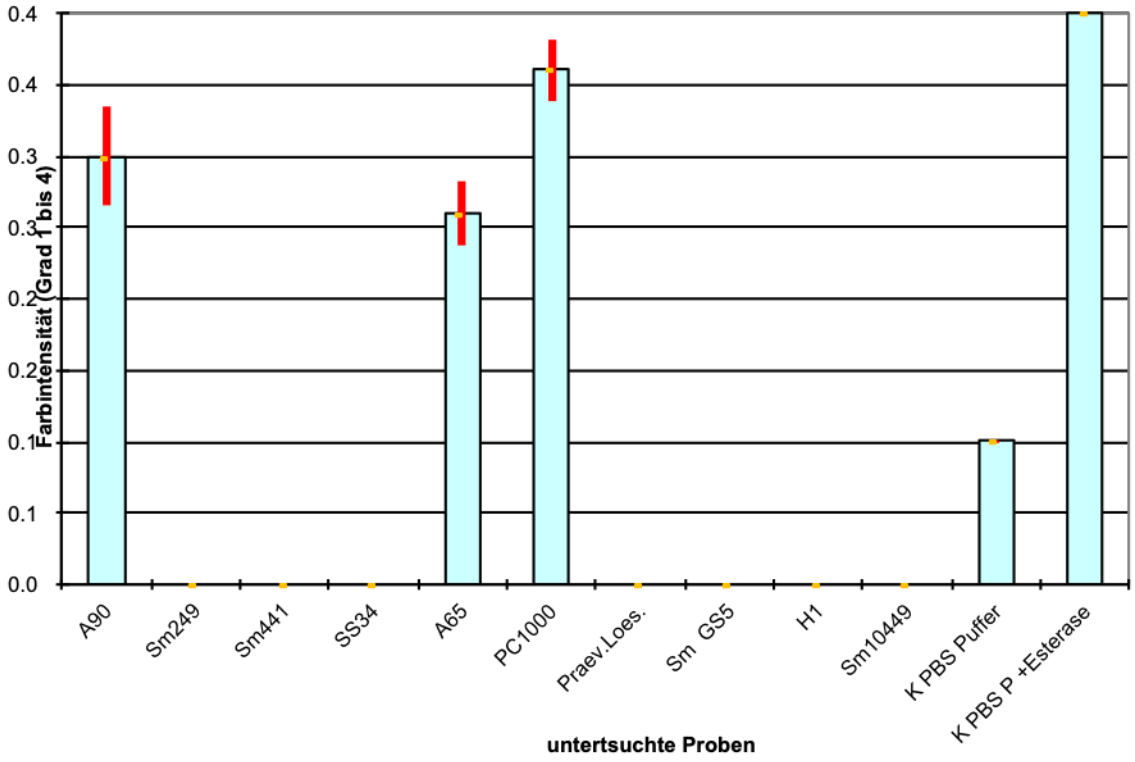


Abb. 5.5: Mittelwerte der Farbintensitäten der untersuchten Proben mit Standardabweichung- im Vergleich zur negativen und positiven Kontrolle

Das Ergebnis des visuellen Enzymtests kann wie folgt zusammengefasst werden: Aus dem Pool von Mikroorganismen (Kap.4.1.1), deren Zusammenhang mit Parodontitis belegt ist, konnten mindestens drei Bakterien ausgewählt werden, die einen deutlichen Hinweis auf eine Esteraseaktivität lieferten. Ihre Esterasen waren sowohl gegenüber p-Nitrophenylester als auch gegenüber alpha-Naphthylester aktiv und zeigten bei allen Messungen einen sehr deutlichen Abstand zur negativen Kontrolle des K PBS Puffers.
Dieser erste Nachweis einer Esteraseaktivität von Mundhöhlenbakterien wird im folgenden Versuchsschritt weiter vertieft.

5.1.2 Nachweis durch Gelelektrophorese

Abb. 5.6 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese zur Untersuchung der Esteraseaktivität von A 65, A 90 und PC 1000. Die Esterasebanden aller drei Bakterienstämme konnten eindeutig angefärbt werden. Die Reaktion mit dem Farbstoff beweist das Vorliegen einer Esterase. Als positive Kontrolle diente die Schweineleber-Esterase. Es fällt auf, dass die Esterasebanden von

A 65, A 90 und der Schweineleber sich deutlich zur Anode hinbewegt haben, während die von PC 1000 „sitzen geblieben“ sind.

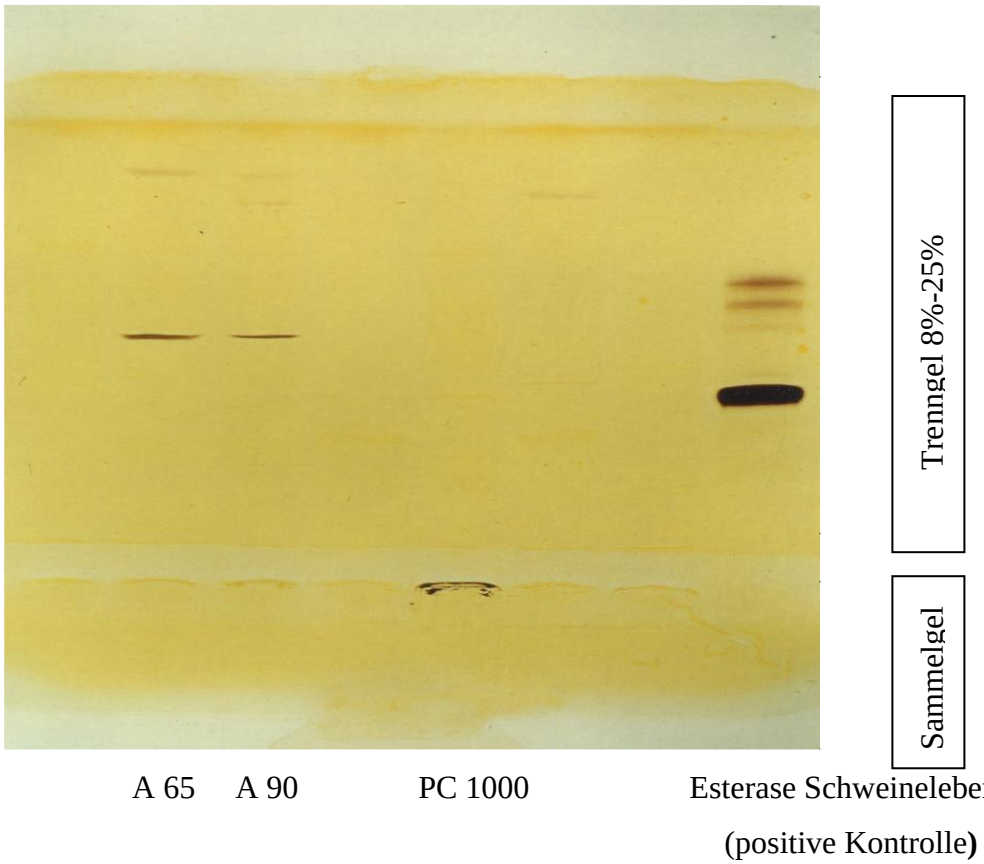


Abb. 5.6: Gelelektrophorese mit angefärbten Estertasebanden von A 65, A 90, PC 1000 und der Schweineleber

5.2 Degradation der Versuchsmembranen und der Vicryl®- Netze durch Hydrolyse und unter dem zusätzlichen Einfluss von Bakterien

5.2.1 Selbst hergestellte Versuchsmembranen

Die Ergebnisse der visuellen Auswertung der Degradation der Versuchsmembranen sind der Tab. 5.1 zu entnehmen. Die Folien unter bakterieller Belastung zeigten ein anderes Degradationsverhalten als die Kontrolle ohne bakterielle Belastung. Zur Auswertung wurden die in Kap. 4.3.8 eingeführten Kriterien herangezogen, also bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit: glatt, rau, aufgequollen, zerfasert, blätterteigartig, porös und bezüglich der Festigkeit: glasartig, hart, fest, elastisch, gummiartig, weich.

Tab. 5.1: Ergebnisse der visuellen Auswertung an den selbst hergestellten Versuchsmembranen

Tage	7	14	18	25	35
PC 1000	**BW leicht** N/T:glatt; hart, bedingt flexibel (Bruch nach Überschreiten der Elastizitätsgrenze); Folien sind getrübt	wenig ver-ändert	**BW: stärker als bei 7** N/T: hart, glasartiges Brechen (kein Biegen mehr möglich); Trübung stärker; Entnahme der Folien schwierig	**BW: stark** N: aufgequollen; zähelastisch bis gummiartig, nur durch Zug entnehmbar, Abreißgefahr. T: hart, brüchig	N: weich, blätterteigartig; ohne Kraft abnehmbar T: brüchig, blätterteigartige Struktur **BW: dicht besiedelt**
A 90	“	“	“	“ **aber BW: stärker als bei PC 1000**	**“**
A 65	“	“	“	“ **aber BW: stärker als bei A 90**	“ Ganz porös, am dichtesten besiedelt
Kontrolle	Folien auch ohne Bakterien-Suspension getrübt	“	Trübung stärker; noch fest, lässt sich gut vom Haken lösen	N: ein wenig weicher als bei der letzten Entnahme, aber noch fest; Folie lässt sich ganz leicht vom Haken lösen	Bruchstücke weil sehr dünn; N/T: fest, nicht brüchig

BW = Bakterienwachstum; N = nass /T = trocken

Der Tab. 5.2 sind die prozentualen Gewichtsverluste zu entnehmen, die die Versuchsmembranen unter dem Einfluss nur der Hydrolyse und mit zusätzlicher Belastung durch die Bakterien erfahren haben. Die Werte wurden nach 7, 14, 19, 25 und 35 Tagen durch Wägung ermittelt. Da die erste Messung vor der Sterilisation der Folien erfolgen musste, war zuerst eine Korrektur für den Einfluss der Sterilisation auf das Gewicht vorzunehmen. Aus 10 Wiegeversuchen, die am Ende der Tab. 5.2 aufgelistet sind, wurde ein Korrekturfaktor von 0,87843 ermittelt. Mit Hilfe dieses Faktors erhält man aus den Foliengewichten zu Beginn des Versuchs die berichtigten Werte in Spalte 3. Um Messfehler auszuschließen, wurde das Foliengewicht nach der Entnahme als Mittelwert aus zwei Messungen bestimmt (Spalte 6). Die Differenz zwischen Spalte 6 und Spalte 3 ergibt die Gewichtsdifferenz zwischen Ende und Anfang des Versuchs, wobei die Sterilisationskorrektur berücksichtigt ist. In der letzten Spalte der Tabelle ist die prozentuale Gewichtsdifferenz angegeben.

Tab. 5.2: Ermittlung des prozentualen Gewichtsverlustes der Versuchsfolien

Degradation der 50:50 Poly Folie (sterilisiert) im wiederholten Batch							
1. Entnahme nach 7 Tagen							
						Gew. Differenz	Gew. Differenz
	Foliengew. vorher /mg/		Foliengew. nachher /mg/			(nachher-vorher)	%
	gemessener W.	berichtigter W.	Messg. 1	Messg. 2	Mittelw.	mit Steril.Korr.	mit Steril.Korr.
Kontrollvers. ohne Bakterien	0,15300	0,13440	0,13224	0,13196	0,13210	-0,00230	-1,71
PC 1000	0,13004	0,11423	0,11102	0,11090	0,11096	-0,00327	-2,86
A 90	0,10816	0,09501	0,09221	0,09007	0,09114	-0,00387	-4,07
A 65	0,17904	0,15727	0,15406	0,15402	0,15404	-0,00323	-2,06
2. Entnahme nach 14 Tagen							
	Foliengew. vorher /mg/		Foliengew. nachher /mg/				
	gemessener W.	berichtigter W.	Messg. 1	Messg. 2	Mittelw.		
Kontrollvers. ohne Bakterien	0,21349	0,18754	0,18114	0,18113	0,18114	-0,00640	-3,41
PC 1000	0,21613	0,18986	0,17917	0,17909	0,17913	-0,01073	-5,65
A 90	0,22333	0,19618	0,18934	0,18935	0,18935	-0,00683	-3,48
A 65	0,25275	0,22202	0,21524	0,21525	0,21525	-0,00678	-3,05
3. Entnahme nach 19 Tagen							
	Foliengew. vorher /mg/		Foliengew. nachher /mg/				
	gemessener W.	berichtigter W.	Messg. 1	Messg. 2	Mittelw.		

Kontrollvers. ohne Bakterien	0,12656	0,11117	0,11224	0,11166	0,11195	0,00078	0,70
PC 1000	0,18848	0,16557	0,16320	0,16259	0,16290	-0,00267	-1,61
A 90	0,22824	0,20049	0,19301	0,19251	0,19276	-0,00773	-3,86
A 65	0,21128	0,18559	0,17959	0,17862	0,17911	-0,00649	-3,50
4. Entnahme nach 25 Tagen							
	Foliengew. vorher /mg/		Foliengew. nachher /mg/				
	gemessener W.	berichtigter W.	Messg. 1	Messg. 2	Mittelw.		
Kontrollvers. ohne Bakterien	0,19562	0,17184	0,11916	0,11788	0,11852	-0,05332	-31,03
PC 1000	0,19634	0,17247	0,11459	0,11321	0,11390	-0,05857	-33,96
A 90	0,18001	0,15813	0,09305	0,09403	0,09354	-0,06459	-40,84
A 65	0,18118	0,15915	0,10468	0,10317	0,10393	-0,05523	-34,70
5. Entnahme nach 35 Tagen							
	Foliengew. vorher /mg/		Foliengew. nachher /mg/				
	gemessener W.	berichtigter W.	Messg. 1	Messg. 2	Mittelw.		
Kontrollvers. ohne Bakterien	0,21271	0,18685	0,02745	0,02699	0,02722	-0,15963	-85,43
PC 1000	0,20209	0,17752	0,02021	0,01828	0,01925	-0,15828	-89,16
A 90	0,19159	0,16830	0,02327	0,02326	0,02327	-0,14503	-86,18
A 65	0,20677	0,18163	0,02282	0,02199	0,02241	-0,15923	-87,66
Einfluss der Sterilisation auf das Gewicht							
Wiegeversuch	vor Sterilisation	nach Sterilis.	Gew. Verh.(nach/vor)				
1	0,11361	0,09903	0,87167				
2	0,09860	0,08557	0,86785				
3	0,15861	0,13954	0,87977				
4	0,16137	0,14125	0,87532				
(5)	0,16652	0,12960	0,77828	)			
6	0,16475	0,14421	0,87533				
7	0,21314	0,18851	0,88444				
8	0,16146	0,14359	0,88932				
9	0,11242	0,09924	0,88276				
10	0,13030	0,11459	0,87943				
Mittelw. aus 9 Messwerten	**0,15191**	**0,13179**	**0,86806**				
Wert 5 wegen offensichtlichen Fehlers verworfen							

In Abb. 5.7 werden die Gewichtsabnahmen von vier Versuchsreihen miteinander verglichen und in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt. Es handelt sich um den Kontrollversuch ohne Bakterien (Reihe 1) sowie Untersuchungen zur Foliendegradation bei Einwirkung der drei ausgewählten Bakterienstämme (Reihen 2 bis 4). Während der ersten 20 Tage wurde in allen Fällen nur eine vernachlässigbare Gewichtsabnahme beobachtet. Diese nimmt aber ab dem 20. Tag rasch zu und führt nach 35 Tagen zu einer fast vollständigen Auflösung der Versuchsfolien.

Statistisch signifikante Unterschiede in der Gewichtsabnahme zwischen den Fällen mit und ohne Bakterien konnten nicht beobachtet werden.

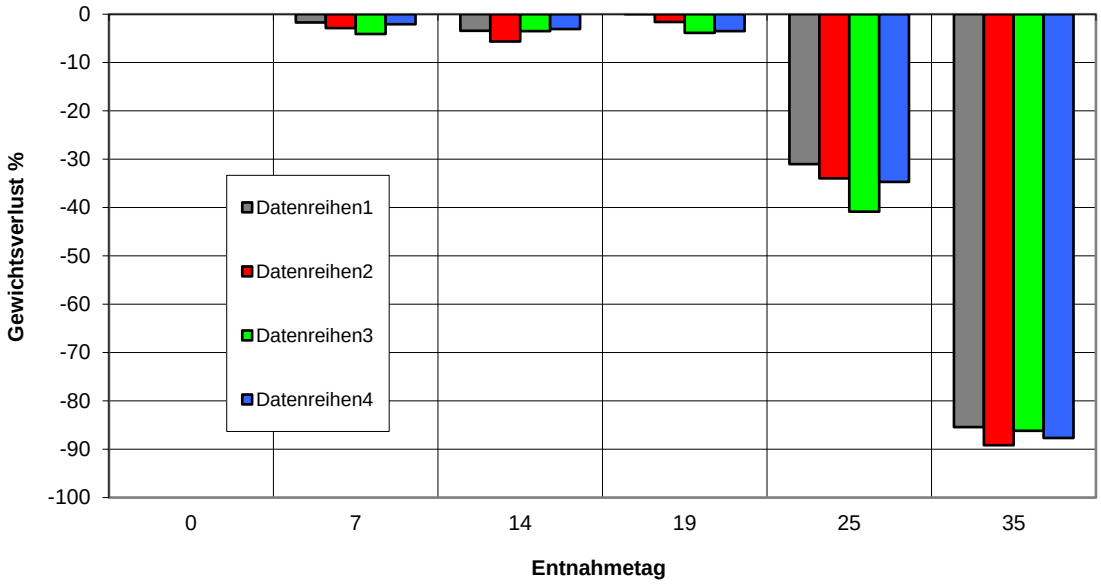


Abb. 5.7: Prozentuale Gewichtsabnahme der Versuchsfolien aller vier Versuchsreihen
Reihe 1 = Kontrollversuch ohne Bakterien
Reihe 2 = mit PC 1000
Reihe 3 = mit A 90
Reihe 4 = mit A 65

5.2.2 Industriell gefertigte Versuchsmembranen (Netze)

In Abb. 5.8 sind Bilder der Vicryl®-Netze zu sehen. Diese zeigen den Zustand bei der ersten Entnahme nach drei Wochen. Das Bild links bezieht sich auf die Kontrolle ohne bakterielle Belastung. Auf den nach rechts folgenden Bildern ist in dieser Reihenfolge der Einfluss von PC 1000, A 90 und A 65 zu erkennen. Der Bakterienbefall ist in allen Fällen mit Bakterien sichtbar, aber von unterschiedlicher Stärke. Die Trübung ist bei PC 1000 am geringsten und bei A 65 am stärksten. Alle Folien sind nach drei Wochen in ihrer Festigkeit schon stark geschwächt, was auf den Fotografien nur schwer zu erkennen ist. In Abb. 5.9 ist zum Vergleich ein Vicryl®-Netz in seinem Zustand vor dem Versuch zu sehen.
Aus den in Kap. 4.3.1 ausgeführten Gründen konnten an diesem Material keine Gewichtsabnahmen gemessen werden.

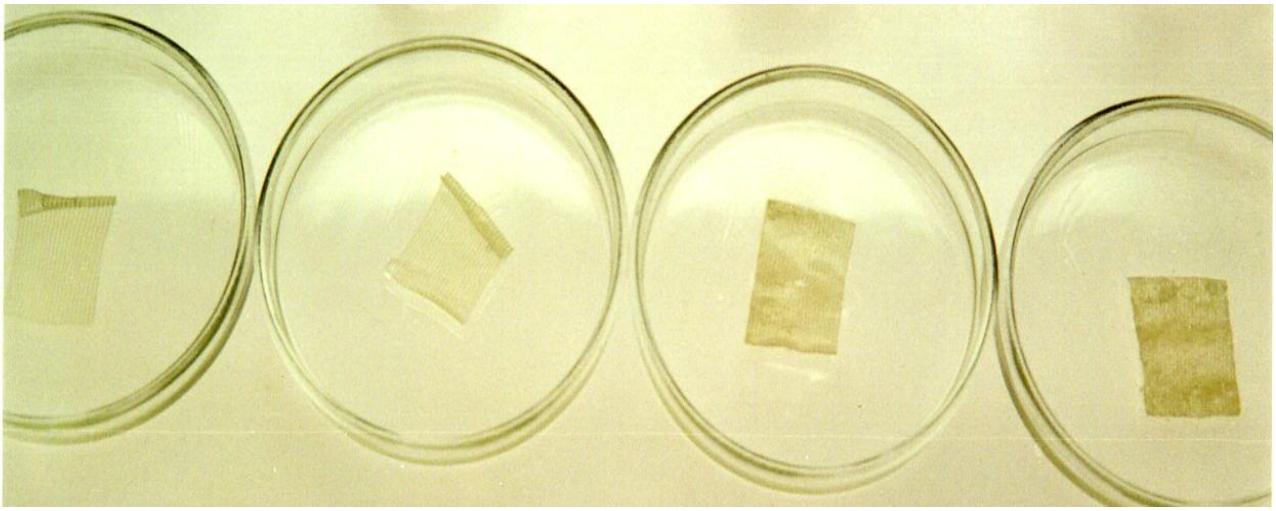


Abb. 5.8: Vicryl®-Netze bei der Entnahme nach drei Wochen. Von links nach rechts sind die Fälle dargestellt: ohne Bakterien, mit PC 1000, mit A 90, mit A 65.

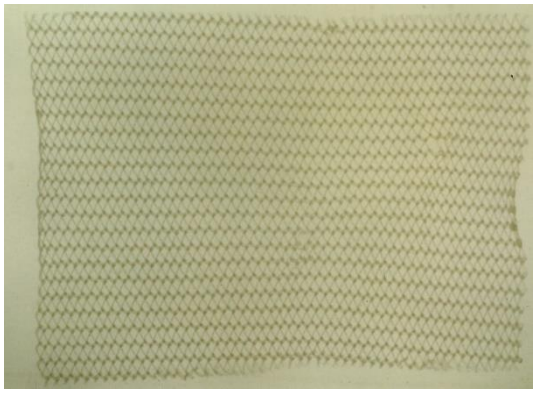


Abb. 5.9: Vicryl®-Netz vor dem Einsetzen (klare Netzstruktur und hohe Festigkeit)

5.3 Veränderung der Oberflächen der selbst hergestellten Versuchsfolien während der Degradation (REM-Aufnahmen)

Anhand exemplarisch ausgewählter REM-Bilder sollen aus der Gesamtdokumentation über die Degradation der Versuchsfolien typische mikromorphologische Veränderungen dargestellt werden.

5.3.1 Versuchsfolien neu, steril

Auf Abb. 5.10 erkennt man eine weitgehend homogene Oberfläche ohne Ablagerungen. Die rechte Bildhälfte ist eine Ausschnittsvergrößerung

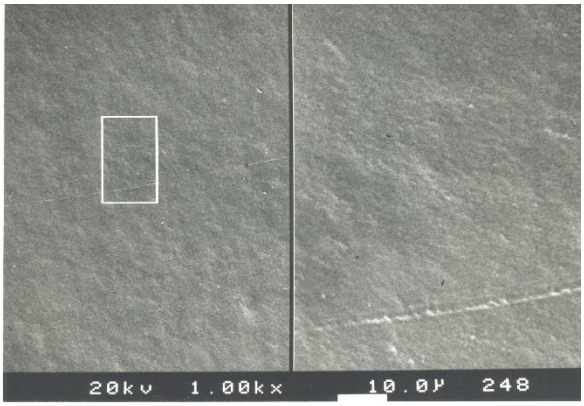


Abb. 5.10: Versuchsfolie neu, steril

5.3.2 Versuchsfolien während der Degradation

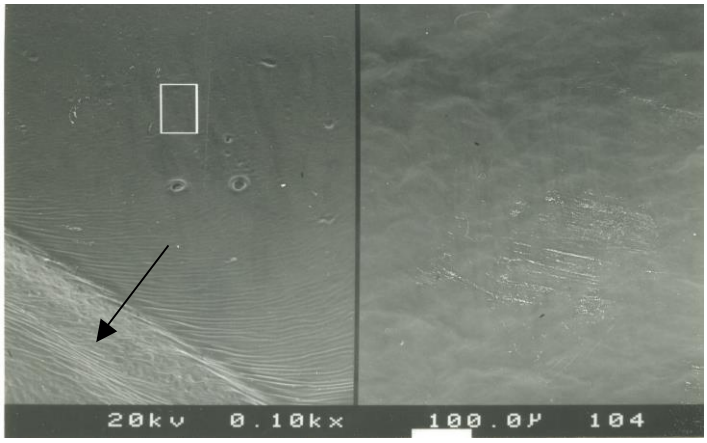


Abb. 5.11a: Kontrollfolie ohne Bakterien nach 7 Tagen

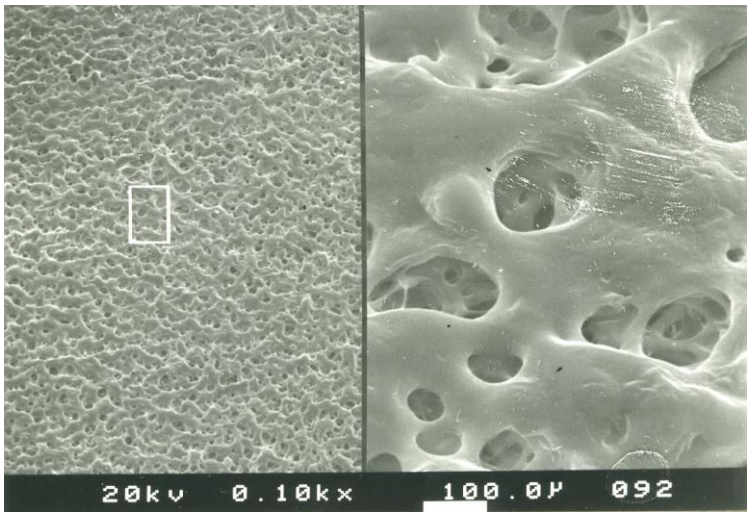


Abb. 5.11b: Kontrollfolie ohne Bakterien nach 18 Tagen

Die Oberfläche ist auf Abb. 5.11a noch überwiegend glatt, auch in der stärkeren Vergrößerung. Aber auf dem linken Bild deutet sich eine großflächige Veränderung an (Pfeil). Dies könnte ein Hinweis sein auf die beginnende Hydrolyse. Das legt jedenfalls das Aussehen der Kontrollfolie bei ihrer Entnahme nach 18 Tagen nahe, wo ein fortgeschrittener Hydrolysezustand ohne Bakterien zu erkennen ist (Abb. 5.11b).

Auf Abb. 5.12 ist die Anlagerung der Bakterien deutlich zu erkennen (Pfeil). Es handelt sich hier um den Bakterienstamm A 65 und eine Entnahme nach 7 Tagen. Im Vergleich zu Abb. 5.11a erscheint die Oberfläche deutlich aufgeraut, gleichsam als hätten sich die Bakterien eingegraben.

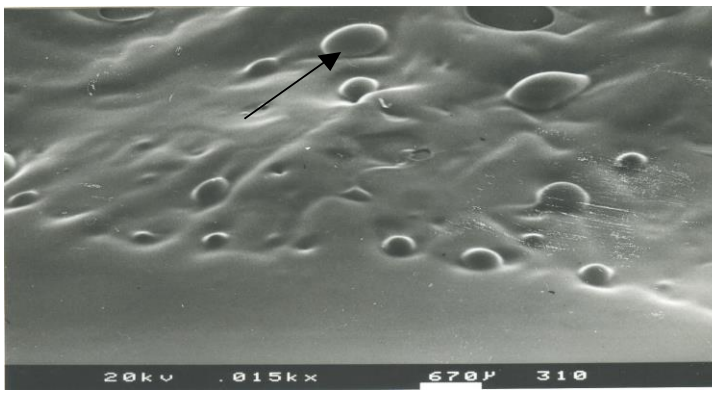


Abb. 5.12: Versuchsfolie mit A 65 beimpft nach 7 Tagen

Die Abb. 5.13 zeigt die gleiche Situation wie Abb. 5.12, aber mit einer Anlagerung des Bakterienstammes A 90. Auf dem vergrößerten Bildausschnitt erkennt man, dass die Bakterien in diesem Fall eine „zigarrenförmige“ Form haben.

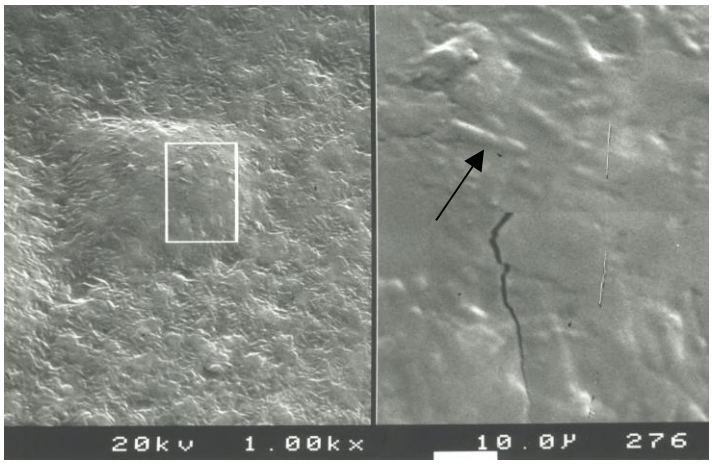
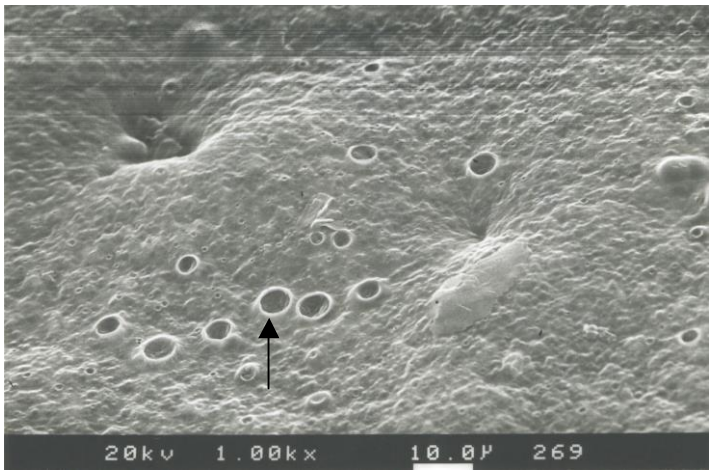


Abb. 5.13: Versuchsfolie mit A 90 beimpft nach 7 Tagen

Auch das Bakterium PC 1000 in Abb. 5.14 führt bereits nach 7 Tagen zu deutlichen Veränderungen der Oberflächenstruktur. Im Unterschied zur Kontrolle (Abb. 5.11) ist eine leichte Oberflächenporösität zu erkennen. Besonders auffallend ist auf dem oberen Bild die Ausbildung von Lakunen (Pfeil). Das untere Bild zeigt eine Ausschnittsvergrößerung der besonders ausgeprägten Einsenkung, die im Viertel links oben der vorhergehenden Abbildung zu erkennen ist.



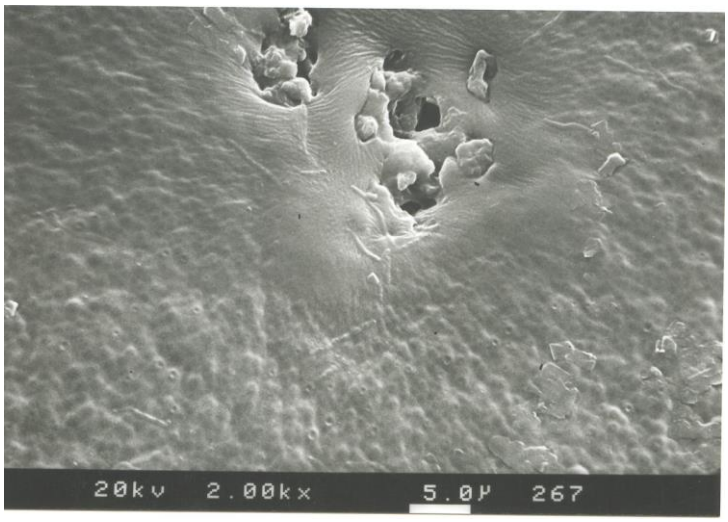


Abb. 5.14: Versuchsfolie mit PC 1000 geimpft nach 7 Tagen. Der Pfeil deutet auf eine Lakunenbildung hin. Das untere Bild ist eine Ausschnittsvergrößerung.

Auf den folgenden Abbildungen wird der Endzustand im Fall reiner Hydrolyse exemplarisch verglichen mit Aufnahmen vom Endzustand der mit PC 1000 beimpften Folie. Abb. 5.15 zeigt die stark degradierte Kontrollfolie nach 35 Tagen. Es sind deutliche Zeichen der Auflösung durch Hydrolyse zu erkennen.

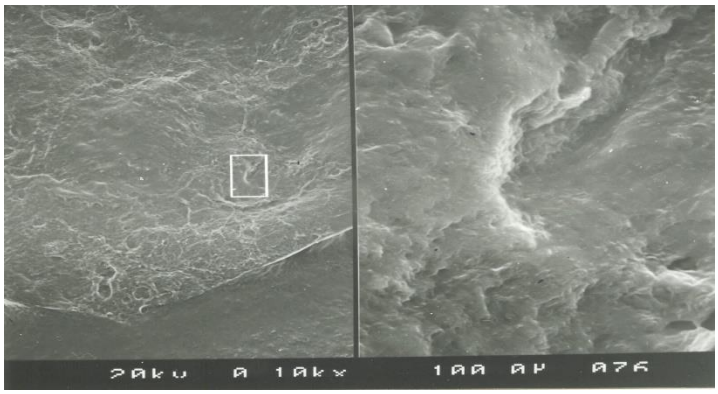


Abb. 5.15: Kontrollfolie ohne Bakterienbeimpfung am Ende ihrer Einsatzzeit nach 35 Tagen mit deutlichen Zeichen der Auflösung durch Hydrolyse.

Abb. 5.16 zeigt als exemplarischen Vergleich Aufnahmen mit verschiedener Vergrößerung von der mit PC 1000 geimpften Versuchsfolie nach 35 Tagen. Auch hier ist eine sich auflösende Struktur zu erkennen. Die nach 4 Tagen typischen Lakunen sind nicht mehr zu sehen. Wenn

man identische Vergrößerungen vergleicht, so sind die mikromorphologischen Unterschiede nicht mehr so charakteristisch verschieden wie nach 7 Tagen.

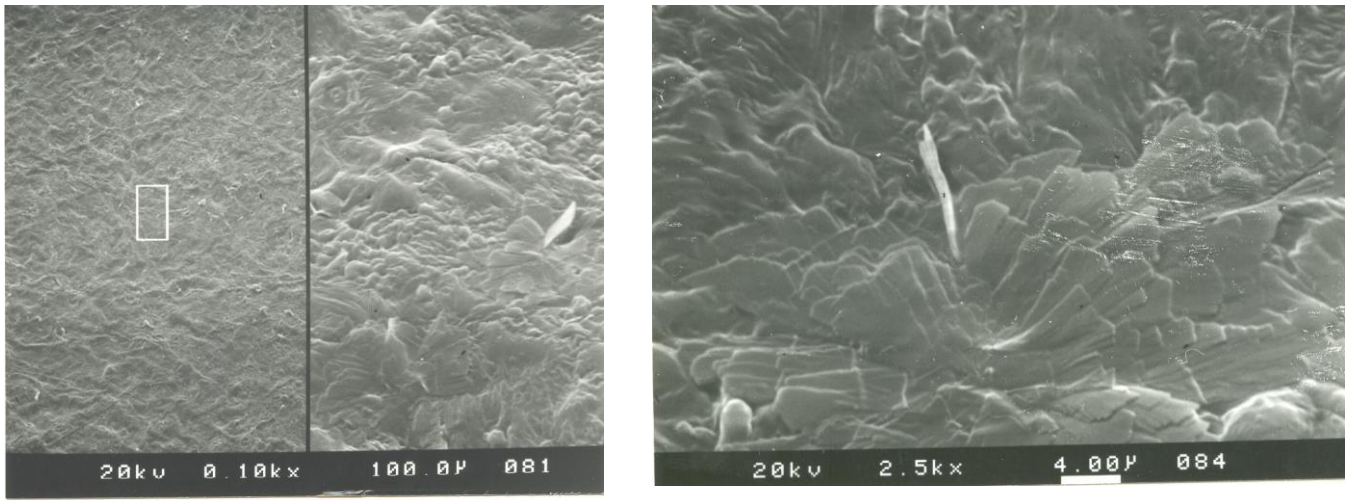


Abb. 5.16: Versuchsfolie mit PC 1000 geimpft nach 35 Tagen mit unterschiedlichen Vergrößerungen. Die beiden ersten Aufnahmen links sind mit denen von Abb. 5.15 zu vergleichen.

6. Diskussion

Dieser Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass die Esterverbindungen in bioresorbierbaren GTR-Membranen vom Poly (D, L) lactid-poly Glycolid Copolymer Typ von Bakterienesterasen gespalten werden können. Das hätte zur Folge, dass die Zeit, während der die Barrierefunktion der GTR-Membran wirksam sein muss, durch die Einwirkung von Bakterien mit Esteraseaktivität verkürzt wird.

Es sind bisher keine Nachweise bekannt, dass bakterielle Esterasen die Spaltung des Polyesters Lactid-Glycolid in GTR-Membranen katalysieren. Wohl aber gibt es Untersuchungen dieser Art auf anderen, wenn auch entfernten Gebieten. So wurde von Kleeberg (1999) im Zusammenhang mit dem biologischen Abbau aliphatisch-aromatischer Copolyester durch Kompostierung ein polyesterspaltendes Enzym isoliert und charakterisiert. Dabei zeigte eine Gruppe der Actinomyceten besonders auffällige Hydrolyseergebnisse. Bakterien aus der Gruppe der Aktinomyceten sind auch im Zusammenhang mit Parodontitis aktiv. Sie gehören zu den fakultativ bis obligat anaerobe, grampositive, sporenlose Stäbchenbakterien und bilden nach Schaal (1992) eine ausgesprochen heterogene Mikrobengruppe.

Umfangreiche Untersuchungen über Esteraseaktivitäten von Bakterien wurden auch in der Lebensmittelchemie, vor allem im Zusammenhang mit der Käseherstellung durchgeführt. (Morichi et al. (1968); El-Soda et al. (1993); Harper et al. (1969)).

6.1 Methoden-Diskussion

Der in dieser Arbeit geführte Nachweis von Esteraseaktivitäten bei mehreren Bakterien, die im Zusammenhang mit Parodontitis gesehen werden, ist also nicht überraschend. Ihre Esterasen waren sowohl gegenüber p-Nitrophenylester als auch gegenüber alpha-Naphthylester aktiv und zeigten bei allen Messungen einen sehr deutlichen Abstand zur negativen Kontrolle des K PBS Puffers. Zu dem Esterasenachweis durch Gelelektrophorese muss kritisch bemerkt werden, dass zwar bei allen drei untersuchten Bakterienstämmen Esterasebanden eindeutig angefärbt werden konnten, eine quantitative Erfassung dieser Enzyme aber außerhalb der Möglichkeiten dieser Arbeit lag. Eine solche war für die Fragestellung auch nicht notwendig. Die identische Reaktion mit dem Farbstoff sowohl bei den Bakterienesterasen als auch bei der Schweineleberesterase

ist ein deutlicher Beweis für das Vorliegen einer Esterase. Die unterschiedlichen Positionen der Banden in Abb. 5.6. dürften von den unterschiedlichen Molekulargewichten herrühren. Das Verharren der Bande von PC1000 im Sammelgel legt die Vermutung nahe, dass es sich hier um membrangebundene Enzyme handelt.

Die Degradation der selbst hergestellten Versuchsmembranen wurde unter dem Einfluss von drei verschiedenen Bakterien und ohne Bakterien über eine Zeitdauer von 35 Tagen verfolgt. In allen Fällen zeigten sich während der ersten zwei Wochen relativ kleine Veränderungen. Mit und ohne Bakterien erschienen die Folien nach 7 Tagen getrübt, was aber auf das mechanische Verhalten noch keine großen Auswirkungen hatte. Ab dem 18. Tag war eine verstärkte Bakterienbesiedlung erkennbar, die bis zum Versuchsende noch weiter zunahm. Es deuteten sich erste Unterschiede im mechanischen Verhalten zwischen den Fällen mit und ohne Bakterien an. Unter dem Einfluss der Bakterien schienen die Folien zuerst ihre ursprüngliche Flexibilität zu verlieren. Sie ließen sich nicht mehr biegen, sondern brachen glasartig. Es zeigten sich aber noch keine auffälligen Unterschiede zwischen dem nassen und trockenen Zustand. Dies änderte sich ab dem 25. Tag. Hier wirkten die Folien im nassen Zustand aufgequollen und gummiartig, wurden aber im trockenen Zustand wieder hart und brüchig. Bis zum Versuchsende nach 35 Tagen verstärkten sich diese Eigenschaften noch und die Struktur der Folien erschien am Ende des Versuchs „blätterteigartig“. Im Kontrollversuch ohne Bakterien fiel ebenfalls ein deutlicher Abbau auf: Die Folien waren am Ende sehr dünn und fragil, aber Veränderungen im mechanischen Verhalten waren weniger stark ausgeprägt.

Bei der Bestimmung der Gewichtsabnahme (siehe Abb. 5.7.) zeigte sich ein ähnliches Verhalten: kaum eine Gewichtsreduktion während der ersten 19 Tage und danach ein sehr schneller Abbau bis auf ca. 15% des ursprünglichen Gewichts am Versuchsende. Es war auffallend und bemerkenswert, dass hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Fällen mit und ohne Bakterienbelastung bestand.

Versuche mit industriell gefertigten Vicryl®-Netzen, die parallel dazu durchgeführt wurden, aber wegen Schwierigkeiten mit der Festigkeit und mechanischen Handhabung nicht quantitativ ausgewertet werden konnten, widersprachen bei ihrer qualitativen Auswertung den oben genannten Ergebnissen nicht.

Vergleicht man die Befunde mit der bekannten Literatur über die Degradation von Vicryl®, so ist an erster Stelle Kronenthal (1975) zu erwähnen. Nach ihm vollzieht sich der Abbau bioresorbierbarer Polyester im biologischen Milieu in vier Teilschritten: Zuerst findet Hydratation statt, wobei es durch Eindiffundieren von Wassermolekülen zum Auflösen sekundärer (van der Waalsscher Bindungen) und tertiärer Verbindungen (Wasserstoffbrückenbindungen) kommt (Phase der Hydratation). In einem zweiten Schritt werden die kovalenten Bindungen im Grundgerüst zu Oligomeren hydrolytisch gespalten. Die Folge des dadurch bedingten Molekulargewichtsabbaus ist der Verlust der Zähigkeit und Festigkeit (Phase der Hydratation und Degradation: Festigkeitsverlust).
Die Spaltung der Oligomere setzt sich weiter fort, bis das Molekulargewichtsniveau für einen Form- und Massenzusammenhalt nicht mehr ausreicht. Das Material wird zu einer gelatineartigen, bröckeligen Substanz. Ab diesem Zeitpunkt kann die Phagozytose von kleinen Partikeln durch Makrophagen erfolgen (Phase der Degradation: Form- und Masseverlust). Diese Beschreibung des Ablaufs der Degradation ist in sehr guter Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen und Messergebnissen.

Die so weit gegebene Auswertung enthält einen Widerspruch: Im Gesamtablauf wurde die Degradation durch die Bakterien nicht entscheidend geändert, aber es waren doch die visuellen Befunde und das mechanische Verhalten der Proben mit und ohne bakterielle Belastung verschieden.

Um das aufzuklären, wurden die Veränderungen der Oberflächen der Versuchsfolien während der Degradation mit dem REM untersucht. Dabei zeigten die drei Bakterienstämme bei ihrer Anlagerung an die Folien sehr auffallende, aber höchst unterschiedliche Zerstörungen auf der Folienoberfläche. Diese breiteten sich an der Oberfläche aus und standen in Konkurrenz zur Hydrolyse, die zwar nicht so dramatisch einsetzte, aber wahrscheinlich schneller in die Tiefe fortschritt. Diese Vermutung legt jedenfalls das Aussehen der Folien gegen Ende des Versuchs nahe. Hier bestanden immer noch Unterschiede zwischen den einzelnen Fällen, aber diese waren nicht mehr so markant wie nach dem ersten Viertel der Einsatzzeit. Das kann so gedeutet werden, dass die Bakterieneinflüsse mit der Zeit durch den stärkeren Hydrolyseeinfluss überlagert wurden. Diese Deutung wird auch durch eine Untersuchung von Grizzi et al. (1995) über die hydrolytische Degradation von 50:50 (D, L) lactid-glycolid-Membranen gestützt. Sie haben durch transversale Schnitte durch solche Membranen festgestellt, dass diese über den Querschnitt nicht homogen aufgebaut sind, sondern gewissermaßen eine Haut bilden. Die Haut

und das Innere zeigen ein unterschiedliches Hydrolyseverhalten, was sich z.B. darin äußert, dass der zeitliche Verlauf des relativen Gewichtsverlustes von Platten und dünnen Filmen aus diesem Material unterschiedlich ist. Man kann sich also vorstellen, dass die Membran innerlich hydrolytisch zerfällt, während die Bakterien in erster Linie die Haut angreifen. Diese Deutung wird auch gestützt durch eine frühere Untersuchung der Hydrolyse von Li et al. (1990), die ebenfalls ein rascheres Fortschreiten der Degradation im Zentrum als an der Oberfläche feststellten. In ihrer dreiteiligen Studie haben sie auch unterschiedliche Zusammensetzungen von lactide-glycolide-Kopolymeren sowie morphologische Einflüsse durch Kristallisation ausgewertet. Die Ergebnisse der Studie von Li wurden unter In-vivo-Bedingungen in Tierversuchen (Therin 1992) überprüft und vergleichbare Ergebnisse gefunden.

Die Frage, ab welchem Stadium der Degradation die Membranen für Bakterien durchlässig werden, wurde von Simion et al. (1997) untersucht. Sie verwendeten Membranen aus Polyglycol und Polylactat (PLA/PGA-Membranen). Mit kleinen Stücken davon unterteilten sie Komposit-Kammern in zwei Teile und setzten sie während einer Zeitspanne von 4 Wochen abnehmbar im Unterkiefer von 5 Studenten ein. Sie wurden nur für die tägliche Mundhygiene herausgenommen. Simion et al. stellten eine bakterielle Kolonisation auf den Innenseiten der Membranen nach 3 Wochen fest.

6.2 Ergebnis-Diskussion

Schlussfolgernd können die Ergebnisse unserer Versuche wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die ausgewählten Bakterien zeigen Esteraseaktivitäten.
2. Diese Bakterien bewirkten bei ihrer Anlagerung an bioresorbierbare GTR-Membranen vom Poly (D, L) lactid-poly Glycolid Copolymer Typ bei Betrachtung mit dem REM auffällige und bakterienspezifische Zerstörungen an der Oberfläche.
3. Bei visueller Betrachtung der Versuchsfolien waren keine signifikanten bakterienspezifischen Unterschiede erkennbar, wohl aber Unterschiede in der mechanischen Handhabbarkeit der Folien im Vergleich zu dem Fall ohne bakterielle Belastung.
4. Eine katalytische Beschleunigung der Degradation durch Bakterienesterasen wurde nicht beobachtet.

Urbani et al. (1997) haben den Effekt des Speichels auf die Resorptionszeit von GTR-Membranen untersucht. Sie fanden, dass nicht der Speichel die Resorptionszeit z.B. von Vicryl®-Membranen verkürzt, sondern Bakterien aus dem Speichel. Dabei handelte es sich aber nicht um eine In-vivo-Studie, sondern um eine Studie mit In-vitro-Bedingungen, die den unseren extrem entgegengesetzt waren. Statt wie wir einzelne Bakterienstämme unter einheitlichen Bedingungen auf die Membranen einwirken zu lassen, haben sie Sputum in Nährlösung gegeben und die Membranen darin ausgesetzt. Zum Vergleich wurde der Versuch mit abgetöteten Bakterien wiederholt. Es ergaben sich sehr deutliche Unterschiede in der Degradationszeit, woraus auf einen Einfluss der Bakterien geschlossen wurde. Möglicherweise gibt es also Bakterien und Enzyme von Bakterien, die einen schnellere Degradation der Membranen bewirken. Der Versuch legt nahe, dass solche Bakterien auch im Mundraum vorkommen.

Wie oben gesagt, kann eine abschließende Bewertung der Ergebnisse nur unter Heranziehung von In-vivo-Studien erfolgen, da die Verhältnisse im Mundraum in vivo weder unseren Versuchsbedingungen noch denen von Urbani et al. entsprechen.

In In-vivo-Studien ist die Notwendigkeit und der Nutzen einer adjunktiven medikamentösen Therapie mit Antibiotika strittig (Minabe et al. (2001); Chang und Yamada (2000)). Insbesondere bei Langzeitfallstudien wie der von Gaßmann et al. (2004) wurde aber auf eine Antibiotikatherapie erfolgreich verzichtet. Das bedeutet, dass das Immunsystem des Patienten in Verbindung mit gründlicher Mundhygiene ausreicht, ein unkontrolliertes Überhandnehmen schädlicher Bakterien zu verhindern. Verhältnisse wie in dem Versuch von Urbani et al. können daher nach einer GTR-Maßnahme ausgeschlossen werden oder werden im Rahmen der Nachversorgung rechtzeitig erkannt und verhindert. Wir haben unsere Untersuchung auf wenige Bakterienstämme beschränkt, deren Zusammenhang mit Parodontitis belegt ist und die eine Esteraseaktivität gezeigt haben. Es ist davon auszugehen, dass schon ein kurzzeitiges Überhandnehmen dieser Bakterien den Heilungsprozess besonders schädigen würde. Wenn damit auch noch eine schnelle, katalytisch ablaufende Resorption der GTR-Membran verbunden wäre, so wäre der Schaden für die Heilung noch schwerer beherrschbar. Die Bedeutung des Versuchsergebnisses liegt darin, dass eine katalytisch beschleunigte Degradation durch Bakterienesterasen ausgeschlossen werden konnte.

Ganz klar ist eine In-vitro-Untersuchung nicht komplett mit den Ereignissen in der Mundhöhle vergleichbar. Jedoch ist es ein interessanter Ansatz für neue Überlegungen in der zukünftigen Erforschung von resorbierbaren Membranen bei einer Exposition. Da es im Mundraum über 500 verschiedene Bakterienarten gibt, ist es sicherlich nicht von der Hand zu weisen, dass diese einen Einfluss auf resorbierbare Materialien in chirurgischen Techniken haben.

7. Zusammenfassung

7.1. Deutschsprachige Zusammenfassung

Polylactidemembranen werden in der Parodontalchirurgie zur Regeneration entzündlich verlorengegangener Parodonts eingesetzt. Ziel der Arbeit war es, in vitro zu untersuchen, inwieweit Esterase-aktive Keime, die im Zusammenhang mit Parodontitis gefunden werden, in der Lage sind, Einfluss auf die Degradation und damit Standfestigkeit der Membranen zu nehmen. Es wurde die Degradation von selbstgefertigten Folien aus 50:50 (D, L) lactid-glycolid unter anaeroben Bedingungen mit und ohne Bakterienbelastung verglichen und visuell, palpatorisch, durch Wiegung und mit dem REM mikromorphologisch ausgewertet.

Bei visueller und palpatorischer Betrachtung waren während des fünf Wochen dauernden Versuchs Unterschiede in der mechanischen Handhabbarkeit der Folien im Vergleich der Fälle ohne und mit Bakterienbelastung auffällig. Der prozentuale Gewichtsabbau, der durch Wiegung ermittelt wurde, ließ aber keine statistisch relevanten Unterschiede weder zwischen den Fällen mit Bakterien noch im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien erkennen, woraus auf einen nur marginalen Einfluss der ausgewählten Bakterien auf die Degradation geschlossen werden muss. Die Gewichtsabnahme verharrte mit und ohne Bakterien während der ersten 20 Tage im einstelligen Prozentbereich, stieg dann aber steil an und erreichte nach 35 Tagen Werte um 85%. Die Betrachtung der Folienoberfläche mit dem REM wiederum zeigte sehr markante und auch zwischen den Bakterien unterschiedliche Veränderungen schon nach den ersten 7 Tagen, die sich aber am Versuchsende nach 35 Tagen nicht mehr so auffällig von der Kontrolle ohne Bakterien unterschieden. Dies wird so gedeutet, dass die selbst hergestellten Folien über ihren transversalen Querschnitt nicht homogen waren, so dass sie innerlich hydrolytisch zerfielen, während die Bakterien in erster Linie die hautartige Oberfläche angriffen. An den Vicryl®-Membranen konnte nur ein kleiner Teil dieser Auswertungen durchgeführt werden. Es zeigten sich keine Widersprüche in den Ergebnissen.

Die Bedeutung des Versuchsergebnisses liegt darin, dass eine katalytisch beschleunigte Degradation von Polylactidemembranen durch Bakterienesterasen ausgeschlossen werden konnte. Ein Bakterienbefall kann gleichwohl die mechanischen Eigenschaften und damit die Standfestigkeit einer Membran verändern. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von In-vivo-Langzeitstudien, die gezeigt haben, dass der chirurgische Eingriff nur in Verbindung mit regelmäßigen Nachuntersuchungen und gewissenhafter Zahnpflege zu einem dauerhaften Heilerfolg führt.

7.2 Englischsprachige Zusammenfassung

Polylactide membranes are used in periodontal surgery for the regeneration of inflammatory lost periodonts. The aim of the work was to investigate in vitro to what extent esterase-active germs found in connection with periodontitis are able to influence the degradation and thus the stability of the membranes. Degradation of self-made 50:50 (D, L) lactide-glycolid films under anaerobic conditions with and without bacterial exposure was compared and micromorphologically, visually, palpatorically, by weighing and with the REM.

Visually and palpatorically, differences in the mechanical handling of the foils were noticeable during the five-week experiment compared to cases without and with bacterial contamination. However, the percentage weight loss obtained by weighing did not reveal any statistically relevant differences between the bacterial cases or compared to the non-bacterial control, which suggests that the selected bacteria have only a marginal influence on degradation. Weight loss remained in the single-digit percentage range with and without bacteria during the first 20 days, but then increased steeply and reached levels of 85% after 35 days. Examination of the film surface with the REM showed very striking and also different changes between the bacteria after the first 7 days, but at the end of the test after 35 days, these changes were no longer so conspicuously different from the control without bacteria. This is interpreted to mean that the self-made films were not homogeneous across their cross-section, so that they decayed internally hydrolytically, while the bacteria primarily attacked the skin-like surface. Only a small proportion of these analyses could be performed on the Vicryl® membranes. There were no contradictions in the results.

The significance of the test result is that a catalytically accelerated degradation of polylactide membranes by bacterial esterases could be excluded. However, a bacterial attack can change the mechanical properties and thus the stability of a membrane. This is in line with the results of long-term in vivo studies, which have shown that the surgical procedure only leads to lasting healing success in combination with regular follow-up examinations and careful dental care.

8. Literaturverzeichnis

Albandar, JM (2002) : Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. Periodontology 2000 29(1): 177-206

Al-Shammari, KF, AK Al-Khabbaz, JM Al-Ansari, R Neiva und H-L Wang (2005) : Risk Indicators for Tooth Loss due to Periodontal Disease. Journal of Periodontology 76(11): 1910-1918

Becher S, Homann V, Shihabi S, Grimm W-D (2005) : Nachweis und Quantifizierung von Parodontitis-assoziierten Sulfat reduzierenden Bakterien (SRB) mittels quantitativer PCR Int Poster J Dent Oral Med 2005; Vol.7 No.04, Poster 295

Boyapati, L und H-L Wang (2007) : The role of stress in periodontal disease and wound healing. Periodontology 2000 44(1): 195-210

Calagione SA, Bouwsma OJ (1992) : Vicryl® : Bioresobable Wound Support Material and Guided Tissue Regeneration
J. Dent. Res. 1992 ; 71 : 221, Abstract Nr. 927

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Tonetti MS, … (2018) : A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. J Periodontol, 89 Suppl 1, S1-S8

Caton J, Nyman S (1980) : Histometric evaluation of periodontal surgery

I. The modified Widman flap procedure. J Clin Periodontol 1980; 7 : 212-223
II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures J Clin Periodontol 1980; 7 :224-231

Caton J, Frantz B, Greenstein G, Polson A, Hoffman P, Zappa U (1990) : Synthetic Biodegradeable Barrier for Regeneration in Human Periodontal Defects
J. Dent. Res. 1990 ; 69 : 275, Abstract Nr. 1335

Caton J, Greenstein G, Zappa U (1994) : Synthetic bioabsorbable barrier for regeneration in human periodontal defects. J Periodontol 1994; 65 : 1037-1045

Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, …, Yoshie H (2018) : Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consens report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseaseas and Conditions. J Clin Periodontol, 45 Suppl 20, 68-77

Chang CY, Yamada S (2000) : Evaluation of a regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration
J Periodontol 2000; 71/7 : 1086-1093

Chen Y-T, Wang H-L, Lopati DE, O´Neal R, Lamont MacNeil R (1997) : Bacterial Adherence to Guided Tissue Regeneration Barrier Membranes Exposed to the Oral Environment
Journal of Periodontology 1997; 68 (2) :172-179

Christgau M, Schmalz G (1995) : Parodontale Regeneration mit resorbierbaren Membranen . Dtsch Zahnärztl z 1995; 50 : 13-24

Cvitkovitch DG, Hamilton IR (1994) : Biochemical change exhibited by oral streptococci resulting from laboratory subculturing
Oral Microbiol Immunol 1994; 9 : 209-217

Deutsche Gesellschaft Parodontologie e.V. (2021) : Die Behandlung von Parodontitis Stadium I-III. Die deutsche Implementierung der S3-Leitlinie „Treatment of Stage I-III Periodontitis“der European Federation of Periodontology (EFP). European Federation of Periodontology (EFP)

Distler W, Marwitz S, Petschelt A (1995) : Adherence of Oral Microorganisms to Guided Tissue Membranes. J. of Dental Research 1995; 74 : 559. Sp.Iss.SI 1995, Abstract No. 1271

DMS III (Dritte deutsche Mundgesundheitsstudie) (1999)
Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, ISBN 3-7691-7848-3 : S. 21-31

DMS IV (Vierte deutsche Mundgesundheitsstudie) (2006)
Kurzfassung. Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ)

Eickholz P, Kim TS, Holle R, Hausmann E (2001) : Long-term results of guided tissue regeneration therapy with nonresorbable and bioabsorbable barriers.
J Periodontol 2001; 72/1 : 35-72

Ellegaard B, Löe H (1971) : New attachment of periodontal tissues after treatment of intrabony lesions. J Periodontol 1971; 42 : 648-652

El-Soda M, Ezzat N (1993) : Peptidase and esterase activities from mutant strains of Lactobacillus casei. (Die) Nahrung 1993; 37 (4) : 321-327

Gaßmann G, Westermann D, Grimm W-D (2004) : Parodontale Regeneration – Eine klinisch kontrollierte 5-Jahres-Split-mouth-Fallstudie. Parodontologie 2004; 15/2 : 135-143

Genco, RJ (1992) : Host Responses in Periodontal Diseases: current Concepts. Journal of Periodontology 63(4s): 338-355

Genco, RJ (1996) : Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases. Journal of Periodontology 67(10s): 1041-1049

Genco, RJ und H Löe (1993) : The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. Periodontology 2000 2(1): 98-116

Gillman Theodore (1961) : Tissue Regeneration. Chapter 10 in „Strctural aspects of aging “ Ed.: Bourne GH; Pitman Medical Publishing Co. Ltd., London, 143-176

Grimm WD, Cichon P, van der Hoeven H, Langendijk PS, Smith F, Worley MG, Schmitz I, Offenbacher S (2000) : The influence of sulfate-reducing bacteria colonisation of 2 different bioresorbable barrier membranes for GTR. An 18-month case-controlled microbiologic and clinical study. Int J Periodontics Restorative Dent. 2000; 20 (1) : 91-99

Grimm WD, Arnold WH, Grimm K, van der Hoeven JS, Shihabi F, Langendijk-Genevaux PS (2004) : Vergleichende In-vitro-Untersuchungen zur Adhäsion von Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) auf verschiedenen resorbierbaren Barriere-Membranen Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 2004; 59 : 626-632

Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M (1995) : Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. Biomaterials 1995; Vol.16 No.4 : 305-311

Harper WJ, Mikolajcik EM, Chen JL (1969) : Esterases of lactic streptococci Journal of dairy science 1969; 52 : p.894 Abstract M72

Hiatt WH, Schallhorn RG, Aaronian AJ (1978) : The induction of new bone and cementum formation. IV. Microscopic examination… J Periodontol 1978; 49 : 495-512

Hutmacher D, Hürzeler MB (1995) : Biologisch abbaubare Polymere und Membranen für die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration. Implantologie 1995; 3 (1) : 21-37

Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J (1985) : New attachment – reattachment following reconstuctive periodontal surgery. J Clin Periodontol 1985; 12 : 728-735

Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, …Yamazaki, K (2018) : Periodontal manifestations of systemic diseases and development and acquired conditions: Consens report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and conditions. J Clin Periodontol, 45 suppl 20, 219-229

Kanev, A (2019) : Screeningeigenschaften eines aMMP-8 Schnelltests zur Identifikation einer Parodontitis bei Patienten mit Diabetes mellitus. Dissertation Marburg

Kleber B-M (2001) : Klassifikation parodontaler Erkrankungen
ZMK 17 : 392-399

Kleeberg I (1999) : Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen Copolyestern sowie Isolierung und Charakterisierung eines polyesterspaltenden Enzyms
Dissertation Braunschweig 1999; 24

Kronenthal RL (1975) : Biodegradable Polymers in Medicine and Surgery.
Polymer Sci Technol 1975; 8 : 119-137

Listgarten MA (1980) : Periodontal probing: What does it mean?
J Clin Periodontol 1980; 7 : 165-176

Li Suming, Garreau H, Vert M (1990) : Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α-hydroxy acids) in aqueous media
J of Materials Science: Materials in Medicine 1990; Vol 1: Part 1: Poly (DL-lactic acid) p.123-130; Part 2. Degradation of lactide-glycolide copolymers (PLA37.5GA25 and PLAGA25) p.131-139; Part 3: Influence of the morphology of poly(L-lactic acid) p. 198-206

Lynch S, Genco R, Marx R (Editors) (1999) : Tissue Engineering
Quintessence Publishing Co, Inc 1999; Part IV: Periodontal Regeneration

Meyle, J und I Chapple (2015) : Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis.
Periodontology 2000 69(1): 7-17

Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R (1993) : Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering
Biomaterials 1993; Vol.14 No 5 : 323-330

Mikos AG, Lyman MD, Freed LE, Langer R (1994) : Wetting of poly (L-lactide acid) and poly (DL-lactid-co-glycolic acid) foams for tissue culture. Biomaterials 1994; 15 No 1 : 55-58

Minabe M, Kodama T, Kogou T, Fushimi H, Sugiyama T, Takeuchi K, Miterei E, Nishikubo S (2001) : Clinical significance of antibiotic therapy in guided tissue regeneration with a resorbable membrane. Periodontal Clin Investig 2001; 23/1 : 20-30

Morichi, Toshiki, Sharpe, Elisabeth M, Reiter B (1968) : Esterases and other soluble proteins of some lactic acid bacteria. Journal of Gen. Microbiology 1968; 53 (3) : 405-414; ISSN: 0022-1287

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J (1982a) : The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol 1982a ; 9 : 257-265

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H (1982b) : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol 1982b ; 9 : 290-296

Ogawa, H, A Yoshihara, T Hirotomi, Y Ando und H Miyazaki (2002) : Risk factors for periodontal disease progression among elderly people. Journal of Clinical Periodontology 29(7): 592-597

Omura S (1992) : The Search for bioactive Compounds from Microorganisms; Springer 1992; ISBN: 3-540-97755-4

Page, RC (1991) : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. Journal of Periodontal Research 26(3): 230-242

Page, RC und KS Kornman (1997) : The pathogenesis of human periodontitis: an introduction Periodontology 2000 14(1): 9-11

Papanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, … Tonetti, MS (2018) : Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol, 45 Suppl 20, 162-170

Patur B, Glickman I (1962) : Clinical and roentgenographic evaluation of the post treatment healing of infrabony pockets. J Periodontol 1962; 33 : 164-171

Quinones CR, Caton JG, Polson AM, Wagener CJ, Mota LF (1990) : Evaluation of a Synthetic Biodegadable Barrier to Facilitate Guided Tissue Regeneration
J. Dent. Res. 1990 ; 69 : 275, Abstract Nr. 1336

Robert P, Mauduit J, Frank RM, Vert M (1993) : Biocompatibility and Resorbability of a polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration
Biomaterials 1993, Vol. 14 No. 5 : 353-358

Rosling B, Nyman S, Lindhe J (1976) : The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. J Clin Periodontal 1976; 3 (1) : 38-53

Schaal, KP (1992) : Fakultativ bis obligat anaerobe, grampositive, sporenlose Stäbchenbakterien. In: Burkhardt, F. (Hrsg.) : Mikrobiologische Diagnostik, Georg Thieme, Stuttgart, S.209-215

Schneider B, Wehrbein H, Meyer R, Diedrich P (1990) : Intrusion von parodontal geschädigten Zähnen in Verbindung mit Polyglactin 910 (Vicryl®)
Dtsch. Zahnärztl. Z. 1990; 45 (3) : 171-175

Schultz AJ, Gager AH (1990) : Gesteuerte Geweberegeneration unter Anwendung einer resorbierbaren Membran (Polyglactin 910) und Knochentransplantation
Int. J. Periodontics Restorative Dent. 1990; 10 (1) : 8-17

Sculean A, Donos N, Miliauskaite A, Arweiler N, Brecx M (2001) : Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or bioabsorbable membranes. A 4-year follow-up split-mouth study. J Periodontol 2001; 72/12 : 1695-1701

Simion M, Maglione M, Iamoni F, Scarano A, Piattelli A, Salvato A (1997) : Bacterial penetration through Resolut® resorbable membrane in vitro. An histological and scanning electron microscopic study. Clinical Oral Implants Research; 8/1, 23-31 (1997)

Slots J und Taubmann MA (Hrsg.) (1992) : Contemporary Oral Mikrobiology and Immunology. Mosby Year Book, St. Louis

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL (1998) : Microbiol. Complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25 : 134

Takashiba, S, TE Van Dyke, S Amar, Y Murayama, AW Soskolne und L Shapira (1999) : Differentation of Monocytes to Macrophages Primes Cells for lipopolysaccharide stimulation via Accumulation of Cytoplasmic Nuclear Factor KB. Infection and Immunity 67(11): 5573-5578

Therin M, Christel P, Li S, Garreau H, Vert M (1992) : In vivo degadation of massive poly(α-hydroxy acids): validation of in vitro findings. Biomaterials 1992; Vol13 No.9 : 594-600

Tonetti MS, Greenwell H & Kornman KS (2018) : Staging and Grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. J ClinPeriodontol, 45 Suppl 20, 149-161

Urbani G, Canepari P, Lombardo G, Salgarelli C, Santi E (1997) : Effect of saliva on resorption of some resorbable membranes. Minerva Stomatol. 1997; 46(11) : 569-77

Vuddhakanok S, Solt ChW, Mitchell JC, Foreman DW, Alger FA (1993) : Histologic Evaluation of Periodontal Attachment Apperatus Following the Insertion of a Biodegradable Copolymer Barrier in Humans. J. Periodontol 1993; Vol. 64 No. 3 : 202-210

Wade AB (1966) : The Flap Operation
J Periodontol 1966; 37 : 95-99

Wang H-L, Yuan K, Burgett F, Shyr X, Syed S (1994) : Adherence of oral Microorganisms to Guided Tissue Membanes. An in vitro study. J. Periodontol 1994; 65 (3): 211-218

Zappa U (1991) : Resorbierbare Membranen – Paradontale Geweberegeneration unter Verwendung von resorbierbaren Membranen. Teil 1: Klinische Aspekte
Schweiz. Monatsschr. Zahnmed. 1991; Vol. 101 (9) : 1147-1150
Teil 2: Histologische Aspekte
Ebenda 1991; Vol. 101 (10) : 1321-1324

9. Anhänge

9.1 Anhang A: Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen

Von **Merk Vertrieb Diagnostica, Dtl., Frankfurter Str. 250, 64271 Darmstadt** stammen:

Tris CHl, Essigsaeure; Chloroform z. A., Ethanol,
Pefabloc, 124839.0100, SC (4-(2-amino. ethyl-) benzolsulfonyl-fluorid Hydrochlorid, C8H10FNO2S

Von **Sigma Chemie GmbH, Gruenwalder Weg 30, Deisendorf** stammen (co PO Box 14508 St. Louis USA, D-0632):

Glycerin, fast Blue RR, α-Maphthylacetat, p-Nitrophenylacetat, Fast Garnet GBC,
Esterase EC 3.1.1.1., Nr. 2884 (from Porcine Liver),
1:10 in 3,2 M Ammonsulfat E 2884,
DTT (DL-Dithiothreitol 99%) C4H10O2S2,
Lysozym (Muramidase, Mucopeptide) No L-6876, N-Acetylmuramoylhydrolase from Chicken Egg White,
D-Fructose-1, 6-Diphosphate, No 752-1, Trisodiumsalt,
D Nase I, D-5025, Deoxyribonuclease I from Bovine Pancreas

Von der **Pharmacia Biotech**, Freiburg i. Br., Deutschland stammen:

Phast Gel DNA Code 17-1599-01
Phast Gel® Code 17-0542-01
Buffer Strips
Phast Gel DANN
Silver staining Kit 17-1596-01

Von **Difco Laboratories GmbH, Ulmer Strasse 160a, 86156 Augsburg** stammen:

Hirn-, Herz-, Glukose-Bouillon Bacto®
Bestell-Nr. 0037-17 CH.-B. 68143JC

Von **Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland** stammen:

Pulver D 6507, Resomer® RG 50, Poly (D, L) lactid coglycolid 50:50 (CAS 26780-50-7), Chargen Nr./Lot Nr. 15094

Von der Firma **Ethicon GmbH & Co KG, D-22841 Norderstedt** stammen:

Vicryl-Netz Parodontal Zuschnitt, 3x2 cm
Steriles Netz Groesse 15 zu 15 cm

Von **GC Corporation, Tokyo Japan, GC Belgien NV, Interleuwenlaun 13. 3001 Leuern** stammen:

Pattern Resin Kunstoff

Von der Firma **Balzers Union, Postfach 75, Fl-9496 Balzers Lichtenstein** stammen:

SCD 040 (Kohlesputter)
SCD 050 Sputter Goater (Goldsputter)

9.2 Anhang B: Geräte

Anaerobe Inkubation:	Gas Pak Anaerobic System, Palladium Catalyst (H2 + Co2); BBL Microniology Systems, Division of Becton Dickinson and Company
Ultraschallgerät:	Braunsonic 300s; B. Braun Melsungen AG, Werk Apparatebau
Isotonische Kochsalzlösung:	Pfrimmer & Roth, Pharmazeutische Werke Erlangen GmbH & Co
Inkubationsgefäße:	10 ml Schlenkröhrchen 100 ml Glaeser, Firma Schott, Duranglas, GL 45
Eppendorfer Pipettenboxendeckel:	Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland, Breite 9 cm, Laenge 13 cm, tiefe 1 cm, glasig, polyethylen
Absorbationsmessung:	UV 1202 UV-VIS Spectrophotometer (Schimadzu)
Waage:	4-stellige elektrische Praezisionswaage Sartorius Research
Flow:	Laminar Flow Steag, Firma STEAG Laminarflow – Prozesstechnik GmbH, Pliezhausen, Deutschland
Brutschrank:	Firma Memmert, Schwabach bei Nuernberg, Deutschland
Großes Forschungsmikroskop:	Ortholux, Leitz GmbH Wetzlar, Liste 512-40d
REM:	Leitz ISI SR 50®, Akashi Japan
Phast System:	Firma Pharmacia LKB, Freiburg i. Br., Deutschland

10. Lebenslauf

Persönliches

Name	Walter, Klaus-Joachim, Georg Wille-Kollmar
Geburtsdatum	15. September 1965
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet, 6 Kinder

Sprachen: Muttersprache Deutsch, fließend Englisch, fließend Italienisch

Studium und Schulausbildung

1986	Abitur am Albert Schweitzer Gymnasium, Erlangen
Bundeswehrzeit	W15 in der Sanitätsstaffel der Luftwaffe in Roth
Studium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen	Humanmedizin vom WS 87/88 bis WS 90/91 Zahnmedizin von SS 91 bis SS 96 Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) 3-8/96 Staatsexamen in Zahnmedizin 13.08.1996

Berufliche Tätigkeit

2006-2008 freier Mitarbeiter, Dozent und Doktorand (PHD in applizierter Biotechnologie in der Zahnheilkunde) an der Universität Bari

während des Studiums parallel:

Präparator am Anatomischen Institut Erlangen unter Prof. Dr. Dr. h.c. Rohen für den Anatomischen Bildatlas der Humanmedizin „Anatomie des Menschen“ (1988-89)
Präparator für die Hand- und Plastische Chirurgie Erlangen unter Prof. Dr. Geldmacher (1989-1990)

1997/1998 Mitarbeiter (Assistent) im Zentrum für Internationale Implantologie IFZI von Prof. (NY) Lang, Nürnberg, Deutschland

1999 Assistent, später Partner in der Zahnarztpraxis Dr. Röscheisen, Hausham, Deutschland

2001 Gründung der Zahnarztpraxis (Centro per la Microscopia e Implantologia), Barletta, Italien
2002-2000 Mitarbeit in der kieferorthopädischen Praxis Dr. Dieter Eberhard, Ingolstadt

2007-2008 Verantwortlicher Dozent für die praktische Ausbildung in Implantologie (1. universitärer Kurs in Europa) und Parodontologie unter Prof. Roberto Grassi, Bari, Italien

2008-2014 Geschäftsführer und medizinischer Direktor der IAADD srl. (Internat. Academy for Advanced Dentistry and Diagnostic), Barletta, Italien

2007 externer Konsulent für die Implantologie in der Privatpraxis Dr. Nothelfer, München

Konsulenzarbeiten für Implantologie in zahlreichen Praxen (Calabrien, Bari) in Italien

2012-2014 Partnerschaft mit Dr. Tilman Fritsch, TF Zahnheilkunde, Bayerisch Gmain, Kiefersfelden, Anif Österreich, TF Zahnheilkunde Italien

2013 Partnerschaft mit ZA Alexander Bouymin, später weiter Zusammenarbeit mit Zahnarzt hoch zwei, München

2014 Zusammenarbeit im Rahmen Zahnärzte am Adelmansberg, Dr. Leventic, Ingolstadt

2014 Geschäftsführer und medizinischer Direktor der Salute Prima di Tutto, Barletta, Italien mit Verlag und der Online-Zeitschrift für Gesundheit und Wohlbefinden, www.bewellmag.com

2016 Gründung und Niederlassung Zahnarzt im Roten Adler, Innsbruck, Österreich

Zulassung als Zahnarzt in Italien, Deutschland und Österreich

Gutachtertätigkeit am Gerichtshof Trani/Italien (Zivilrecht und Strafrecht)

Konsulenzarzt Lanserhof und Parkhotel

Sonstige Tätigkeiten

2000-2012 Chefredakteur der Zeitschrift „Dentale Implantologie & Parodontologie“des Flohr- später Spitta Verlag Deutschland

2004-2008 verantwortlicher Direktor und Chefredakteuer der Zeitschrift „Implantologia dentale & Parodontologia“der Flohr editrice srl Italien

Mitglied im Journalistenverband Italien und Deutschland

Berater, Mitarbeiter verschiedener Dentalfirmen im Inn- und Ausland

Mitglied zahlreicher wissenschaftlicher und fachlicher Gesellschaften in Italien und Deutschland

11. Verzeichnis der akademischen Lehrenden

Meine akademischen Lehrenden an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg waren folgende Damen und Herren ProfessorInnen und DozentInnen (gelistet in alphabetischer Reihenfolge und ohne akademischen Grad):

Fleischer-Peters, Geldmacher, Hirschfelder, Hofmann, Kerstin, Lütje-Drecoll, Müssig, Neukam, Petschelt, Rohen, Spitzer, Steinhäuser, Voss, Weigand.

DANKSAGUNG

Ich danke:

- Frau Prof. Dr. A. Nicole Arweiler für die Überlassung des Themas und die Übernahme der Arbeit, sowie für ihre persönliche Unterstützung mit Rat und Tat.

- Herrn Dr.W.Distler, H. Brönner, sowie Frau Ulrike Dahl und Frau Susanne Rußmann, die mich an den Laborgeräten einwiesen und mir in vielen Fragen der experimentellen Arbeit eine große Hilfe waren.
- Den Herrn Dr. Ebert und Dr. Sindel für Unterstützung bei der Erstellung der REM Aufnahmen.
- Der Firma Ethicon GmbH und Co KG (Herrn Dr. H. J. Hoepfner, Med. Wiss. Bereich) für Prospektmaterial und die Bereitstellung von Vicryl-Netzen und -Membranen.
- Der Großsterilisation der chirurgischen Klinik für die Hilfe bei der Sterilisation meiner V-Folien.