

# Histologische Untersuchung einer neuen extrazellulären Matrixmembran zur gesteuerten Knochenregeneration: Eine experimentelle Studie an Kaninchen



Adel Al-Asfour, DDS<sup>1</sup>/Pentti Tengvall, PhD<sup>2</sup>  
 Lars Andersson, DDS, PhD, Dr. odont.<sup>3</sup>  
 Christer Dahlin, DDS, PhD, Dr. odont.<sup>4</sup>

*In dieser Studie wurde eine gesteuerte Knochenregeneration an 18 erwachsenen weißen Neuseeland-Kaninchen vorgenommen. Dabei wurden die histologische Durchführbarkeit und die biologischen Auswirkungen der TiO<sub>2</sub>-Imprägnierung einer extrazellulären Matrixmembran (ECM-Membran) untersucht. In unbezahn-ten Oberkieferbereichen der Kaninchen wurden bilateral Knochendefekte erzeugt und mit demineralisiertem gefriergetrocknetem Knochen (DFDB) aufgefüllt. Die ECM-Membran wurde randomisiert mit einer Kochsalzhaltigen Lösung mit 3 mg TiO<sub>2</sub>-Partikeln vorbehandelt. Auf der kontralateralen Seite diente eine Standard-ECM-Membran als Kontrolle. Die Einheilphasen betrug zwei, vier und acht Wochen. Anschließend wurden die Bereiche histologisch und histomorphometrisch analysiert. Folgende Parameter wurden untersucht: (1) Bereich mit Entzündungszellen neben der ECM-Membran, (2) in die ECM-Membran eingewachsene Zellen und (3) TiO<sub>2</sub>-Partikel in der ECM-Barrieremembran. Insgesamt traten in beiden Gruppen keine unerwünschten Reaktionen auf die ECM-Membranen auf. Die TiO<sub>2</sub>-Partikel waren auch nach achtwöchiger Einheilung noch histologisch in der ECM-Membran nachweisbar, wodurch diese gut zu erkennen war. Die histomorphometrische Analyse erbrachte eine geringe Anzahl von Entzündungszellen an der ECM-Oberfläche bei ausreichendem Erhalt und Integration der Barriere. Die Imprägnierung einer ECM-Membran mit kontrastgebenden TiO<sub>2</sub>-Partikeln ist in In-vivo-Modellen sehr hilfreich für den Nachweis ähnlicher biologischer Materialien. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2013;33:169–175.)*

<sup>1</sup> Außerordentlicher Professor, Department of Surgical Sciences, Kuwait University, Kuwait City, Kuwait.

<sup>2</sup> Professor, Department of Biomaterials, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg; BIOMATCELL VINN Excellence Center of Biomaterials und Cell Therapy, University of Gothenburg, Göteborg, Schweden.

<sup>3</sup> Professor und Leiter, Department of Surgical Sciences, Kuwait University, Kuwait City, Kuwait.

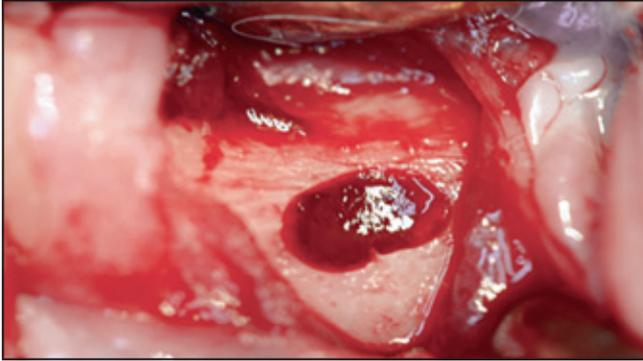
<sup>4</sup> Professor, Department of Biomaterials, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg; BIOMATCELL VINN Excellence Center of Biomaterials und Cell Therapy, University of Gothenburg, Göteborg, Schweden; Department of Oral und Maxillofacial Surgery, NÄL Medical Centre Hospital, Trollhättan, Schweden.

Korrespondenz an: Dr. Christer Dahlin, Department of Biomaterials, Institute for Clinical Sciences, The Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, PO Box 412, SE-405 30, Göteborg, Schweden. Fax: +46-31-786 2941. E-Mail: christer.dahlin@biomaterials.gu.se

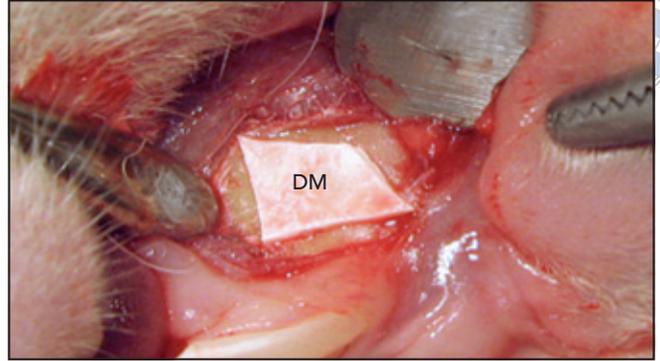
©2013 by Quintessence Publishing Co Inc.

In den vergangenen Jahren wurden bei der gesteuerten Knochenregeneration (GBR) zahlreiche Membranen erfolgreich eingesetzt. Diese bestehen aus nicht resorbierbaren Materialien, wie expandiertem Polytetrafluorethylen (e-PTFE), oder sind bioresorbierbar, wie Membranen aus Dura mater, Polylaktat, Polyglykolat und Polyurethan<sup>1</sup>. Ein als Barriere verwendetes Material soll vor allem das Wachstum und die Expression bestimmter osteogener Zellen fördern und das Einwachsen von Weichgewebsanteilen verhindern. Für das Membranmaterial sind daher seine strukturelle Integrität und seine Biokompatibilität besonders wichtig.

Zunächst waren e-PTFE-Barrieremembranen der Goldstandard bei der GBR<sup>2-4</sup>. Nachteile bei der Verwendung dieses Materials waren jedoch der erforderliche Zweiteingriff zur Materialentfernung und das höhere Expositionsrisiko während der Heilung, das Schäden an den Geweben hervorrufen konnte<sup>5,6</sup>. Daher wurden biologisch abbaubare Membranen entwickelt<sup>7</sup>. In klinischen und In-vivo-Studien wurden zahlreiche derartige Membranen untersucht<sup>8-11</sup>. Aufgrund der guten Ergebnisse und der geringen Komplikationsrate sind resorbierbare Membranen inzwischen in den meisten klinischen Situationen das Material der Wahl. Vor Kurzem erbrachte eine neue Membran aus intakter extrazellulärer Matrix (ECM) aus



**Abb. 1** Experimenteller Defekt im Oberkiefer eines Kaninchens.



**Abb. 2** Mit einer Kochsalzhaltigen Lösung mit  $TiO_2$ -Partikeln vorbehandelte ECM-Membran. DM = DynaMatrix.

der Submukosa des Schweinedünndarms vielversprechende klinische und experimentelle Ergebnisse<sup>12-15</sup>. Die ECM-Membran soll als biologisches Gerüst die Reparatur der beschädigten und erkrankten Gewebe und Organe mit strukturell und funktionell ähnlichem Gewebe fördern. Da die ECM-Membranen jedoch in der Struktur und dem Ursprung diesen Geweben ähnlich sind, wird die histologische Analyse des Heilungsprozesses bei ihrer Verwendung erschwert. Da ECM biologischen Ursprungs ist, färbt es fast genauso an wie das lokale Wirtsgewebe. In der hier vorgestellten Studie wurde die Verwendung einer ECM-Membran bei GBR-Verfahren in einem experimentellen Tiermodell morphologisch untersucht.

## Material und Methode

### Tiere und Anästhesie

Für diese Studie wurden 18 erwachsene (älter als sieben Monate) weiße Neuseeland-Kaninchen verwendet.

Die Tiere wurden in speziellen, geeigneten Räumen gehalten, hatten Wasser zur freien Verfügung und erhielten Standard-Laborfutter.

Präoperativ erhielten die Tiere eine Allgemeinanästhesie nach Standardprotokoll.

Die Lokalanästhesie erfolgte mit 1 ml 2,0 % Lidocainlösung mit Adrenalinzusatz. Postoperativ erhielten die Tiere drei Tage lang einmalig intramuskulär Antibiotika (Penicillin 2250000 IE/5 ml, 0,1 kg Körpergewicht, LEO Pharma) und Analgetika (0,05 mg/kg Temgesic, Reckitt und Colman). Das Protokoll für Tierversuche des Animal Research Centre, Health Sciences Center, Kuwait University, Kuwait City, Kuwait, wurde strikt befolgt.

### Chirurgisches Vorgehen

Als Test- und Kontrollstellen wurden bilateral die unbezahnten Bereiche zwischen den oberen Schneidezähnen und Molaren ausgewählt. Der Knochen wurde mit 10 cm langen Inzisionen zwischen der bukkalen

und palatinalen Mukosa freigelegt, Mukoperiostlappen abgehoben und mit einem Rundbohrer unter Kochsalzspülung Defekte mit einer Größe von 5 x 8 x 3 mm angelegt (Abb. 1). Die Defekte wurden mit DFDB in einem thermoplastischen Carrier (DynaBlast, Keystone Dental) aufgefüllt.

Anschließend wurde der Defekt mit einer ECM-Membran (DynaMatrix, Keystone Dental) abgedeckt, die randomisiert mit einer Kochsalzlösung mit 3 mg Titandioxidpartikeln ( $TiO_2$ ) (Sigma-Aldrich) vorbehandelt wurde (Abb. 2). Als Kontrolle diente eine Standard-ECM-Membran auf der kontralateralen Seite. Die Wunden wurden mit resorbierbaren 5-0-Fäden (Vicryl, Johnson & Johnson) verschlossen.

Nach zwei, vier bzw. acht Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Die experimentellen Bereiche wurden entnommen und für 24 Stunden in einen Cacodylatpuffer (0,1 mol/l; ph = 7,4) mit Paraformaldehyd 2,5 % und Glutaraldehyd 0,1 % gegeben. Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme radiologisch untersucht.

## Verarbeitung und Untersuchung der Gewebe

Die Proben wurden mit Ethylendi-aminetraessigsäure (15 %) für zwei Wochen dekalzifiziert und der Erfolg radiologisch bestätigt. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben in Paraffin eingebettet, geschnitten (3 bis 5 µm) und mit Hämatoxylin-Eosin und modifiziertem Anilinblau nach Mallo-ry angefärbt.

## Lichtmikroskopie und Histomorphometrie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Leitz-Aristoplan-Lichtmikroskop (Leitz Wetzlar) und die histomorphometrischen Analysen mit einem Leitz Microvid (Leitz Microvid), das mit dem Mikroskop und einem Computer verbunden war. Die Messungen wurden mit einem geeigneten Objektiv und einem 2,5-fachen Zoom direkt im Okular des Lichtmikroskops durchgeführt<sup>16</sup>.

Durch ein in das Okular gesetztes Raster wurde eine Region of Interest (ROI) festgelegt. Sie enthielt die Barrieremembran und das sie umgebende Gewebe. Insgesamt wurden fünf ROIs definiert. Für jeden Bereich wurde die umgebende Bindegewebskapsel und die Anzahl der Entzündungszellen berechnet und anschließend jeweils als Mittelwert für jeden Bereich und jeden Defekt angegeben (anhand der drei Schnitte aus jedem Defekt).

## Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student-Newman-Keuls-Varianztest mithilfe der Nullhypothese

untersucht. Eine statistische Signifikanz bestand bei  $P < 0,05$ .

## Ergebnis

Alle Tiere erholten sich während der festgelegten Einheitszeiten gut von der Operation. Es waren weder signifikante Gewichtsabnahmen und oder postoperative Infektionen zu verzeichnen. Keines der Tiere war während der Heilungsphase verhaltensauffällig.

## Histologie

### Allgemeine Befunde

Typische histologische Schnitte des Oberkiefers enthielten die mediale/inferiore Knochenwand, den zentralen Schneidezahn superior des Schnitts und den experimentellen Bereich. Die ECM-Membranen lagen auf der Oberfläche des lateralen Knochens und des experimentellen Defekts. Die nicht vorbehandelten ECM-Membranen ließen sich nur schwer vom angrenzenden Gewebe unterscheiden. Es fanden sich keine offensichtlichen Zeichen einer lokalen Entzündungsreaktion oder assoziierter unerwünschter Effekte auf die Nachbargewebe. In der frühen Heilungsphase war eine Vaskularisierung mit Einwachsen und Reifung von Gefäßen aller Arten von Arteriolen, Venolen und Kapillaren in der Barrieremembran zu erkennen (Abb. 3 bis 5). Außerdem waren die Defekte vollständig mit den DFDB-Partikeln aufgefüllt. Die Heilung ging mit einer unterschiedlich starken Knochenneubildung und Osteoblastensäumen an den Partikeln mit nachfolgender Bildung von Geflechtknochen und zunehmender Mineralisierung einher.

## Beobachtungen nach zwei Wochen

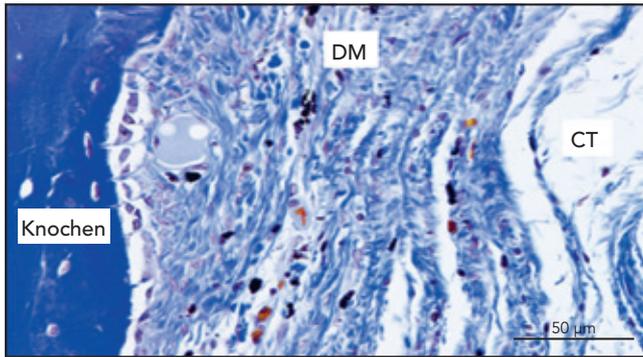
Zu diesem Zeitpunkt der Heilung fanden sich an der ECM-Membran nahezu keine Entzündungszellen und keine Zeichen einer Degradation. In der Barrieremembran waren einige kleine Kapillaren zu erkennen. In den Defekten fanden sich erste Osteoblasten und eine Osteoidbildung an den Wänden.

## Beobachtungen nach vier Wochen

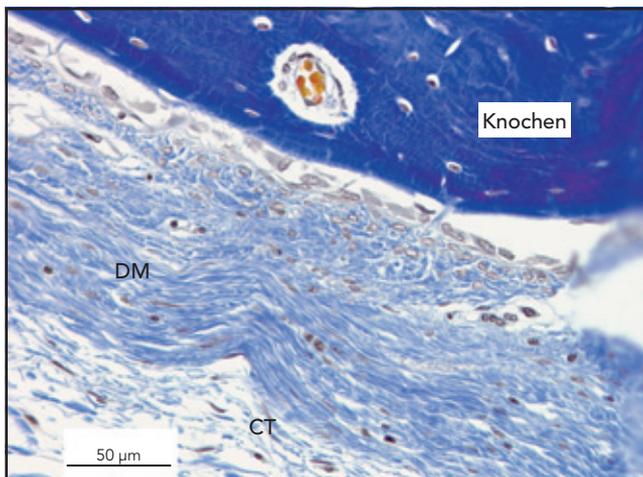
Nach vier Wochen bestand eine stärkere osteogene Aktivität. Der neugebildete Knochen bedeckte größere Bereiche, und die Räume zwischen den DFDB-Partikeln waren durch Geflechtknochen überbrückt. Die ECM-Membran war auch weiterhin gut integriert mit vermehrter Neovaskularisierung durch Kapillaren, Arteriolen und Venolen (Abb. 4). Das umgebende Bindegewebe enthielt keine Entzündungszellen, sondern eine relativ dichte Lage aus Kollagenfasern. Die TiO<sub>2</sub>-Partikel waren auch weiterhin in der ECM-Membran vorhanden und nicht in die umgebenden Gewebe gewandert.

## Beobachtungen nach acht Wochen

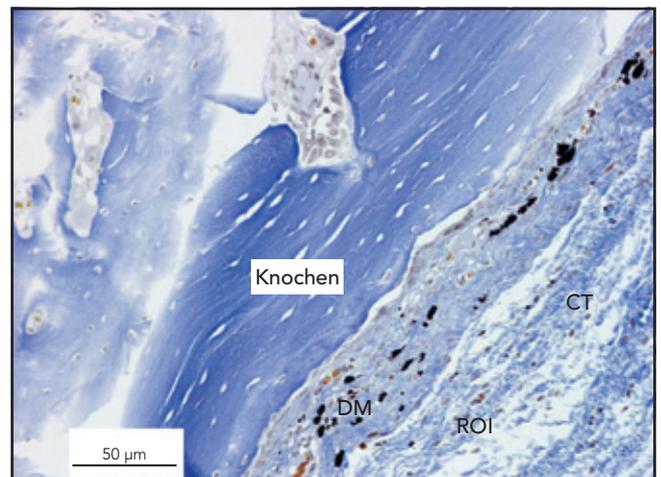
Nach acht Wochen war der Knochen in den Defekten reifer. Es war ein aktiver Knochenumbau zu erkennen. Durch die Reorganisation des Knochens entstand allmählich eine einheitlichere Markhöhle mit umgebendem Lamellenknochen, sodass die ursprüngliche Knochenkontur wiederhergestellt wurde. Auch die ECM-Membran war vollständig in die Nachbargewebe integriert und nur noch durch die TiO<sub>2</sub>-Imprägnierung zu erkennen (Abb. 3 und 5). Es fanden sich weiterhin keine Hinweise auf eine Degradierung oder Migration der TiO<sub>2</sub>-Partikel.



**Abb. 3** Schleifpräparat nach vierwöchiger Heilung mit gut integrierter ECM-Membran. Zu erkennen sind eingesprossete Kapillaren und Venolen sowie die  $TiO_2$ -Partikel als dunkle Flecke in der Membran. Es gibt keine entzündliche Gewebsreaktion. DM = DynaMatrix-Membran; CT = Bindegewebe.



**Abb. 4** Lichtmikroskopische Ansicht einer ECM-Membran ohne  $TiO_2$ -Partikel nach achtwöchiger Heilung. Die Barriere ist gut integriert und weist keine entzündliche Reaktion auf. Die Ähnlichkeit des Membranmaterials mit dem angrenzenden Gewebe ist erkennbar. DM = DynaMatrix-Membran; CT = Bindegewebe.



**Abb. 5** Histologisches Präparat einer  $TiO_2$ -imprägnierten Membran (achtwöchige Heilung) mit der ROI der morphometrischen Analyse. DM = DynaMatrix-Membran; CT = Bindegewebe; ROI = Region of Interest.

### Morphometrische Analyse

Die morphometrischen Messungen ergaben eine geringe Anzahl von Entzündungszellen an der Barriere-membran. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den  $TiO_2$ -imprägnierten Membranen und den (unbehandelten) Kontrollmembranen. Auch während der jeweiligen Heilungsphasen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tabelle 1 bis 3).

### Diskussion

Bei einer GBR eingesetzte Barriere-membranen müssen bestimmte Kriterien erfüllen, wie Biokompatibilität, Zellokklusion, Platzerhalt, Adaption, einfache Anwendung und Integration in das Gewebe. Gerade die letzte Eigenschaft ist entscheidend für eine frühe Integration der Gewebe<sup>17</sup>. In der vorliegenden Studie wurde eine ECM-Barrieremembran mit und ohne kontrastgebende  $TiO_2$ -Partikel verwendet. Das Material wurde so aus der Submukosa des Dünndarms von

Schweinen hergestellt, dass die Integrität und die natürlich exprimierten Moleküle der extrazellulären Matrix, wie die Kollagene (Typen I, III, IV und VI), Glykosaminoglykane und verschiedene Wachstumsfaktoren, erhalten blieben<sup>14,18</sup>. Vor Kurzem wurde mit gutem Ergebnis untersucht, ob ECM-Membranen in der Mundhöhle zum Erhalt der befestigten keratinisierten Gingiva und von Transplantaten bei GBR-Verfahren geeignet sind<sup>15,19</sup>. In der vorliegenden Studie wurden die ECM-Membranen rasch integriert und lösten kaum entzünd-

<b>Tabelle 1a Gewebsreaktionen um die ECM-Membranen nach 2 Wochen</b>		1	2	3	4	5	6
ECM							
Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ )		1,8	1,5	4,23	1,1	3,3	0,9
Mittlere Zellzahl (Entzündungszellen)		13	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

<b>Tabelle 1b Gewebsreaktionen um die TiO<sub>2</sub>-imprägnierten ECM-Membranen nach 2 Wochen</b>		1	2	3	4	5	6
ECM							
Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ )		1,9	1,7	0,8	2,3	1,6	1,5
Mittlere Zellzahl (Entzündungszellen)		< 5	11	< 5	< 5	7	< 5

<b>Tabelle 2a Gewebsreaktionen um die ECM-Membranen nach 4 Wochen</b>		1	2	3	4	5	6
ECM							
Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ )		1,8	1,5	4,2	1,1	3,3	0,9
Mittlere Zellzahl (Entzündungszellen)		< 5	< 5	6	6	< 5	< 5

<b>Tabelle 2b Gewebsreaktionen um die TiO<sub>2</sub>-imprägnierten ECM-Membranen nach 4 Wochen</b>		1	2	3	4	5	6
ECM							
Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ )		1,9	1,7	0,8	2,3	1,6	1,5
Mittlere Zellzahl (Entzündungszellen)		< 5	11	7	< 5	< 5	< 5

<b>Tabelle 3a Gewebsreaktionen um die ECM-Membranen nach 8 Wochen</b>		1	2	3	4	5	6
ECM							
Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ )		1,6	1,5	1,2	1,1	0,3	0,9
Mittlere Zellzahl (Entzündungszellen)		< 5	< 5	6	6	< 5	< 5

<b>Tabelle 3b Gewebsreaktionen um die TiO<sub>2</sub>-imprägnierten ECM-Membranen nach 8 Wochen</b>		1	2	3	4	5	6
ECM							
Mittlere Dicke ( $\mu\text{m}$ )		1,2	1,5	0,7	2,2	1,3	1,2
Mittlere Zellzahl (Entzündungszellen)		< 5	8	< 5	< 5	6	< 5



liche Reaktionen aus. Bemerkenswert war, dass das Material vom Nachbargewebe leicht unterschieden werden konnte, wenn es mit TiO<sub>2</sub>-Partikeln imprägniert worden war. Durch seinen biologischen Ursprung färbt die Membran histologisch mit Hämatoxylin-Eosin und Toluidinblau genauso an wie das umgebende Bindegewebe. Histomorphometrisch ergaben sich keine unerwünschten Effekte der TiO<sub>2</sub>-Partikel. Die ECM-Membran führte im Vergleich zu autogenen Gingivatransplantaten zu einem vorhersagbaren Ergebnis bezüglich der Breite der keratinisierten Gingiva. In einer aktuellen Studie von Kim et al.<sup>19</sup> wurde die ECM-Membran in Kombination mit demineralisierter Knochenmatrix für den Alveolarkammerhalt untersucht. Die klinischen und histologischen Ergebnisse waren zufriedenstellend. Nach sechsmonatiger Heilung wurden Hart- und Weichgewebeproben entnommen und dabei keine Überreste der Membranen gefunden. Dies widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie, was jedoch daran liegen könnte, dass die ECM-Membranen in den histologischen Schnitten aufgrund der großen Ähnlichkeit mit den Nachbargeweben nur schwer nachzuweisen waren. Das vorgestellte Modell wurde bereits zur Untersuchung der Regeneration von Defekten mit und ohne Platzierung einer Barrieremembran verwendet<sup>20</sup>. Normalerweise heilt ein Defekt spontan innerhalb von vier Wochen, allerdings mit einer persistierenden bukkalen Konkavität des Oberkiefers<sup>21,22</sup>. In der vorliegenden Studie wurde das experimentelle Modell zur Untersuchung der Morphologie und Funktion der ECM-Membran verwendet. Außerdem wurde ermittelt, ob eine Imprägnierung der Membran mit TiO<sub>2</sub>-Partikeln, die als Marker dienen, verträglich ist. TiO<sub>2</sub> wirkt sich im Kontakt mit den Nachbargeweben nachweislich antiphlogistisch aus<sup>23</sup>.

In dieser Studie fanden sich keine negativen Auswirkungen im Sinne einer Entzündung oder gestörten Gewebsorganisation. Eine mit kontrastgebenden TiO<sub>2</sub>-Partikeln imprägnierte ECM-Membran kann dazu dienen, diese Membran in In-vivo-Modellen von ähnlichen Materialien abzugrenzen. Die ECM-Membran ohne TiO<sub>2</sub>-Partikel hatte fast keine entzündliche Wirkung.

## Schlussfolgerungen

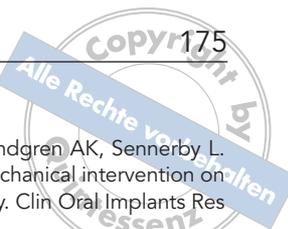
Histologisch war das Transplantatmaterial in den experimentellen Defekten durch die ECM-Membranen gut erhalten und ausgezeichnet integriert. Aufgrund dieser Eigenschaften ist die ECM-Membran für die GBR und Weichgewebsaugmentation geeignet.

## Danksagungen

Diese Studie wurde von Vinnova/BIOMAT-CELL und der University of Kuwait gefördert. Das Membranmaterial wurde von COOK Medical, Lafayette, Illinois, USA, bereitgestellt. Die Autoren danken Maria Hoffmann für die Bearbeitung der Abbildungen.

## Literatur

- Greenstein G, Caton JG. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontol 2000* 1993;1:36–45.
- Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res* 1991;2:159–165.
- Davarpanah M, Tecucianu JF, Slama M, Celletti R. Bone regeneration in implantology. The use of Gore-Tex membranes: GTAM. *J Periodontol* 1991;10:169–176.
- Nevins M, Mellonig JT. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: A combination of allograft and the GORE-TEX membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1992; 12:96–111.
- Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994; 14:166–180.
- Machtei M. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: A meta-analysis. *J Periodontol* 2001;72:512–516.
- Hämmerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol 2000* 1998;17:151–175.
- Lundgren D, Sennerby L, Falk H, Friberg B, Nyman S. The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. Case reports. *Clin Oral Implants Res* 1994;5:177–184.
- Mayfield L, Nobreus N, Attstrom R, Linde A. Guided bone regeneration in dental implant treatment using a bioabsorbable membrane. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:10–17.
- Simion M, Scarano A, Gionso L, Piatelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: A comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11:735–742.
- Zitzmann N, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:844–852.
- Record R, Hillegonds D, Simmons C, et al. In vivo degradation of 14C-labeled small intestine submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair. *Biomaterials* 2001;22:2653–2659.
- Hodde J, Ernst D, Hiles M. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS wound matrix. *J Wound Care* 2005;14:23–25.
- Hodde J, Janis A, Ernst D, Zopf D, Sherman D, Johnson C. Effects of sterilization of an extracellular matrix scaffold: Part I. Composition and matrix architecture. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18: 537–543.



15. Nevins M, Nevins ML, Camelo M, Camelo JM, Schupbach P, Kim DM. The clinical efficacy of DynaMatrix extracellular membrane in augmenting keratinized tissue. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2010;30:151–161.
16. Johansson CB, Sennerby L, Albrektsson T. A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and Vitallium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991;6:437–441.
17. Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: An up-to-date literature review. *J Periodontol* 1995;66:495–505.
18. Badylak SF. Small intestinal submucosa (SIS): A biomaterial conducive to smart tissue remodelling. In: Bell E (ed). *Tissue Engineering: Current Perspectives*. Cambridge, MA: Burkhauser, 1993:179–189.
19. Kim D, Nevins M, Camelo M, et al. The feasibility of demineralized bone matrix and cancellous bone chips in conjunction with an extracellular matrix membrane for alveolar ridge preservation: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31:39–47.
20. Nannmark U, Sennerby L. The bone tissue responses to prehydrated and collagenated porcine bone grafts: A study in rabbit maxillary defects. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10:264–270.
21. Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L. The effect of mechanical intervention on jaw bone density. *Clin Oral Implants Res* 1995;6:54–59.
22. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:135–140.
23. Tengvall P, Lundström I, Sjöqvist L, Elwing H, Bjursten LM. Titanium-hydrogen peroxide interaction: Model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants. *Biomaterials* 1989;10:166–175.