

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie –  
Plastische Operationen – der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

**„Effekte auf die Angiogenese verschiedener mittels  
autologem Platelet-Rich Fibrin bioaktivierter  
Kollagenmatrices“**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Valentin Burkhardt  
aus Heidelberg

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12.07.2022

Für meine Familie und alle mir nahestehenden Menschen, die mich allzeit unterstützt haben  
und ohne die diese Arbeit nie realisierbar gewesen wäre.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	IX
1 Einleitung .....	1
1.1 Allgemeines .....	1
1.2 Zielsetzung .....	2
2 Literaturdiskussion .....	4
2.1 Regenerative Verfahren in der rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie .....	4
2.1.1 Prävaskularisierung .....	7
2.1.2 Bioaktive Faktoren .....	7
2.1.3 Guided tissue regeneration und guided bone regeneration .....	8
2.2 Kollagenmembranen .....	9
2.2.1 Geschichte .....	9
2.2.2 Herstellung .....	10
2.2.3 Eigenschaften der Kollagenmatrices .....	11
2.3 Angiogenese .....	13
2.3.1 Anatomischer Aufbau von Blutgefäßen .....	14
2.3.2 Angiogenese auf zellulärer und molekularer Ebene .....	14
2.3.2.1 Differenzierung der Endothelzellen .....	17
2.3.2.2 Führungsrolle der Tip-Zellen, Verlängerung der Aussprossung und Ausbildung eines Lumens .....	19
2.3.2.3 Anastomosierung und Perfusion der Aussprossungen .....	21
2.3.3 Gewebsregeneration und Angiogenese .....	21
2.3.3.1 Die inflammatorische Phase .....	22

Inhaltsverzeichnis	II
2.3.3.2 Die proliferative Phase.....	24
2.4 Platelet-rich fibrin.....	26
2.4.1 Geschichte des Platelet-rich fibrin .....	26
2.4.2 Herstellung.....	27
2.4.3 Regeneratives und angiogenes Potenzial der PRF .....	29
3 Material und Methoden.....	32
3.1 Material.....	32
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Experimentalanlage .....	37
3.2.2 Herstellung des Platelet-rich fibrin .....	39
3.2.3 In der Studie verwendete Membranen .....	40
3.2.3.1 Collprotect-Membran.....	40
3.2.3.2 Jason-Membran.....	40
3.2.3.3 Mucoderm-Membran.....	41
3.2.4 Bioaktivierung der Kollagenmembranen .....	41
3.2.5 ELISA.....	41
3.2.5.1 VEGF ELISA.....	42
3.2.5.2 TGF- $\beta$ 1 ELISA .....	43
3.2.6 Yolk sac membrane Modell.....	45
3.2.7 Histologie.....	47
3.2.8 Immunhistologie.....	50
3.2.8.1 $\alpha$ -SMA Färbung .....	50
3.2.8.2 CD 105 Färbung.....	51
3.2.9 Lichtbildmikroskopie .....	52
3.2.10 Chorion-Allantois-Membran Modell.....	53
3.2.11 In-vivo Fluoreszenz.....	55
3.3 Statistische Methodik.....	56
4 Ergebnisse .....	58

Inhaltsverzeichnis	III
4.1 Ergebnisse des ELISAS.....	58
4.1.1 VEGF ELISA .....	58
4.1.2 TGF- $\beta$ 1 ELISA.....	59
4.2 Ergebnisse des YSM Modells .....	60
4.2.1 Verzweigungspunkte des Gefäßnetzes .....	61
4.2.2 Gefäße .....	61
4.3 Ergebnisse der histologischen Auswertung .....	62
4.3.1 HE Färbung.....	63
4.3.2 $\alpha$ -SMA Färbung.....	63
4.3.3 CD 105 Färbung.....	65
4.4 Ergebnisse des CAM Modells .....	67
4.4.1 Gefäße .....	67
4.4.2 Verzweigungspunkte des Gefäßnetzes.....	68
4.4.3 Gefäßdichte.....	69
4.4.4 Vascular length density.....	70
5 Diskussion.....	71
5.1 VEGF und TGF- $\beta$ 1 als wichtige Wachstumsfaktoren der Angiogenese und Gewebsregeneration.....	72
5.1.1 Diskussion der Ergebnisse: VEGF-Konzentration .....	76
5.1.2 Diskussion der Ergebnisse: TGF-Konzentration.....	79
5.2 YSM zur Messung der Angiogenese .....	81
5.2.1 Diskussion der Ergebnisse: Gefäße und Verzweigungspunkte.....	84
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse: HE Färbung .....	86
5.2.3 Diskussion der Ergebnisse: Immunhistochemische Färbungen.....	87
5.3 CAM zur Messung der Angiogenese.....	90
5.3.1 Diskussion der Ergebnisse: Gefäße und Verzweigungspunkte.....	92
5.3.2 Diskussion der Ergebnisse: Gefäßdichte und Vascular length density .....	95
5.4 Auswirkungen der Eigenschaften der Kollagenmatrices auf die Angiogenese und Gewebsregeneration .....	97

---

5.5 Bioaktivierte Kollagenmatrices und ihre Rolle in der regenerativen rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie .....	100
5.6 Zusammenfassung.....	106
Literaturverzeichnis .....	108
Anhang .....	131
Erklärung .....	131
Danksagung .....	132
Tabellarischer Lebenslauf.....	133

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AMD	Azelluläre dermale Matrix
AMPK	Adenosinmonophosphat abhängige Kinase
A-PRF	Advanced platelet-rich fibrin
$\alpha$ -SMA	Alpha Smooth Muscle Antikörper
BMP	Bone morphogenetic proteins
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chick chorion allantois membrane
CGF	Concentrated growth factor
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CTGF	Conective tissue growth factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dest.	Destilliert
Dll	Delta-like
EC	Endothelial cells
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMD	Enamel matrix derivative
Engl.	Englisch
eNOS	Endothelial nitric oxide sythase
EPC	Epithelial progenitor cells
ePTFE	Expanded polytetrafluoroethylene
Et al.	Et alii
FGF	Fibroblast growth factor
Fiji	Fiji Is Just ImageJ
GA	Glutaraldehyd
GBR	Guided bone regeneration
GTR	Guided tissue regeneration
h	Stunde
HE	Hämatoxylin Eosin
HHT	Hereditäre Hämorrhagisch Teleangiektasie
HIF	Hypoxia-inducable factor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells

---

IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
i-PRF	Injectable platelet-rich fibrin
iPSC	Induced pluripotent stem cells
M	Molar
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MMP	Matrix-Metalloprotease
min.	Minute
MSC	Mesenchymal stem cells
N	normal
NO	Stickstoffmonoxid
PAP	Pancreatitis-associated protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PFP	Platelet free plasma
PGA	Polyglycolic acid
PIK	Phosphatidylinositol kinase
PLA	Polylactic acid
PIGF	Placental growth factor
PPP	Platelet-poor plasma
PRF	Platelet-rich fibrin
PRP	Platelet-rich plasma
ROI	Region of interest
rpm	Rotations per minute
s.o.	siehe oben
SP	Substanz P
TGF	Transforming growth factor
Tie	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains
TNF	Tumor necrosis factor
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
u-PAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
VE	Vascular endothelial
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor Receptor

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 2.1: Anatomische Darstellung des Aufbaus eines Blutgefäßes. Modifiziert nach Mazurek et al. (111).....	14
Abbildung 2.2: Vorgang der Angiogenese.....	17
Abbildung 2.3: Differenzierung von Tip- und Stalk-Zellen.....	18
Abbildung 2.4: Phasen der Gewebsregeneration.....	22
Abbildung 2.5: PRF-Varianten mit Zentrifugationsprotokollen.....	29
Abbildung 3.1: PRF-Röhrchen mit Inhalt.....	40
Abbildung 3.2: Bioaktivierte Kollagenmembranen.....	41
Abbildung 3.3 Eier nach Eröffnung mit applizierten Membranen.....	47
Abbildung 3.4: Entnahmezyklus der Membranen und der YSM für die weitere histologische Untersuchung.....	48
Abbildung 3.5: Exemplarische Auszählung der Gefäße pro mm <sup>2</sup> der histologischen Schnitte, die zuvor mit dem digitalen Mikroskop betrachtet und digitalisiert wurden.	49
Abbildung 3.6: Exemplarische Auszählung der Gefäßverzweigungspunkte anhand der mit dem Auflichtmikroskop geschossenen Bilder der YSM nach Entfernung der zuvor applizierten Membranen.....	53
Abbildung 3.7: Exemplarische Auszählung der Gefäßverzweigungspunkte der mit dem Intravitalmikroskop geschossenen Bilder von der CAM im Randbereich der applizierten Membran (s. grüne Fläche im unteren Bildabschnitt).....	56
Abbildung 4.1: ELISA VEGF.....	59
Abbildung 4.2: ELISA TGF- $\beta$ 1.....	60
Abbildung 4.3: Verzweigungspunkte pro mm <sup>2</sup> des Gefäßnetzwerkes der YSM unter dem Auflichtmikroskop.....	61
Abbildung 4.4: Gefäße pro mm <sup>2</sup> der YSM unter dem Auflichtmikroskop.....	62
Abbildung 4.5: Gefäße pro mm <sup>2</sup> nach Auswertung der HE Schnitte der YSM.....	63
Abbildung 4.6: Gefäße pro mm <sup>2</sup> nach Auswertung der immunhistochemischen $\alpha$ -SMA Schnitte der YSM.....	64
Abbildung 4.7: Anteil des $\alpha$ -SMA positiven Gewebes am histologischen Schnitt der YSM.....	65
Abbildung 4.8: Gefäße pro mm <sup>2</sup> nach Auswertung der immunhistochemischen CD105 Schnitte der YSM.....	66
Abbildung 4.9: Anteil des CD105 positiven Gewebes am histologischen Schnitt der YSM.....	66

---

Abbildung 4.10: GefäÙe pro mm <sup>2</sup> in der mittels intravital Fluoreszenz Mikroskopie untersuchten CAM. ....	67
Abbildung 4.11: Verzweigungspunkte des GefäÙnetzwerkes pro mm <sup>2</sup> nach Untersuchung der CAM mittels intravital-fluoreszenz Mikroskopie. ....	68
Abbildung 4.12: GefäÙdichte der CAM nach Untersuchung mittels intravital-fluoreszenz Mikroskopie. ....	69
Abbildung 4.13: Vascular length density der CAM nach intravital-fluoreszenz Mikroskopie. ....	70

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 3.1: Verwendete Materialien .....	37
Tabelle 3.2: Experimentalanlage .....	39
Tabelle 3.3: Verwendete Materialien Human VEGF ELISA .....	43
Tabelle 3.4: Verwendete Materialien Human TGF- $\beta$ 1 ELISA.....	44

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Die regenerative Medizin ist ein Forschungsfeld, welches in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit genießt. Dies führte zu vielen Neuerungen in der klinischen Praxis. Sie umfassen von der Transplantation von Organen, über Zell-basierte Therapien mit Stammzellen bis hin zu der in vivo und in vitro Züchtung neuer Gewebe und Organe ein weites Feld an Methoden und Anwendungsgebieten (1-3). 2008 führten Manson und Dunhill folgende Definition des Begriffs ein: „regenerative medicine replaces or regenerates human cells, tissue or organs, to restore or establish normal function“ (3). Der Begriff des tissue engineering (engl. für: Gewebekonstruktion/-züchtung) ist eng mit der regenerativen Medizin verknüpft (4-7). Ein wichtiger Aspekt der regenerativen Medizin ist die Ausbildung neuer Blutgefäße, die Angiogenese. Diese ist für die Regeneration und das Einheilen von Gewebstransplantaten essentiell, da sie die Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen, Immunzellen und Wachstumsfaktoren gewährleistet. Die therapeutische Angiogenese verfolgt zwei Hauptziele: zum einen die Expansion des bereits bestehenden Gefäßnetzwerkes zur Versorgung ischämischen Gewebes und zum anderen eine zügige Invasion von neuen Gefäßen in hergestellte Gewebstransplantate (8).

Regenerative Verfahren sind auch in der rekonstruktiven Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie von immenser Wichtigkeit und finden bei verschiedenen Krankheiten Anwendung (4, 5). Bei der Versorgung von Defekten der oralen Mukosa sowie der Zähne werden die in der Definition genannten Prinzipien der regenerativen Medizin verfolgt. So werden im Rahmen der geführten Gewebsregeneration (engl.: guided tissue regeneration; GTR) und der geführten Knochenregeneration (engl.: guided bone regeneration; GBR) Kollagenmembranen mit großem Erfolg benutzt, die eine bessere Heilung des Gewebes in klinischen Studien versprechen (9). Die Membranen dienen hierbei als okklusive Barriere und verhindern das Einwachsen von Gingiva in das knöcherne oder periodontale Wundbett (10). Die Angiogenese wird jedoch nicht direkt durch die Kollagenmembranen indiziert, weshalb die Kombination mit proangiogenen Verfahren wie etwa Thrombozytenkonzentraten einen klinischen Vorteil verspricht.

Thrombozytenkonzentrate wurden seit Mitte des letzten Jahrhunderts in der oralen Wundversorgung und dem Knochenaufbau als Methode etabliert. Die Einführung des platelet rich fibrin (PRF) durch Choukroun et al. als Thrombozytenkonzentrat der zweiten Generation erfolgte Anfang der 2000er Jahre. Durch sein hohes proangiogenes Potenzial, stellt es eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit innerhalb der regenerativen Medizin dar (11). Durch die Verbesserung der Angiogenese und die leichte Handhabung kann eine Verbindung von PRF und Kollagenmembranen die Okklusion des Defekts gegenüber einwachsendem gingivalem Weichgewebe und der Sicherstellung des Gefäßeinsprießens in den Defekt in einer Methode verbinden.

Das A-PRF+ ist ein bereits etabliertes Verfahren sowie auch die Verwendung von nativen Kollagenmembranen. Beide Verfahren haben ihre Stärken und Schwächen. So sollen durch die Kopplung von Kollagenmembranen mit PRF die geringe Stabilität des PRF und das niedrige angiogene Potenzial der Kollagenmembran durch den jeweiligen Kopplungspartner verbessert werden.

## **1.2 Zielsetzung**

In der vorliegenden experimentellen Studie wurden die Auswirkungen von biologisierten, porcinen Kollagenmembranen auf die Angiogenese in vitro und in vivo gemessen (s. Tab. 3.2).

Hierfür wurden die verwendeten Kollagenmembranen durch die Kopplung mit einer A-PRF+-Membran (advanced PRF) biologisiert. In der GTR und GBR entscheiden die Stabilität der Membranen sowie die Angiogenese über den Erfolg der Anwendung (12). Daher scheint die Kopplung einer Kollagenmembran, welche vor allem die Stabilität in der klinischen Anwendung garantieren soll, mit dem PRF vielversprechend, welches durch sein angiogenes Potenzial Einzug in die regenerative Medizin Einzug hielt (11). Die Herstellung der Kollagenmembranen durch Verfahren wie die Kreuzvernetzung hat einen Einfluss auf die Angiogenese und die Regeneration des Gewebes (12). In dieser Studie werden drei verschiedene Kollagenmembranen aus porcinem Kollagen der Typen I und III verwendet. Die Versuche wurden mit einer doppelschichtigen, nicht-kreuzvernetzten Membran aus Kollagen der Dermis (Collprotect), einer einschichtigen, dünnen und kreuzvernetzten Membran aus dem Kollagen des Perikards (Jason) sowie einer ebenfalls nicht kreuzvernetzten Membran aus der Dermis (Mucoderm) durchgeführt. Die letztgenannte Membran ist aktuell ausschließlich zur Regeneration von Weichgewebe zugelassen.

Es ergeben sich für die durchgeführte Studie folgende Fragestellungen:

1. Zeigen sich in vitro bei den ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Testungen für die biologisierten porcinen Membranen und die PRF-Gruppe vergleichbare VEGF (vascular endothelial growth factor) und TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor) Werte? Zeigen die biologisierten Kollagenmembranen eine höhere Konzentration der o.g. Wachstumsfaktoren als die nativen Kollagenmembranen?
2. Können in vivo Modelle mit Hühnerembryonen quantitativ eine vermehrte Angiogenese, u.a. gemessen durch Gefäße pro mm<sup>2</sup> und Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup>, für die PRF- und die biologisierten Kollagenmembran-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachweisen? Zeigt sich in der Gruppe der nativen Kollagenmembranen ein Unterschied zu der unbehandelten Kontrollgruppe im Sinne einer veränderten Angiogenese?
3. Beeinträchtigt die Kopplung der PRF-Membran mit einer Kollagenmatrix das angiogene Potenzial der Methode in den in vitro und in vivo Versuchen?
4. Zeigt sich in den in vitro und in vivo Versuchen ein Unterschied zwischen den verwendeten Kollagenmatrices bezüglich ihres angiogene Potenzials?

## **2 Literaturdiskussion**

Die Literaturdiskussion der vorliegenden Arbeit soll die durchgeführten Versuche zur Angiogenese in den aktuellen Stand der Forschung einordnen und eine Hinführung zu der Diskussion geben.

Hierfür werden zunächst Regenerative Verfahren der rekonstruktiven Chirurgie beschrieben und im Rahmen dessen der Einsatz von Kollagenmembranen besprochen. Anschließend sollen die Angiogenese und vor allem die Wichtigkeit von VEGF und TGF- $\beta$  für die Angiogenese beschrieben werden. Die Angiogenese wird schließlich in der regenerativen Medizin eingeordnet, was vor allem an ihrer grundlegenden Relevanz für die Regeneration von Weich- und Knochengewebe liegt. Anschließend wird auf das PRF als Verfahren eingegangen. Hierbei soll der Zusammenhang von PRF und Angiogenese im Mittelpunkt stehen.

### **2.1 Regenerative Verfahren in der rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie**

Ausgeprägte dentale und parodontale Defekte stellen in der regenerativen Zahnheilkunde sowie der rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ein großes Problem dar. Durch das geringe Potenzial an selbstständiger Regeneration werden protrahierte Krankheitsverläufe beobachtet (13). Die Funktionalität der Mundhöhle ist essentiell beim Kauen, der Phonation und unter ästhetischen Gesichtspunkten. Deshalb sind regenerative Verfahren zur Wiederherstellung der Funktionen von hoher Wichtigkeit (14).

Die Ursachen für Defekte in der Mundhöhle können vielfältiger Natur sein. Sie reichen von kongenitalen Fehlbildungen über chemische und physikalische Irritationen sowie Traumata hin zu mikrobiologischen Besiedelungen. So sind bei den mikrobiologischen Ursachen vor allem Karies und Parodontitis zu nennen, welche beide durch ihre hohe Prävalenz in der Bevölkerung imponieren (5, 14, 15). Aber auch autoimmune und tumoröse Geschehen können Ursachen für orale Defekte sein (14). Wenn man das oropharyngeale Karzinom und Karzinome der Mundhöhle zusammenfasst, gehören orale Karzinome zu den häufigsten Tumorarten weltweit (16). Gerade die Defektdeckung im Rahmen der Tumorchirurgie stellt eine hohe Herausforderung dar. Gleichzeitig ist eine suffiziente Rekonstruktion des Gewebes für die Patienten wichtig, die häufig postoperativ an sozialer Isolation durch ein verändertes Aussehen und Schwierigkeiten

beim Sprechen, Essen und Trinken leiden. Dies führt zu einem Verlust an Lebensqualität (16). Auch Kiefernekrosen, die durch Medikamente oder eine Radiatio induziert wurden, gehen mit oralen Defekten einher und bedürfen dementsprechend einer schnellen und effizienten Versorgung (17). Sehr häufig eingesetzte Medikamente, die zu entsprechenden Osteonekrosen der Kieferknochen führen sind Bisphosphonate (17, 18). Doch es wurden auch für verschiedene Antikörper, wie Denosumab, Bevacizumab und Sunitinib, entsprechende Nebenwirkungen gezeigt (17, 19-21).

Es sind verschiedene Methoden in der klinischen Anwendung, um die Regeneration von oralem Weich- und Knochengewebe zu unterstützen. Das Gewebe in der Mundhöhle weist eine hohe Komplexität und Diversität auf. Das stellt eine immense Anforderung an die angewendeten Methoden dar und erklärt die Fülle an Möglichkeiten. Zu nennen sind Barrieremembranen, Knochenersatzmaterialien sowie bioaktive Wachstumsfaktoren wie knochenmorphogenetische Proteine (engl.: Bone morphogenetic proteins; BMP) und Schmelz-Matrix-Derivate (engl.: enamel matrix derivative; EMD) (22). Das Konzept von Thrombozytenaggregaten, welche aus direkt vor der Intervention von den Patienten abgenommenem Blut hergestellt werden können, gewann in den letzten Jahren stetig an Bedeutung (22, 23). Viele dieser Wachstumsfaktoren finden sich in hoher Konzentration in dem PRF. Dies führt zum klinischen Einsatz in diesem Bereich. Ein Anwendungsbereich ist der periimplantäre Einsatz von L-PRF zur Socket Preservation (22, 24, 25) L-PRF wird ebenfalls im Rahmen eines Sinuslifts eingesetzt, um den Knochen vor dem Einsetzen des Implantats zu verstärken (25, 26). Häufig wird das PRF mit einem Transplantatmaterial gekoppelt, was zu besseren Ergebnissen führt (25).

Ein zentraler Bereich der regenerativen Medizin ist das tissue engineering. Hierbei soll durch die Verwendung von einer Kombination aus Zellen und Trägermatrices eine Wiederherstellung des zerstörten oder funktionsuntüchtigen Gewebes erreicht werden (6). In der regenerativen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wurde das tissue engineering durch die Benutzung von nicht-resorbierbaren Membranen zur GTR als Behandlungskonzept populär (27). In der Implantologie ist die GBR mittels Membranen für die Augmentation des Knochens wichtig. Dieser Behandlungsweise liegt die von Melcher postulierte Annahme zugrunde, dass es bei exponierten Zahnwurzeln zu einer Repopulation desjenigen Zelltyps kommt, welcher sich dort zuerst ansiedelt (27-29). Das Parodontium ist ein komplexes Gebilde aus vier verschiedenen bindegewebigen Anteilen: der Lamina propria der Gingiva, dem Parodontalligament, dem Cementum dentis und dem Alveolarknochen (28, 30). So ist zur optimalen Regeneration eine

Besiedelung von mesenchymalen Stammzellen des parodontalen Ligaments oder aus der perivaskulären Region des Knochens notwendig. Im Gegensatz dazu führt die Besiedelung mesenchymaler Stammzellen eines anderen Ursprunges zur Ausbildung einer Narbe (27). Stammzellen bieten einen interessanten Ansatz für die regenerative Medizin. Sie können nach entsprechender Gewinnung aus Biopsien und anschließender *in vitro* Züchtung reimplantiert werden. Bei erfolgreichem Anwachsen im Defekt kommt es zu der Regeneration des Gewebes. Zellen aus dem adulten Organismus besitzen jedoch meist nur noch ein eingeschränktes Proliferationspotenzial (31). Eine vielversprechendere Methode ist die Gewinnung von MSCs (Mesenchymalen Stammzellen), welche anschließend *in vitro* vermehrt werden. Anschließend kommt es zum Aussäen auf einer Matrix natürlichen oder synthetischen Ursprungs mit einer weiteren Inkubationsphase. Optimalerweise kommt es zur Zelladhäsion an die Matrix und der Differenzierung und Proliferation unter Zugabe von entsprechenden bioaktiven Faktoren. Schließlich kann das Scaffold implantiert werden, um zur Regeneration des Defekts beizutragen (15).

Aufgrund der Diversität der Einsatzgebiete für regenerative Verfahren in der Medizin, ist die Verwendung und Erforschung verschiedener Biomaterialien notwendig, um den Ansprüchen der regenerativen Medizin gerecht zu werden.

Biomaterialien müssen verschiedene Aufgaben bewältigen. Sie dienen der Zelladhäsion für regenerative Zellen der umliegenden Gewebe und als Gerüst für die Gewebsregeneration. Des Weiteren können sie als Trägersubstanz von odontogenen Zellen, welche sich in das defekte Gewebe differenzieren können, sowie bioaktiven Molekülen wie Wachstumsfaktoren fungieren (31-35).

Viele Biomaterialien imitieren den dreidimensionalen Aufbau der natürlichen Extrazellulärmatrix (EZM). Dies soll eine gute mechanische Stabilität garantieren und als Gerüst für den Neuaufbau des Gewebes dienen. Gerade bei der Rekonstruktion von Knochengewebe muss das eingesetzte Scaffold eine ausreichende mechanische Stabilität gewährleisten (31). Biologisch abbaubare Materialien kommen häufig zum Einsatz, da hier parallel zum Abbau des Scaffolds ein Einwachsen von körpereigenem Gewebe stattfindet. Dieses ersetzt das Transplantat über die Zeit. Trotzdem stellt die Vaskularisierung von größeren Transplantaten (> 4 cm) ein Problem dar. Hierfür werden die Scaffolds mit Stammzellen, Endothelzellen oder bioaktiven Molekülen biologisch aktiviert. Dies soll u.a. zu einer schnelleren Vaskularisierung und Rekonstruktion des Gewebes führen (31, 36).

### **2.1.1 Prävasikularisierung**

Die schnelle und vollständige Vaskularisierung ist essentiell für das Überleben von Transplantaten. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass die Diffusionsstrecke von Sauerstoff aus dem versorgenden Gefäß im Gewebe etwa 150-200 µm beträgt (37-39). Aktuell gibt es drei Ansätze, welche die Angiogenese in Zusammenhang mit dem tissue engineering verbessern sollen: Scaffolds, die Wachstumsfaktoren freisetzen, Kokulturen von Ziel- und Endothelzellen sowie mittels Mikrofabrikationstechniken oder dezellularisiertem Gewebe konstruierte Gefäßnetzwerke (13). Als Prävasikularisierung von Transplantaten beschreibt man ein Konzept, das sich Mikrofabrikationstechniken und Kokulturen von Ziel- und Endothelzellen bedient. Dies führt zu der Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerkes in dem Transplantat noch vor der Implantation. In vivo soll dies zu einer schnellen Verbindung mit den Gefäßen des Wirtskörpers führen und damit die Versorgung des Transplantats sichern (13).

Zu den o.g. Zielzellen gehört eine Vielzahl verschiedener Zellen. Häufig in der Anwendung sind mesenchymale Stammzellen (engl.: mesenchymal stem cells, MSC), die aus Knochenmark oder Fettgewebe gewonnen werden können (40). Sie können aber auch aus den in der Mundhöhle vorkommenden Geweben, parodontalem Ligament, Zahnpulpa und humanen Milchzähnen isoliert werden (41, 42). Orale Stromazellen wie Keratinozyten und Fibroblasten und induzierte pluripotente Stammzellen können ebenfalls verwendet werden (13, 43). Man geht davon aus, dass die Kokultur von Stammzellen und Endothelzellen im Verhältnis 1:1 von immenser Wichtigkeit für die Prävasikularisierung ist. Hierbei unterstützen die Stammzellen das sich ausbildende Gefäßnetzwerk (13). Einaktuelles Problem stellt das Aussäen der Endothelzellen auf den Scaffolds dar, da es bisher nicht möglich ist, eine gleichmäßige Verteilung der Endothelzellen zu gewährleisten. Des Weiteren gibt es trotz des Aussäens keine Garantie für die Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes in vitro, da hierfür Wachstumsfaktoren wie VEGF und PDGF (platelet derived growth factor) sowie andere Zelltypen benötigt werden. Dies setzt entsprechende Bedingungen in vitro für die Angiogenese voraus (37).

### **2.1.2 Bioaktive Faktoren**

Zu den bioaktiven Faktoren gehören Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine. Sie haben vielfältige Effekte auf die Differenzierung von Zellen, die Immunantwort und damit auch auf die Gewebsregeneration (44).

Durch den Einsatz von bioaktiven Faktoren möchte man sich das regenerative Potenzial des Körpers zunutze machen. Wichtige Vertreter sind FGF (Fibroblast growth factor), TGF- $\beta$ , VEGF und BMP. Eine ihrer Aufgaben ist die Kontrolle des Zellzyklus, also ob Zellen in der G0-Phase, der ruhenden Phase, verbleiben oder in die G1-Phase übergehen und damit die Zellteilung in Gang kommt. Darüber hinaus sind sie auch für das Überleben und die Differenzierung der Zellen zuständig (45).

BMP ist zum Beispiel für die Differenzierung von Osteoblasten geeignet, VEGF stimuliert das Wachstum von Gefäßen, FGF spielt eine wichtige Rolle in der Odontogenese und TGF- $\beta$  führt zur Differenzierung von Fibroblasten. Dies unterstützt die Gewebsregeneration (45).

In vivo zeigt sich, dass Wachstumsfaktoren und Zytokine einen großen Einfluss auf das erfolgreiche Einheilen von implantierbaren Konstrukten haben. Gerade im Rahmen von Matrices, die mit Stammzellen besät wurden, ist die Inkubation vor Implantation in einem Nährmedium mit bioaktiven Faktoren wichtig (15). Man kann sich die Eigenschaften der bioaktiven Faktoren zunutze machen, um spezielle Zellen im Defekt zur Proliferation anzuregen und die Immunantwort des Wirts zu modulieren (44). Ihre proangiogenen Eigenschaften sollen in späteren Kapiteln durchleuchtet werden.

### **2.1.3 Guided tissue regeneration and guided bone regeneration**

Die GTR kommt im Zusammenhang mit parodontalen Defekten zum Einsatz. Der Alveolarknochen befindet sich in ständigem Umbau. Die Balance zwischen Knochenaufbau und -abbau ist ein Zusammenspiel vieler verschiedener Zelltypen und Signalwege (5, 30, 46).

Die GTR und GBR werden in der Implantologie als feststehende Termini verwendet und sind wichtige Werkzeuge, um vor dem Einsetzen von Zahnimplantaten Knochen- und Weichgewebe aufzubauen (9). Im Rahmen der GBR nehmen Barrieremembranen in der klinischen Anwendung einen wichtigen Platz ein (9). Zuerst wurde das Konzept von Dahlin et al. beschrieben. Sie postulierten, dass die Migration von Weichgewebe in den Knochendefekt zu einer verminderten und gestörten Knochenheilung führt. Der Einsatz einer Barrieremembran zum Schutz des Knochendefekts verhindert diese Migration. Dies erlaubt osteogenetischen Progenitorzellen die Proliferation und führt zu einer besseren Regeneration des Knochengewebes (47).

Die Barrieremembranen können im Allgemeinen in zwei Kategorien eingeteilt werden: resorbierbare und nicht-resorbierbare Membranen. Der populärste Vertreter der nicht-resorbierbaren Membranen sind die expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)-

Membranen. ePTFE wurde aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und Stabilität sowie den Erfolgen in Studien als Goldstandard akzeptiert (9). Da allerdings nicht-resorbierbare Membranen nach einiger Zeit entfernt werden müssen und die Besiedelung durch Bakterien zu einer frühzeitigen chirurgischen Intervention führen kann, gewinnen Kollagenmatrices an Einfluss in der klinischen Anwendung (12, 48, 49).

## **2.2 Kollagenmembranen**

### **2.2.1 Geschichte**

Kollagenmatrices finden in vielen Bereichen der oralen Chirurgie Anwendung. Sie werden in der Implantologie und Parodontologie zur Unterstützung der Regeneration von Weich- und Knochengewebe eingesetzt (50-52). Die Kollagenmatrices sind ein wichtiger Behandlungsansatz in der GTR und GBR (53). Sie gehören zu den resorbierbaren Membranen (12, 54, 55). Kollagenmatrices haben durch das natürliche Vorkommen von Kollagen und seiner Rolle in der Formung eines Koagulums entscheidende Vorteile gegenüber anderen resorbierbaren Membranen (12, 56).

An dieser Stelle muss die Verwendung von allogenen, xenogenen, autologen und alloplastischen Materialien unterschieden werden. Allogen beschreibt hierbei Gewebe, das von einem anderen Subjekt derselben Spezies zur Transplantation gewonnen wird (57). Xenogenes Gewebe hingegen entstammt einem Subjekt einer dem Akzeptor fremden Spezies (58). Autologe Transplantationen beschreiben die Entnahme von Gewebe aus einem Subjekt an einer bestimmten Körperstelle und die anschließende Transplantation an eine andere Stelle des Körpers. Alloplastisch hingegen ist definiert als Implantation von synthetischen Materialien wie etwa Titan, bioaktives Glas oder Polymere in den Körper (59).

Kollagenmatrices bestehen meist aus xenogenem Material, d.h. aus dem Korium, Achillessehnen oder Perikard von Schweinen oder Rindern (60, 61). Im Gebiet der Implantologie und Parodontologie konkurrieren die xenogenen Kollagenmatrices mit anderen extrazellulär-matrix-basierten Membranen, wie azellulärer dermalen Matrix (ADM). Alternativ können lokale Defektdeckungen durchgeführt werden (52, 62).

Vorteile der Kollagenmatrices gegenüber der Benutzung allogenen Materials sind die hohe Verfügbarkeit, die fehlende Notwendigkeit eines menschlichen Donors sowie niedrige Kosten in der Herstellung und Bereitstellung (63, 64). Wichtig für die Wirkweise der Kollagenmatrix im Rahmen der GTR und GBR sind die bereits angesprochene Induktion der Hämostase (53, 56) und eine Chemotaxis von Fibroblasten

(53, 65). Auch ihre leichte Handhabung, die Möglichkeit zur Weichgewebsaugmentation (52, 53) und eine ausbleibende oder nur gering ausgeprägte Immunreaktion auf das eingesetzte Material sind positiv hervorzuheben (66, 67). Entscheidende Nachteile von Kollagenmatrices sind der schnelle Abbau und die damit einhergehende Invasion von Zellen des Weichgewebes im Rahmen der Knochenaugmentation. Diese kann dazu führen, dass die Knochenregeneration durch die Invasion gestört wird und somit weniger effektiv stattfindet (12).

### 2.2.2 Herstellung

Die aktuelle Forschung geht von 28 verschiedenen Kollagenproteinen aus. Eine eindeutige Definition des Kollagens fehlt bis heute. Im Allgemeinen handelt es sich um tripelhelikale Proteine, die wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Geweben sind. Bei Säugetieren kommt Kollagen Typ I am häufigsten vor (68-70). Die verwendeten Kollagenmatrices bestehen meist aus den Kollagenen des Typs I und III., Beide werden zu den fibrillären Kollagenen gezählt (56, 60, 70, 71). Das für die Matrices benötigte Kollagen kommt entweder aus tierischen Quellen oder wird rekombinant hergestellt (72). Häufig werden hierfür Schweinehaut, -perikard, Rindersehnen, -perikard, die Schwänze von Ratten oder die Haut von humanen Leichen verwendet (72, 73).

Als Alternative hierzu ist rekombinantes Kollagen zu nennen. Um dieses herzustellen werden u.a. Hefepilze, Säugetierzellen und Tabakpflanzen benutzt (72, 73). Rekombinantes Kollagen umgeht einige der Schwächen der Gewinnung tierischen Kollagens. Zu diesen zählen Qualitätsunterschiede zwischen gleichen Produkten, die Übertragung pathogener Faktoren und ethische Probleme durch die Benutzung von Tieren. Trotzdem konnte es bisher noch nicht das tierische Kollagen in der Anwendung ersetzen. Dies liegt an hohen Produktionskosten, einem geringen Ertrag bei der Herstellung und dem Fehlen von Kofaktoren und Enzymen, welche essentiell für die Stabilität und Biofunktionalität des Kollagens sind (72, 73).

Wichtig für den Einsatz der Kollagenmatrices sind deren Eigenschaften wie mechanische Stabilität und enzymatischer Abbau, welche von der Kreuzvernetzung, der mechanischen Zertrümmerung und der Denaturierung der Tripelhelix abhängig sind (61).

Es kommen verschiedene Verfahren für die Kreuzvernetzung des Kollagens in Frage. Diese können in physikalische und chemische Verfahren eingeteilt werden (53, 61, 74). Zu den physikalischen Verfahren zählen die Bestrahlung mittels  $\gamma$ -Strahlung sowie der

Einsatz ultravioletten Lichtes. Chemische Verfahren umfassen u.a. die Benutzung von Glutaraldehyd (GA), Diisocyanat, Azylazide oder Epoxiden (53, 61, 74, 75).

Zur Beendigung des Herstellungsprozesses müssen die Membranen getrocknet und sterilisiert werden, hierfür kommen verschiedene Methoden in Frage (61). Das Verfahren der Trocknung ist entscheidend für die Größe der Räume zwischen den Kollagenfibrillen. Bei einem konvektionsbasierten Trocknungsvorgang kommt es zu einem Kollaps der Fibrillen und Moleküle des Kollagens und gleichzeitig werden die Abstände zwischen den Fibrillen auf ein Minimum verkleinert, was durch die Rehydrierung nur noch partiell aufgehoben werden kann (61, 76). Eine weitere gängige Methode ist die Lyphophilisation (Gefriertrocknung). Hierbei wird die Kollagenmatrix auf Temperaturen von -15 bis -80 °C herabgekühlt und die in der Matrix enthaltenen Wassermoleküle gefrieren zu Eiskristallen. Dadurch werden die Kapillarkräfte, welche zu einer Annäherung der Kollagenfibrillen bei der konvektionsbasierten Trocknung führen, umgangen. Im Vakuum kann das Eis durch Sublimation entfernt werden und die Struktur der zurückgebliebenen Poren entspricht derjenigen der Eiskristalle (61, 77, 78). Die Sterilisation wird u.a. durch  $\gamma$ -Bestrahlung, Ethylenoxid oder Peressigsäure erreicht (61). Ein Nachteil der  $\gamma$ -Bestrahlung ist der schädigende Effekt auf die DNA der Zellen sowie die Bildung von Radikalen, welche eine Wirkung auf noch enthaltene Proteine, Lipide und Endotoxine haben (61, 79). Das Verfahren ist einfach durchführbar, sicher und energetisch effizient. Des Weiteren ist eine effektive Elimination von Viren, Bakterien und Pilzen möglich (79). Es gibt widersprüchliche Forschungsergebnisse bezüglich der Veränderung der Kollagenstruktur durch die  $\gamma$ -Bestrahlung. Es wird sowohl von unveränderten Kollagenmatrices als auch Strukturschäden in Abhängigkeit von der Strahlendosis berichtet (79-81). Bei der Behandlung durch Ethylenoxid sind keine Veränderungen der Kollagenstruktur erkennbar. Es werden Effekte an den Seitenketten des Kollagens kontrovers diskutiert, durch die eine verminderte Abbaurrate durch Kollagenasen beschrieben wird (61, 80, 81).

### **2.2.3 Eigenschaften der Kollagenmatrices**

Der Abbau der Kollagenmatrices durch das umgebende Gewebe stellt einen entscheidenden Faktor für den Vorgang der Regeneration dar. Er ist bedeutend für die Dauer der Ausbildung eines neuen, funktionstüchtigen Gewebes (60). Auf der einen Seite steht die Stabilität der Membran. Sie ist im Rahmen der GBR wichtig, da die Kollagenmatrix das Einwandern von ungewollten mesenchymalen Zellen und Weichgewebe in das Wundbett verhindern soll. Dadurch wird eine ungestörte

Knochengewebsregeneration ermöglicht (60). Für eine höhere Stabilität werden in Tierversuchen und in der klinischen Praxis Doppelschicht-Techniken beim Einsatz der Kollagenmembranen angewendet. Diese zwei Schichten verbinden vorteilhafte Eigenschaften. Eine der Schichten hat eine feste und glatte Oberfläche für eine bessere Wundheilung. Die andere Schicht besitzt eine löchrige Oberfläche für eine bessere Gewebsintegration und Vaskularisation (52, 60, 82, 83).

Die Kreuzvernetzung der Matrix ist eine weitverbreitete Technik, die zu einer höheren Stabilität sowie einem längeren Abbauprozess führt. Dies belegen *in vitro* und *in vivo* Studien (12, 60, 84). Gleichzeitig gibt es Forschungsergebnisse, die nahelegen, dass die Kreuzvernetzung auch zu vermehrten Fremdkörperreaktionen, einer verminderten Integration der Kollagenmatrices in das Gewebe und einer verminderten Vaskularisation führt (12). Dies wird auf die Morphologie der Matrix und damit die Größe der Poren zurückgeführt (60).

Die Beschaffenheit der Oberfläche der Membran ist wichtig, wie schon im Rahmen der Doppelschichttechnik angesprochen. Verschiedene Zelltypen bevorzugen unterschiedliche Oberflächen. Im Allgemeinen bieten raue Oberflächen mit großen Poren eine bessere Möglichkeit zur Zelladhäsion. Besonders Osteoblasten scheinen solche Oberflächen zu bevorzugen (85, 86). Eine schnelle Zelladhäsion ist entscheidend für das Überleben der Zellen und damit die spätere Proliferation von Osteoblasten und Fibroblasten. Dies kann entscheidend für eine bessere Gewebsregeneration sein (87, 88). Gleichzeitig ist durch Osteoblasten und Fibroblasten physiologisch eine Integrin-vermittelte Adhäsion an Kollagen Typ I beschrieben. Dies ist ein weiterer Vorteil von Kollagenmatrices gegenüber Ersatzmaterialien (89, 90).

Zuletzt ist die Biokompatibilität der Kollagenmatrix ein wichtiger Faktor für das regenerative Potenzial (60). Prinzipiell wird bei der Verwendung von Kollagen als Grundstoff für die Matrices sowohl in Tierversuchen als auch in der klinischen Anwendung keine Immunogenität beschrieben (66). Allerdings werden für die Kreuzvernetzung mittels GA eine schlechtere Biokompatibilität der Kollagenprodukte beschrieben, da nach der abschließenden Reinigung und Sterilisation eine Restmenge am Kollagen verbleibt. Die schlechtere Biokompatibilität hängt mit der Zytotoxizität von GA zusammen (91-93). So beschreiben van Luyn et al. bereits 1992, dass mit GA kreuzvernetztes Kollagen noch bis zu 42 Tage nach Einsatz zytotoxische Wirkung im Zusammenhang mit Fibroblasten entfaltet, die für die Ausbildung von Kollagen zuständig sind. Die Ausbildung neuen Kollagens ist wiederum wichtig für die Gewebsregeneration (93).

## 2.3 Angiogenese

Den Prozess der Gefäßneubildung unterscheidet man in drei grundlegende Arten: Die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Arteriogenese (94, 95). Des Weiteren muss die Angiogenese von Blut- und Lymphgefäßen unterschieden werden. Im Folgenden wird vor allem auf die Blutgefäßneubildung eingegangen, da diese für die Arbeit von hoher Relevanz sind.

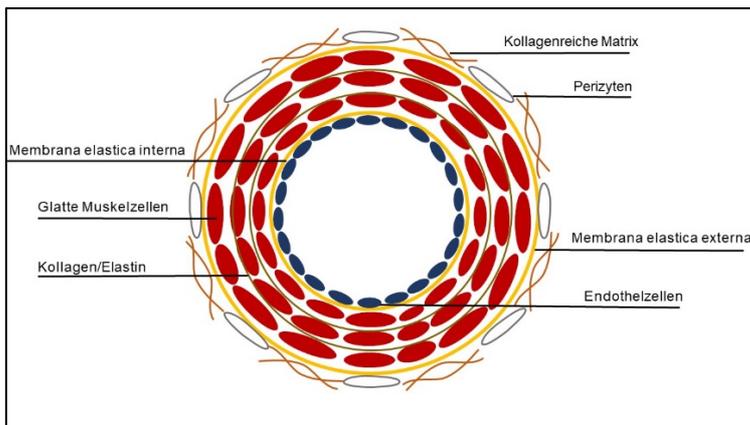
Die Vaskulogenese beschreibt die de novo Entstehung von Gefäßen aus den Angioblasten sowie den mit ihnen verwandten endothelialen Vorläuferzellen (engl.: endothelial progenitor cell, EPC) (96). Die Angioblasten lösen sich während der Embryonalentwicklung aus extraembryonalem und embryonalem Mesoderm. Sie führen zu der Bildung der ersten aus Epithelzellen bestehenden Gefäßen (96, 97). Die EPCs kommen auch im adulten Organismus vor (98). Sie sind beispielsweise Teil des Umbaus nach myokardialen Infarkten (99), der Atherosklerose (100), der Revaskularisation von Wunden (101), aber auch der Endometriose (102) und des Tumorwachstums (103, 104). Unter der Angiogenese versteht man die Ausbildung neuer Gefäße aus einem bereits existierenden vaskulären Netzwerk. Die Angiogenese ist essentiell für die Ausbildung des Blutkreislaufes mit Arterien, Arteriolen, Kapillargefäßen, Venolen und Venen (105) und tritt physiologisch bei Ischämien und Wundheilungen auf. Gleichzeitig können Störungen der Angiogenese zu Pathologien des Organismus führen (94, 106, 107).

Die Arteriogenese beschreibt die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen. Diese legen sich um die Endothelzellkanäle, die während der Angiogenese entstanden sind. Dadurch stabilisieren sie diese, um sie vor erneutem Abbau zu schützen (107). Sie ist eng mit der Angiogenese verbunden und steht ihr zeitlich nachgestellt in der Ausbildung funktionsfähiger Gefäße.

Die Angiogenese wurde erstmals 1794 von John Hunter, einem schottischen Anatom und Chirurgen, beschrieben (108). Er entdeckte, dass sich die Vaskularisation eines Gewebes an seine metabolischen Bedürfnisse anpasst (108). Die moderne Forschung zu dem Thema wurde durch Judah Folkman begründet, welcher erkannte, dass das Tumorwachstum entscheidend von der Angiogenese bedingt wird (109, 110). Seitdem rückte die Angiogenese als therapeutisches Mittel gegen Tumoren und andere Krankheiten in den Mittelpunkt der klinischen Forschung.

### 2.3.1 Anatomischer Aufbau von Blutgefäßen

Ein Blutgefäß besteht aus der Tunica intima, der Tunica media und der Tunica adventitia (111). Hierbei besteht die Tunica intima aus einer einfachen Schicht platten Endothels (s. Abb. 2.1). Dieses ist abluminal von der Basalmembran überzogen, dem Stratum subendotheliale. Zu dem Stratum subendotheliale gehören v.a. EZM und die Membrana elastica interna, welche aus elastischen Fasern besteht und in ihrer Stärke variiert (Arterien = starke Ausprägung; Venen = schwache Ausprägung). Das Endothel dient als Barriere zwischen dem im Lumen fließenden Blut und dem umgebenden Parenchym. Es ist essentiell für die Vasokonstriktion und -dilatation sowie für Mechanismen der Koagulation und des Immunsystems. Die Tunica media besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagen und Elastin und regelt die Durchblutung und die Gefäßkontraktion. Sie wird durch die Membrana elastica externa von der Tunica adventitia getrennt, welche hauptsächlich aus kollagenen und elastischen Fasern besteht (111, 112). Der Aufbau von Kapillaren besitzt drei Anteile: Endothel, Basalmembran und von außen stabilisierende Perizyten und glatte Muskelzellen (111).



**Abbildung 2.1: Anatomische Darstellung des Aufbaus eines Blutgefäßes. Modifiziert nach Mazurek et al. (111).**

Blutgefäße bestehen aus Tunica intima, media und adventitia. Vom Lumen aus gesehen besteht die innerste Schicht aus Endothelzellen. Die Tunica media wiederum besteht vor allem aus glatter Muskulatur und elastischen Fasern. Schließlich schließt die Tunica adventitia das Gefäß nach außen ab.

### 2.3.2 Angiogenese auf zellulärer und molekularer Ebene

Bei der Angiogenese werden zwei wichtige Vorgänge unterschieden: Das Aussprossen (engl.: Sprouting) und das Spalten (Intussuszeption) von Gefäßen durch morphologische Veränderungen der Endothelzellen (112-114). Ein fein austariertes System an Wachstums-, Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden ist für die Aufrechterhaltung des Gefäßnetzwerkes im adulten Organismus verantwortlich. An diesem System sind

u.a. die Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- $\beta$ , FGF (fibroblast growth factor), TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor), Angiopoetine, Interleukine, HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) und die Notch-, Wnt- und Tie (engl.: Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains)-Signalwege beteiligt (94, 95, 106, 115). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass auch die Epigenetik durch nicht-kodierende microRNAs, durch Blockierung der Translation oder Induktion von messenger RNAs einen Einfluss auf die Angiogenese hat (116, 117).

Die Endothelzellen sind von zentraler Bedeutung für die Angiogenese und stehen im Mittelpunkt der Forschung. Eine weitere wichtige Rolle spielen die Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Perizyten (94, 95, 106). Die Differenzierung in endotheliale Tip-, Stalk- und Phalanx Zellen bildet die Grundlage für das Aussprossen von Gefäßen (118). Die Unterscheidung in Tip- und Stalk-Zellen wurde durch Gerhard et al. erstmals vorgenommen. Die Endothelzellen, welche der Führung bei der Aussprossung übernehmen werden Tip-Zellen genannt, die nachfolgenden Zellen hingegen Stalk-Zellen (119). Die Endothelzellen verharren die meiste Zeit ihres Bestehens in der „Quiescence“, d.h. der ruhigen Phase (120). In dieser Phase sind sie von der subendothelialen Basalmembran umgeben, welche aus extrazellulären Matrixproteinen besteht. Die Basalmembran hält die Endothelzellen zusammen, verhindert, dass sie ihre Position verändern, und ist gleichzeitig eine Barriere für die Migration anderer Zellen durch sie hindurch (118, 121). Der erste Schritt des Sproutings besteht in der Freisetzung der Endothelzellen und der Öffnung der Basalmembran. Des Weiteren muss die EZM aufgelockert werden, um die Bildung neuer Gefäße zu ermöglichen.

Der Auslöser der Kaskade ist das VEGF, welches über den VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor) zu einer Aktivierung der Membran Typ 1-Metalloproteinase (MT1-MMP) führt. Diese zieht über den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase)-Weg die Aktivierung der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) nach sich (122). Die MMP2 führt zu einem direkten Abbau der Basalmembran (123, 124) sowie zu einer durch den u-PAR/u-PA (Urokinase) Signalweg vermittelten Proteolyse der EZM. Dieser Vorgang schafft den benötigten Platz für das Wachsen des neuen Gefäßes (125).

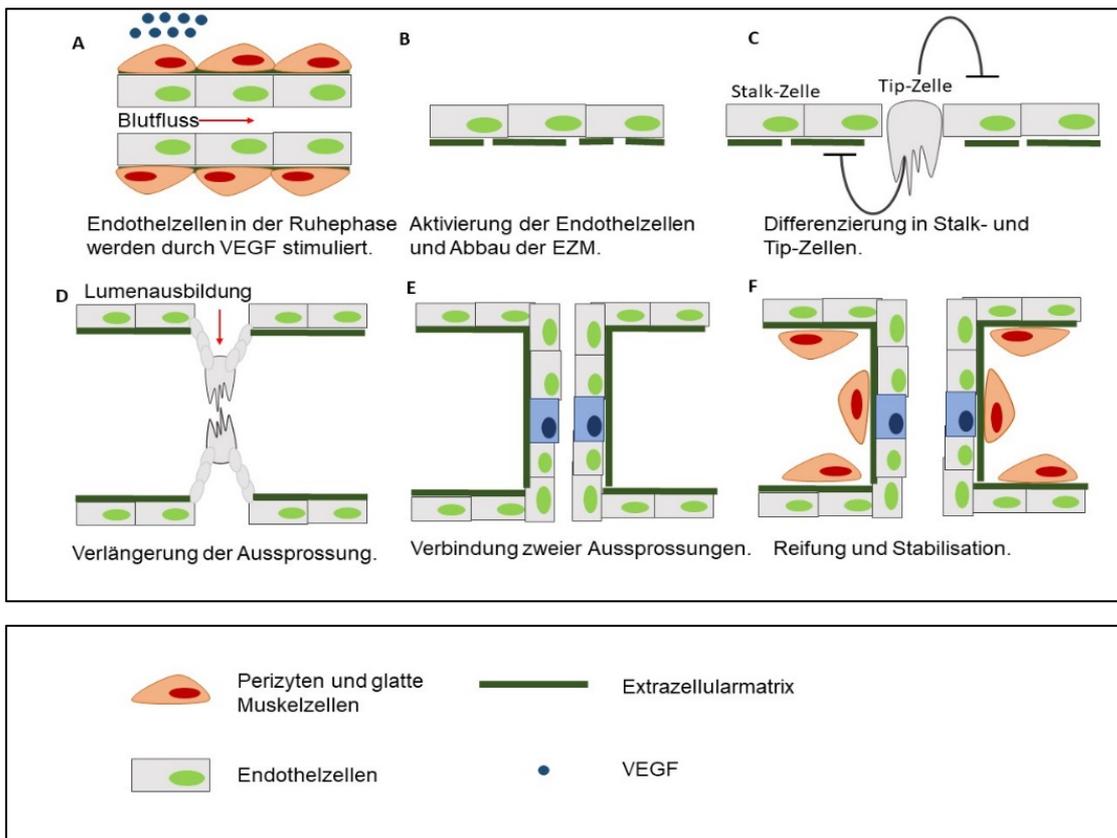
Man konnte zeigen, dass der u-PAR/u-PA Weg eine wichtige Rolle in der Neoangiogenese spielt. So wurde in einem Myokardinfarktmodell in Mäusen mit einem mangelhaften u-PA festgestellt, dass in der Postinfarktzeit die Revaskularisierung erheblich eingeschränkt war (126). Mäuse, deren u-PA genetisch homozygot ausgeschaltet wurde, schienen bei Geburt normal entwickelt, was gegen eine Rolle der

Urokinase während der Embryonalentwicklung und der Vaskulogenese spricht (127). Die MMP2 bildet außerdem einen Komplex mit dem Integrin  $\alpha\beta_3$ , einem Membranrezeptor des Vitronectins. Dieser Komplex führt zu einer verstärkten proteolytischen Aktivität gegenüber der EZM und ist essentiell für die Migration der Endothelzellen (128, 129).

Nach dem Abbau der Basalmembran und der EZM wird die Ruhephase des nun freiliegenden Endothels beendet. Der folgende Prozess der Ausbildung einer Gefäßsprossung kann in drei Phasen unterteilt werden:

1. Auswahl der Tip-Zelle, welche die Zellmigration anführt und durch laterale Inhibition Nachbarzellen daran hindert, sich zu demselben Zelltyp zu differenzieren.
2. Verlängerung der Aussprossung durch Migration der Tip-Zelle entlang eines chemotaktischen Weges, wobei die Stalk-Zellen durch Proliferation den Kontakt zum ursprünglichen Gefäß aufrechterhalten.
3. Ausbildung eines Lumens, welches die Sprossung mit dem ursprünglichen Gefäß verbindet (s. Abb. 2.2).

Nach der Ausbildung einer Aussprossung verbindet sich diese über eine Anastomose mit bereits bestehenden Gefäßen oder anderen Aussprossungen. Die Aussprossungen werden anschließend im Zuge des Zurechtstutzens (engl.: Pruning) reorganisiert (112).



**Abbildung 2.2: Vorgang der Angiogenese**

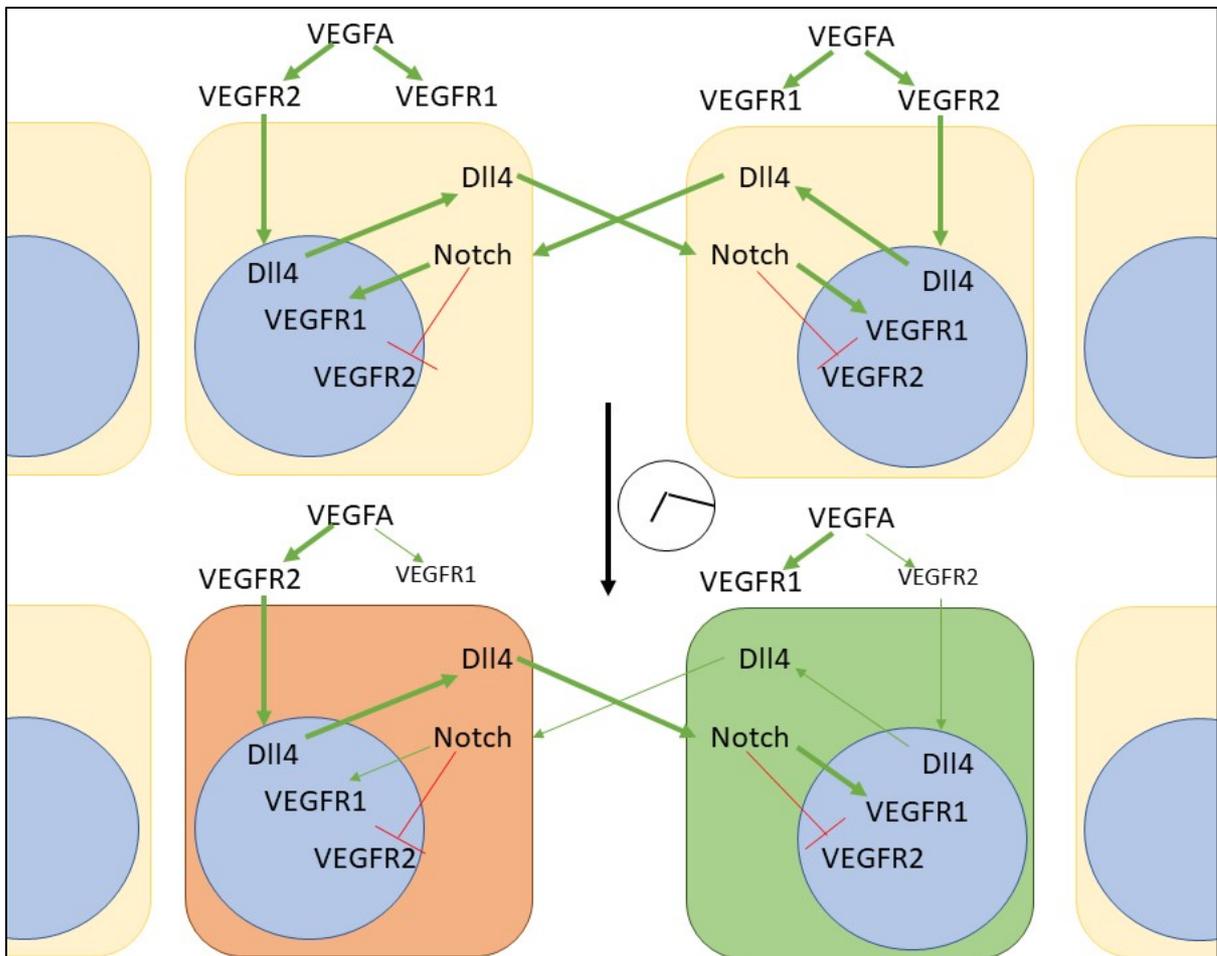
(A) Das ruhende Endothel wird mittels VEGF-A stimuliert. (B) Dies führt zu der Degradation der Basalmembran und der EZM. (C) Es kommt zu der Differenzierung von Tip- und Stalk-Zellen, anschließend wird die Aussprossung verlängert und ein Lumen ausgebildet (D). Die Aussprossungen anastomosieren (E) und durch das Rekrutieren von Perizyten und glatter Muskulatur wird das Gefäß fertig ausgebildet (F). Modifiziert nach Blanco et al. (130).

### 2.3.2.1 Differenzierung der Endothelzellen

Zunächst findet die Differenzierung in Tip- und Stalk-Zellen statt. Auch hierbei spielt VEGF eine zentrale Rolle (95). Die Familie des Wachstumsfaktors VEGF, ein dimeres Glykoprotein, umfasst die sechs Isoformen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und PlGF (Placental growth factor). Diese Isoformen binden mit unterschiedlicher Affinität an die drei Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3. VEGF-A ist durch seine hohe Spezifität für VEGFR1 und VEGFR2 die wichtigste Isoform für die Kontrolle der Angiogenese. VEGFR1 hat eine sehr hohe Affinität zu VEGF-A, aber eine schwache Kinaseaktivität für die morphologische Angiogenese. VEGFR1 ist auch in seiner löslichen Form, dem sVEGFR1 (soluble Vascular endothelial growth factor) von Bedeutung, da er VEGF bindet und verhindert, dass es mit VEGFR2 interagiert (131, 132). Ein Ausfall des Rezeptors führt zu stark vergrößerten Gefäßen und zu erhöhter Embryonalletalität (133). Demzufolge ist das

Verhältnis von VEGFR1 und VEGFR2 entscheidend für eine physiologische Angiogenese. VEGF-C hat eine hohe Spezifität für den VEGFR3 und kann in geringen Maßen auch den VEGFR2 aktivieren (130, 134).

Gerhardt et al. fanden 2003 heraus, dass die Endothelzellen, welche die Führungsrolle beim angiogenen Aussprossen innehaben, eine signifikant höhere VEGFR2 Expression haben (119). Die Stalk-Zellen hingegen sind stark proliferativ, bilden tight junctions aus, um die Stabilität der Aussprossung zu stärken und sind für die Lumenausbildung verantwortlich (119, 135, 136). Die Expression von VEGFR1 ist in beiden Endothelzelltypen gleich hoch und kann nicht den entscheidenden Anstoß zur Differenzierung zu einer Tip-Zelle geben (137). Tammela et al. zeigten, dass VEGFR3 auch in der Angiogenese von Blutgefäßen eine Rolle spielt (138). Bisher wurde seine Wichtigkeit vor allem im Zusammenhang mit der Angiogenese von Lymphgefäßen beschrieben (139).



**Abbildung 2.3: Differenzierung von Tip- und Stalk-Zellen**

Der Einfluss von VEGF über VEGFR1 und VEGFR2 wird über den Dll4/Notch-Signalweg vermittelt. Er führt zu einer Differenzierung von Tip- und Stalk-Zellen über die Inhibition der VEGFR2 Expression in den späteren Stalk-Zellen bzw. einer verstärkten VEGFR2 Expression in den späteren Tip-Zellen. Modifiziert nach (131).

Durch die Aktivierung von VEGFR2 durch VEGF-A kommt es zu einer Bindung des Dll-4 (Delta-like) Liganden an den Notch-Rezeptor der Nachbarzelle. Hier führt die Notch-Signalkaskade zu einer verminderten Expression des VEGFR2 in der Endothelzelle, wohingegen VEGFR1 weiterhin exprimiert wird. Die Endothelzelle hat durch die geringere Zahl an VEGFR2 eine verminderte VEGF-Sensitivität und differenziert zu einer Stalk-Zelle. Gleichzeitig führt auch die Aktivierung von Notch1 zu einer Suppression des Tip-Zellen Phänotyps (140).

Der Notch-Signalweg ist ein zentraler Regulator für die Differenzierung der Endothelzellen und eng mit der VEGF/VEGFR2 Kaskade verbunden. Tip-Zellen verfügen über ein höheres Level an dem Notch Liganden, dem Transmembranprotein Dll4. Stalk- Zellen exprimieren vor allem Notch und Jagged-1 (141, 142). Der Notch-Signalweg führt in Endothelzellen u.a. zu der frühen Spezifikation aus den Angioblasten des Mesoderms während der Entwicklung von Hühnerembryonen (143) und zu der Differenzierung des Endothels in arterielle und venöse Gefäße bei Mäusen (144). In Studien mit Zebrafischen und Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Dll4/Notch Signalweges zu einer Vermehrung der Tip-Zellen und dadurch der Gefäßdichte und der Verzweigungspunkte führte (140, 145, 146).

Dem Dll4/Notch-Signalweg kommt durch Verminderung der Tip-Zellzahl eine wichtige Rolle in der Inhibition der Angiogenese zu. VEGF-A/VEGFR2 und Dll4/Notch haben entgegengesetzte Aufgaben in der Angiogenese und stehen durch einen eng verknüpften negativen Feedbackmechanismus miteinander in Kontakt.

### **2.3.2.2 Führungsrolle der Tip-Zellen, Verlängerung der Aussprossung und Ausbildung eines Lumens**

Die Tip-Zellen führen die Aussprossung des Gefäßes an. Deshalb ist ihre Funktionalität von besonderer Bedeutung für den angiogenen Vorgang. Um diese Funktionalität zu gewährleisten, muss die Zelle ggfs. schnell ausgetauscht werden können (119).

Jakobsson et al. konnten 2010 in vivo und in vitro zeigen, dass die Tip-Zelle dynamisch durch Zellmigration aus dem Bereich der Stalk-Zellen ersetzt wird. Zellen mit einer höheren VEGFR2-Expression haben hierbei einen Vorteil, Zellen mit einer höheren VEGFR1-Expression hingegen einen Nachteil. Dies sei durch den Dll4/Notch-Signalweg zu erklären (131). Arima et al. diskutieren die Bedeutung der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen für die Übernahme der Tip-Zellposition. Ihre Daten zeigen keine Auswirkung des Dll4/Notch-Signalweges auf die Zeit, in der eine Tip-Zelle an ihrer Position bleibt (147).

Die Tip-Zellen bilden Filopodien aus, welche für Zell-Zell-Kontakte, interzelluläre Kommunikation und die Migration wichtig sind (119). Die Richtung der Angiogenese richtet sich nach dem Ort der höchsten VEGF-Konzentration aus. VEGF wird physiologischerweise in hypoxischem Gewebe HIF-abhängig (Hypoxia inducible factor) ausgeschüttet (95).

Die Endothelzellen bewegen sich entlang des VEGF Gradienten unter Ausbildung von Filopodien. Die Filopodien scheinen für die Registrierung der angiogene Signale sowie die Fortbewegung verantwortlich zu sein (148, 149). Filopodien bestehen aus langen, parallelen F-Aktin-Filamenten, wohingegen die Lamellipodien kurze, nahe der Zellmembran gelegene Strukturen aus dicht verzweigtem Aktin sind (148, 150). Phng et al. konnten zeigen, dass die Filopodien nicht essentiell für die Fortbewegung der Endothelzellen sind und hierfür die Lamellipodien ausreichend seien. Filopodien führen jedoch zu einer schnelleren Fortbewegung und sind unerlässlich für die Ausbildung der Gefäßanastomose mit anderen Aussprossungen (149).

Die Stalk-Zellen sind durch Zell-Zell-Verbindungen durch VE-Cadherin (Vascular endothelial-Cadherin) an die Tip-Zellen gebunden (148). Hierdurch folgen sie den Tip-Zellen in ihrer Bewegung in Richtung des VEGF-Gradienten nach.

Die neu gebildete Aussprossung muss nun ein Lumen ausbilden, um die Perfusion zu gewährleisten. Zur Ausbildung des Lumens gibt es verschiedene Theorien. Eine Hypothese besagt, dass sich zunächst intrazellulär Vesikel bilden. In vitro wurde gezeigt, dass Endothelzellen Integrin  $\alpha 2\beta 1$ - abhängig intrazelluläre Vakuolen ausbilden, welche durch Verschmelzung mit Vakuolen anderer Endothelzellen zu der Lumenausbildung in Kapillaren führen (151, 152).

Diesem Modell stehen die Ergebnisse der Forschergruppen um Blum et al. und Strilic et al. gegenüber. Sie beschreiben eine extrazelluläre Bildung des Lumens in der Entwicklung der dorsalen Aorta bei Mäuseembryonen und konnten lediglich das Vorkommen kleiner Vakuolen nachweisen. Bei diesem zweiten Modell bilden die Endothelzellen zunächst mittels VE-Cadherin Zell-Zell-Kontakte aus, über die Rekrutierung von F-Aktin kommt es zu einer Konkarvierung der Endothelzelle und zu der extrazellulären Lumenausbildung (153, 154).

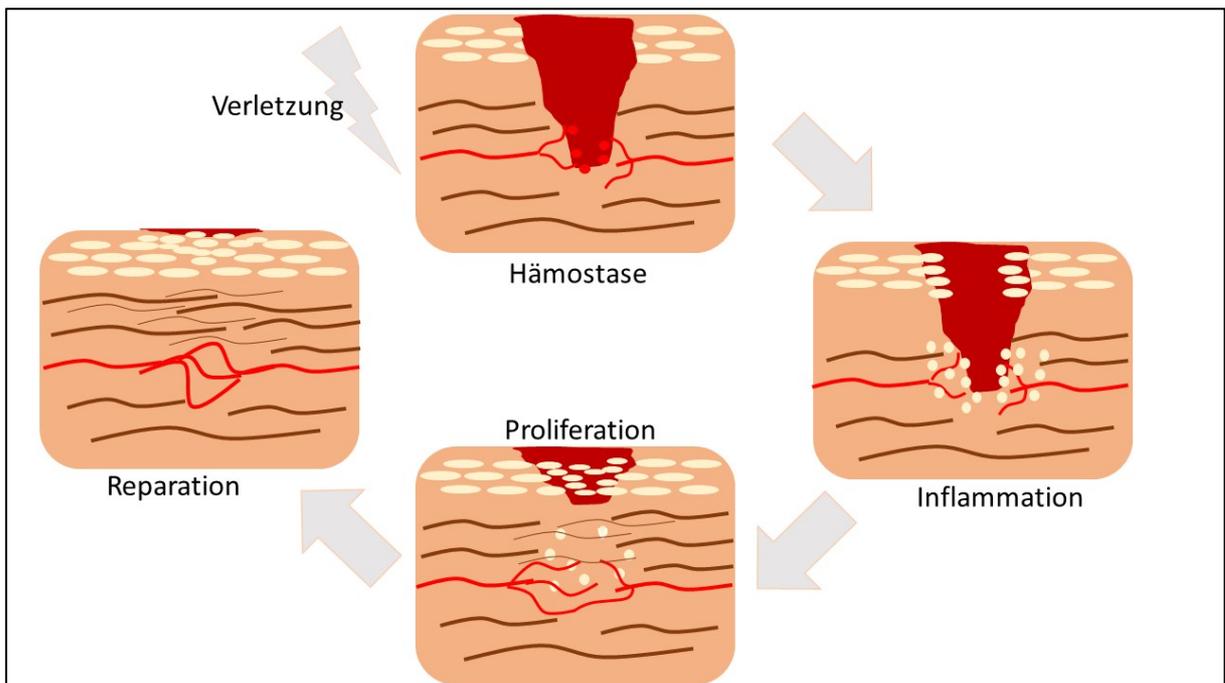
Glabela et al. beschreiben einen Mechanismus, in dem die Hämodynamik wichtig für die Ausbildung und Erweiterung des Lumens ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der kardialen und damit auch der hämodynamischen Funktion der Embryonen zu einer Stagnation der Ausbildung eines Lumens bis hin zum Kollaps der Lumina führte (155).

### **2.3.2.3 Anastomosierung und Perfusion der Aussprossungen**

Zur Ausbildung eines funktionales Gefäßnetzwerkes, ist die Anastomosierung der Aussprossungen notwendig. Hierbei unterscheidet man die Anastomose zwischen zwei Aussprossungen, also zwei Tip-Zellen, sowie zwischen einem bereits existierenden Gefäß und einer Aussprossung, also nur einer beteiligten Tip-Zelle. Zuerst muss ein Kontakt zwischen zwei Endothelzellen hergestellt werden. Hierzu verbinden sich die Filopodien. Diese Verbindung wird durch ein VE-Cadherin verstärkt und es bildet sich eine zirkuläre Kontaktfläche zwischen den Endothelzellen aus (156). Nach dem Kontakt zwischen den beiden Tip-Zellen kommt es zu einer apikalen Polarisierung der Zellmembranen. Die führt zu der Ausbildung eines Sacks, welcher später das Lumen der Anastomose formt (157). Hierbei scheinen Gewebsmakrophagen durch ihre hohe Mobilität bei Akkumulierung in der Nähe von Aussprossungen den Kontakt zwischen Endothelzellen durch das Zusammenführen der Filopodien zu begünstigen (158). Die Konzentration an VEGF-A reguliert die Ausbildung neuer Anastomosen. So führt eine niedrige Konzentration an sVEGF1 und an VEGFR1 zu einer erhöhten Zahl an transienten Anastomosen. Ein extrazelluläres Überangebot an VEGF führt also zu vielen Anastomosen. Der lösliche sVEGF1 reguliert die extrazelluläre VEGF-Konzentration herunter und sorgt für die Ausbildungen von wenigeren aber stabileren Anastomosen (159).

### **2.3.3 Gewebsregeneration und Angiogenese**

Der Gewebsregeneration von Haut, Knochen und Schleimhaut liegt eine gemeinsame Systematik zugrunde, die sich im Einzelnen leicht unterscheidet. Zunächst durchläuft die Verletzung eine inflammatorische Phase, die die Wunde von pathogenen Erregern und Fremdkörpern reinigen soll. Es schließt sich die proliferative Phase an, in welcher der Gewebsschaden regeneriert wird. Zuletzt wird die Reparationsphase durchlaufen, in der die Narbe geformt wird und die Integrität des Gewebes wiederhergestellt werden soll (160-163). Knochengewebe und Schleimhaut bilden nach Verletzungen im Gegensatz zur Haut kaum Narben aus (161, 162, 164-166).



**Abbildung 2.4: Phasen der Gewebsregeneration.**

Die Regeneration von Gewebe umfasst verschiedene Phasen, wozu die Hämostase, die Inflammation, die Proliferation und die Reparation gehören. Modifiziert nach Torres et al. (167).

Um die Integrität des Gewebes nach einer Verletzung wiederherzustellen, kommt es durch das Zusammenspiel von Immunzellen, Wachstumsfaktoren, Extrazellulärmatrix und den sich im Wundbett befindenden Zellen zur Gewebsregeneration. Bei der Heilung werden zwei Prozesse unterschieden, die inflammatorische Phase und die folgende proliferative Phase. In der inflammatorischen Phase wird durch die Aktivität von peripheren Monozyten aus dem Blut die Wunde von pathogenen Fremdkörpern gereinigt. In der proliferativen Phase wird die Wunde durch Angiogenese, Wiederherstellung von peripheren Nerven und Reorganisation des Gewebes wieder verschlossen (160).

### 2.3.3.1 Die inflammatorische Phase

Ein wichtiger Faktor in der Gewebsneubildung ist die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Hierfür ist die Versorgung des Gewebes durch Gefäße und die Ausbildung neuer Gefäße nach Verletzung entscheidend. Nach der Unterbrechung der Gefäßversorgung durch die Verletzung muss der Metabolismus anaerob ablaufen. Makrophagen können sich dieser Änderung sehr schnell anpassen. Gleichzeitig werden sie durch die Verletzung aktiviert. Durch ihre große Widerstandsfähigkeit und ihre ubiquitäre Verteilung im Gewebe sind sie ein wichtiger Baustein im Gefüge der Gewebsregeneration (161, 168).

Nachdem es zu der Schädigung des Gewebes kam, reagiert der Organismus umgehend. Zunächst kommt es zu einer Aktivierung des peripheren Nervensystems- Dies führt zu einer Ausschüttung der Neuropeptide Substanz P (SP) und Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in den Endungen der peripheren Nervenzellen. Hierdurch wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst (169, 170). Diese Neuropeptide, v.a. CGRP, führen zu einer Vasodilatation durch die Relaxation der glatten Muskelzellen der Gefäße, vor allem durch CGRP, sowie zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße, was wiederum durch SP getriggert wird (160, 161, 171-173). Gleichzeitig führt die Verletzung der Gefäßwand zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Diese treffen durch den Gefäßschaden auf die EZM. Dort binden die Thrombozyten, aggregieren und produzieren Thrombin, welches die Gerinnungskaskade in Gang bringt (160, 174). Außerdem führen die aktivierten Thrombozyten zu einer Integrin-vermittelten Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Dieses verstärkt zusammen mit Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten das initial gebildete Koagulum (174, 175). Des Weiteren kommt es bei der Aktivierung zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- $\beta$ 1, FGF,  $\beta$ -FGF, EGF, IGF-1 (Insulin-like growth factor) und VEGF aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten, was zu einer Modulation der Immunantwort führt (160, 176). Die Aktivierung und die Aufgaben der weiteren Immunzellen wie T- und B-Zellen werden aufgrund der geringen Relevanz für die Arbeit nicht näher erläutert.

Im Heilungsprozess von Knochengewebe kommt dem Hämatom, das sich nach der Fraktur bildet, eine wichtige Rolle zu. Es besteht aus den verschiedenen Zellen des Blutes, wovon die Leukozyten durch Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten repräsentiert werden (161). Durch die unterschiedliche Lebensspanne der Zellen, verändert sich die Zusammensetzung des Hämatoms über die Zeit. Gleichzeitig kommt es durch die ausgeschütteten Zytokine zu einer Zellmigration und einer Erhöhung der Zellzahl in den ersten 12-24h. Während dieser Zeit wirkt das Hämatom vor allem proinflammatorisch durch die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und MCSF (macrophage colony-stimulating factor) (161, 177). Im Frakturhämatom herrscht in den ersten sieben Tagen eine hohe Konzentration an VEGF, was proangiogen wirkt und somit die Knochengewebsregeneration unterstützt (178).

Eine verlängerte Immunreaktion scheint hingegen zu einer verzögerten Angiogenese zu führen. So zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von proangiogenen Wachstumsfaktoren im Wundbett bei langanhaltender Immunreaktion (162, 177, 178). Es wurden im narbenarmen Heilungsprozess der oralen Mukosa im Vergleich zu Wunden der Haut niedrigere proinflammatorische Zytokinlevel sowie weniger Immunzellen wie

Makrophagen und T-Zellen gemessen (164, 179). Die Population der Fibroblasten in der Mukosa scheint zu der schnelleren Wundheilung beizutragen. Die Fibroblasten migrieren schneller in das Wundbett und exprimieren mehr Proteine. Besonders MMPs, die in die Immunantwort und Veränderung der EZM eingreifen, werden vermehrt gebildet (180). Zudem zeigen die Fibroblasten der Mukosa eine schnellere Antwort auf TGF- $\beta$  Stimulation und somit eine frühere Produktion von Kollagen sowie eine frühere Kontraktion der Wunde (166, 179). Die Rolle des Speichels bei der oralen Wundheilung ist nicht abschließend geklärt. Manche Studien zeigen, dass es durch das feuchte Milieu und die im Speichel enthaltenen Zytokine und Wachstumsfaktoren wie VEGF einen positiven Effekt gibt (166, 167, 181, 182). Dies wird durch Studien über den Funktionsverlust der Speicheldrüsen durch Erkrankungen oder operative Eingriffe belegt (182, 183).

### **2.3.3.2 Die proliferative Phase**

Die proliferative Phase beginnt etwa 3-4 Tage nach der Verletzung und dauert 2-4 Wochen. Sie umfasst die Proliferation von Fibroblasten sowie deren Differenzierung, die Angiogenese und die Reparatur peripherer Nerven. Die Makrophagen nehmen eine zentrale Rolle als Initiator und Regulator der proliferativen Phase ein (160, 161, 184, 185). Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF-2 und TGF- $\beta$  führen über eine Stimulation von Fibroblasten zu deren Differenzierung und zu einer Migration in das Granulationsgewebe (160, 161, 186, 187). Hier ersetzen die zu Myofibroblasten differenzierten Fibroblasten schrittweise das vorhandene Fibrinnetz mit Kollagen und Fibronectin, um eine intakte Extrazellulärmatrize für einspritzende Gefäße auszubilden (184, 188, 189). Diese Cytokine führen im Knochenheilungsprozess zu einer Differenzierung von MSCs hin zu Osteoblasten. Diese sind für den Aufbau von Knochengewebe zuständig (161). Ergebnisse zeigen, dass die für die Regeneration essentiellen MSCs durch hypoxische Bedingungen im Gewebe an ihrer Migration gehindert werden. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Oxygenierung des defekten Gewebes und damit der Angiogenese (190).

TGF- $\beta$  scheint ein essentieller Wachstumsfaktor im Prozess der Wundheilung sowie im Speziellen für die Migration und die Differenzierung der Fibroblasten zu sein (189, 191, 192). TGF- $\beta$  führt zu einer Stimulation der Synthese von Kollagen I und III. Gleichzeitig beeinflusst es die Stimulation und Suppression verschiedener MMPs, die das Kollagen der EZM abbauen. Demzufolge ist es wichtig für den Umbau und die Dynamik der EZM (192, 193). Eine Überexpression von TGF- $\beta$  kann durch eine Stimulation von CTGF

(connective tissue growth factor), welcher mit der Pathophysiologie von Fibrose und hypertrophen Narben assoziiert ist, zu Wundheilungsstörungen führen (194).

Die Angiogenese, die einen Teil der proliferativen Phase bildet, wird ebenfalls durch die Makrophagen getriggert (160, 161, 195, 196). Es zeigte sich bei in vivo und in vitro Versuchen, dass eine erhöhte Zahl von Wundmakrophagen zu einer vermehrten Angiogenese führte (196). Dies wird durch eine VEGF-Sekretion aus Makrophagen erklärt. Neuere Studien zeigen, dass hierfür die Expression des Oberflächenproteins C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) der entscheidende Faktor ist (195, 197). So fanden Boniakowski et al. heraus, dass CCR2 Knockout-Mäuse eine signifikant schlechtere Wundheilung haben. Die Makrophagen migrieren seltener in das Wundgebiet und dadurch entstehen vor Ort verminderte Konzentrationen wichtiger pro- und antiinflammatorischer Zytokine (198).

Der Hauptstimulus für die Gefäßneubildung ist die im beschädigten Gewebe herrschende Hypoxie, welche zu einer Sekretion von HIF-1 u.a. durch die Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen führt (160, 185, 199). HIF-1 führt wiederum zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF durch diese Zelltypen sowie einer erhöhten VEGF-Expression durch Endothelzellen (192, 200).

VEGF ist, wie bereits in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, ein zentraler Wachstumsfaktor für die Angiogenese. Der VEGF-A Gradient, der durch die vermehrte VEGF Sekretion im hypoxischen Gewebe entsteht, begünstigt die Gefäßneubildung in Richtung des hypoxischen Gewebes. Er ist damit verantwortlich für die Angiogenese (192, 201). Diese erhöht den Sauerstoffgehalt im defekten Gewebe, was essentiell für die Wundheilung ist (202). Die Endothelzellen der neugebildeten Gefäße schütten PDGF- $\beta$  aus, was zu einer Rekrutierung von Perizyten führt. Diese Perizyten bilden die muralen Zellen und damit die Außenwand des Gefäßes. Hierdurch werden die neugebildeten Gefäße stabilisiert (203, 204).

Des Weiteren kommt es innerhalb der proliferativen Phase zu einer Regeneration der peripheren Nerven. Dies erfolgt zum einen über kollaterale Reinnervation und zum anderen über Regeneration der beschädigten Nerven (160, 205). Eine Denervation der Haut führt zu einsproßenden nozizeptiven Nervenendigungen von kollateralen, nicht verletzten Axonen. Gleichzeitig kann im adulten Organismus durch Zusammenwachsen der beiden Nervenendigungen ein verletzter peripherer Nerv regenerieren und seine Funktion zurückgewinnen. Hierbei sind u.a. Schwann'sche Zellen, Makrophagen und Fibroblasten von Bedeutung (160, 205). Die Schwann'schen Zellen dedifferenzieren zu einer Progenitor-like-Zelle, um das Wachstum der Axone sicherzustellen. Bei der

Dedifferenzierung kommt es zu einer Ausschüttung von monocyte chemoattractant protein-1 (MCP- 1), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and pancreatitis-associated protein III (PAP-III) (160, 206). Die Chemokine locken Makrophagen an, welche ihrerseits aufgrund des hypoxischen Gewebes zu einer Ausschüttung von HIF und schließlich VEGF führen. Diese neugebildeten Gefäße werden von den Schwann'schen Zellen als Gerüst zum Zusammenwachsen zweier Nervenendigungen nach Verletzung benutzt (160, 207). Der proliferativen Phase schließt sich die finale Phase der Umformung des neugebildeten Gewebes an. Bei der Regeneration der Haut bildet sich in dieser letzten Phase die Narbe aus (160, 161, 163).

## **2.4 Platelet-rich fibrin**

### **2.4.1 Geschichte des Platelet-rich fibrin**

Die regenerative Medizin und das tissue engineering sollen Gewebe bei der Regeneration, Reparatur und Heilung unterstützen (208). Wie bereits in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, ist das Einsprießen neuer Gefäße in das Gewebe ein essentiell wichtiger Faktor bei der Regeneration und Neubildung. Die meisten regenerativen Matrices sind zunächst avaskulär. Das Ziel bleibt die Angiogenese und Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes zur Bildung neuen Weich- und Hartgewebes (208).

Aufgrund ihrer Wichtigkeit für die Aktivierung und Abstimmung verschiedener Wachstumsfaktoren für die Angiogenese, rückten Thrombozyten früh in den Mittelpunkt der Forschung. Bereits 1954 postulierte Kingsley das Konzept von Thrombozytenkonzentraten und führte den Begriff Platelet-rich plasma (PRP) ein, welches schließlich in den 1980er Jahren seinen Einzug in die klinische Praxis hielt (208, 209).

Das Prinzip des PRP sieht eine autologe Blutentnahme kurz vor oder während der chirurgischen Intervention vor. Das Blut wird mit einem Antikoagulant gemischt und zentrifugiert. Im ersten Schritt der Zentrifugation, die kurz und mit geringer Kraft ausgeführt wird, kommt es zu einer Trennung des Blutes in drei Schichten: den Erythrozyten am Boden des Blutentnahmeröhrchens, einem Leukozytenfilm (engl.: buffy coat, BC) in der Mitte und Platelet-poor plasma (PPP) als oberster Schicht (11). Im BC, der normalerweise weißlich imponiert, sind die meisten Thrombozyten und Leukozyten enthalten (11).

Um nun pure PRP (P-PRP) herzustellen, werden die Schichten PPP und BC in ein anderes Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation mit hoher Zentrifugalkraft,

wird der größte Teil des PPP verworfen und man erhält P-PRP. Dieses enthält eine hohe Anzahl an Thrombozyten, die in fibrinreichem Plasma gelöst sind, wobei die meisten Leukozyten durch die Zentrifugation verworfen werden (11). Im Abschnitt 2.3.3 wurde die Wichtigkeit von Leukozyten für die Angiogenese und Gewebsregeneration beschrieben. Deshalb wurde ein Protokoll entwickelt, mit Hilfe dessen ein sogenanntes leukozytenreiches PRP (L-PRP) hergestellt werden kann. Hierbei werden vor der zweiten Zentrifugation nicht nur das BC und PPP in ein zweites Röhrchen überführt, sondern auch einige residuale Erythrozyten. Es wird ebenfalls ein Zentrifugationsprotokoll mit hoher Zentrifugalkraft angewendet und anschließend der größte Teil des PPP verworfen (11).

Choukroun et al. modifizierten das Protokoll im Jahre 2001 hin zu dem mittlerweile am häufigsten benutzten Thrombozytenkonzentrat, dem leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Hierbei wird auf die Zugabe eines Antikoagulanzen verzichtet und das entnommene Blut wird sofort zentrifugiert (11). Das L-PRF enthält mehr Leukozyten als das PRP, wie zum Beispiel Makrophagen und neutrophile Granulozyten (208).

#### **2.4.2 Herstellung**

Innerhalb der PRF-Familie müssen das P-PRF (pure platelet-rich fibrin) und das L-PRF unterschieden werden. Zuerst wurde das L-PRF durch Choukroun et al. beschrieben (11, 210). Man spricht von einem Thrombozytenkonzentrat der zweiten Generation, da die Herstellung ohne Beisetzung antikoagulatorisch wirksamer Substanzen auskommt (11, 211).

Das Blut wird in trockenen, unbeschichteten Glasröhrchen gesammelt und anschließend mittels eines schonenden und langsamen Zentrifugationsprogramms zentrifugiert (10 ml Glasröhrchen, die direkt nach der Blutentnahme für 10 Minuten bei 3000 rpm (engl.: Rotations per minute) zentrifugiert werden, s. Abb. 2.5) (212, 213). Es kommt zu einer Aktivierung der Thrombozyten und einer Polymerisierung des Fibrins. Nach Beendigung der Zentrifugation entsteht ein dreischichtiger Aufbau. Am Boden des Glasröhrchens befinden sich die Erythrozyten, in der Mitte das PRF-Koagulum und die oberste Schicht wird durch das PPP gebildet. Im PRF-Koagulum, in dem das Fibrin durch Koagulation eine komplexe dreidimensionale Form angenommen hat, finden sich die meisten Thrombozyten und Leukozyten des abgenommenen Blutes (11, 212, 214). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Schicht der roten Blutzellen (RBC, engl.: red blood cells), als auch das PPP kaum Thrombozyten enthalten. Die meisten

Thrombozyten befinden sich am Übergang zwischen dem PRF-Koagulum und der Schicht der RBC (214).

Eine weitere Unterscheidung des L-PRF kann in A-PRF und i-PRF (injectable PRF) vorgenommen werden. Der Unterschied besteht im Aggregatzustand der beiden PRFs. Das A-PRF ist fest wie die herkömmlichen L-PRF Produkte, wohingegen das i-PRF flüssig ist. Beide PRF-Varianten entstehen durch ein im Vergleich zu dem L-PRF Herstellung verändertes Zentrifugationsprotokoll. Zunächst wurde 2014 durch eine Forschergruppe um Choukroun das Konzept des A-PRF beschrieben. Hierbei wird das gewonnene Blut des Probanden 14 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert (s. Abb. 2.5). Es wirken deutlich geringere Kräfte während des Vorganges auf die Zellen (215). Dieses Konzept des A-PRF wurde weiterentwickelt zum A-PRF+, welches zusätzlich zu den verminderten Rotationsumdrehungen auch noch eine kürzere Zentrifugationszeit vorsieht, also 8 Minuten lang bei etwa 1300 rpm (s. Abb. 2.5) (216). Das i-PRF wird durch ein noch kürzeres und schonenderes Zentrifugationsprotokoll hergestellt (3 Minuten, 700 rpm, s. Abb. 2.5) (217). Bei allen drei PRF-Varianten werden dem abgenommenen Blut vor der Zentrifugation keine zusätzlichen Stoffe beigemischt (215-217).

Im Gegensatz hierzu steht die Herstellung eines P-PRF, wofür es aktuell nur einen Anbieter gibt. Zunächst wird wie bei der Herstellung des L-PRF Blut abgenommen und in einem Röhrchen gesammelt, welches jedoch Tri-Natrium-Citrat als Antikoagulant und ein Trenngel enthält. Zunächst erfolgt eine Zentrifugation mit hoher Geschwindigkeit für sechs Minuten (11, 218). Auch hier bilden sich die drei Schichten, die nach der Zentrifugation bei der Herstellung der PRP entstehen. PPP und BC werden nun in das zweite Röhrchen, welches  $\text{CaCl}_2$  enthält, mittels eines speziellen Systems überführt. Durch das  $\text{CaCl}_2$  beginnt der Inhalt des Röhrchens zu koagulieren und es erfolgt die abermalige Zentrifugation für 15 min, wonach sich das P-PRF-Koagulum bildet (11).

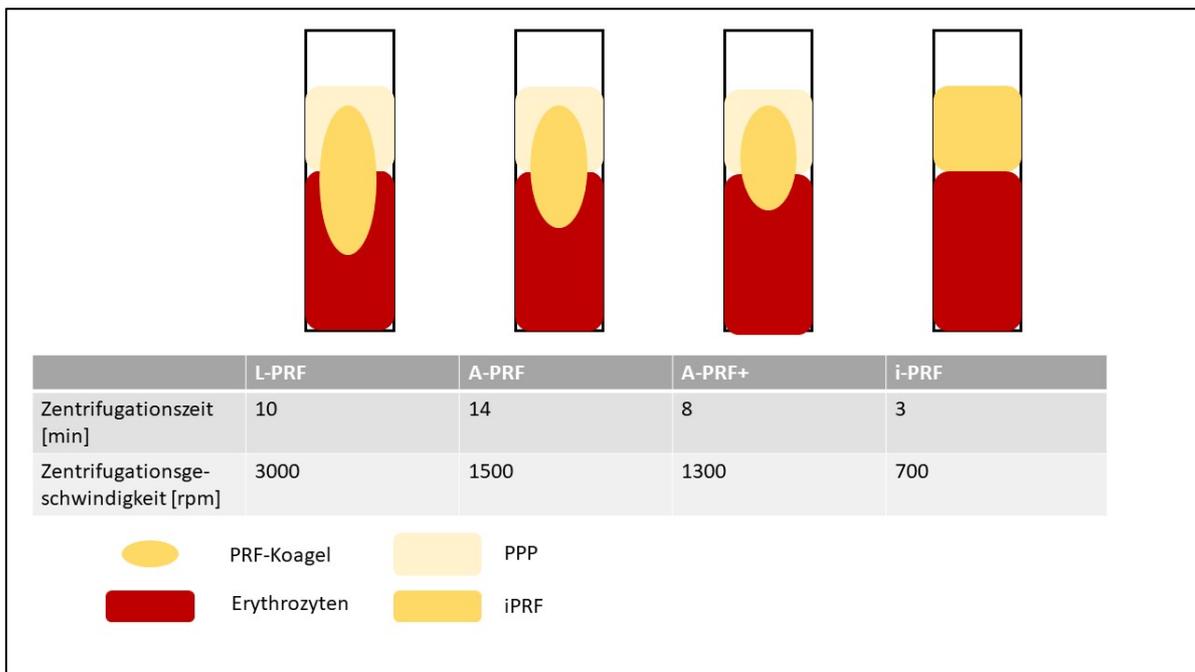


Abbildung 2.5: PRF-Varianten mit Zentrifugationsprotokollen

### 2.4.3 Regeneratives und angiogenes Potenzial der PRF

In den vergangenen zwei Jahrzehnten konzentrierte sich die Forschung auf die Bestandteile des PRF, um die Wirkweise besser zu verstehen und neue Anwendungsgebiete zu finden. Das angiogene Potenzial des PRF begründet sich u.a. auf den enthaltenen Thrombozyten. In den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten befinden sich sowohl für Thrombozyten spezifische Proteine wie  $\beta$ -Thromboglobulin, als auch für Thrombozyten unspezifische Proteine wie Fibronectin, Thrombospondin, Fibrinogen und andere wichtige Faktoren für die Gerinnung und das Wachstum (214). Die Aktivierung der Thrombozyten während der Zentrifugation spielt eine wichtige Rolle, da hierdurch erst die Degranulierung und damit die Sekretion der Zytokine erfolgt (214). In dem PRF enthaltene und für die Angiogenese wichtige Zytokine sind vor allem TGF $\beta$ -1, VEGF, PDGF, IGF I und II, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 sowie TNF- $\alpha$  (208, 212, 214).

Der Großteil der bisher durchgeführten Studien erfolgte zur Regeneration von Weichgewebe und der damit einhergehenden Angiogenese. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die bei in vitro Versuchen nachgewiesenen Wachstumsfaktoren auch in vivo zu einer vermehrten Gefäßneubildung und einer schnelleren Weichgewebsregeneration führen (208). So beschrieben Roy et al. in einem Wundmodell am Schwein durch eine Behandlung mittels P-PRF histologisch eine signifikant höhere Endothelzellichte in der Wunde. Des Weiteren konnten sie einen erhöhten Blutfluss in den mit PRF behandelten Wunden nachweisen (218). Li et al. beschreiben in einem Versuchsaufbau, bei dem das L-PRF Mäusen subkutan implantiert wurde, sodass die

PRF-Membran nach einer Woche von Kollagenfasern umgeben ist. Nach zwei Wochen sei die PRF-Membran beinahe vollständig aufgelöst und durch körpereigene Kollagenfasern ersetzt worden. Es kam zu einer Heilung des Gewebes mit dem PRF als Leitstruktur (24). Auch die Kombination von L-PRF mit aus menschlichem Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (adipose-derived stem cells, ASC) führte in einem Modell mit Minischweinen, die im Kopf-Hals-Bereich bestrahlt wurden und anschließend Defekte der Parotis aufwiesen, zu einer deutlich verbesserten Regeneration der Weichgewebsdefekte (219).

In der klinischen Anwendung wird das regenerative und angiogene Potenzial des PRF auch in der rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie genutzt. Es wird beispielsweise bei der Behandlung von Extraktionsalveolen zur socket preservation eingesetzt. Hier führt es zu einer schnelleren Regeneration und Wundheilung. Außerdem senkt es die postoperativen Komplikationsraten (220-223) von palatinalen Wunden (224, 225) und verbessert die Regeneration parodontaler Defekte (22, 226). Des Weiteren hielt das PRF seinen Einzug in die plastische Chirurgie bei der operativen Behandlung aknebedingter Narben im Gesicht, der Nasolabialfalten und sonstiger Falten der Gesichtshaut (227, 228). Die regenerative Wirkung des PRF konnte im Zusammenhang mit chronischen Ulcera der Beine nachgewiesen werden (208, 229-231). Seltener wird das PRF in der Urologie im Zusammenhang mit urethralen Fistelungen verwendet (229, 232, 233). Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet ist die Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, wo das PRF zur Behandlung traumatischer Trommelfellperforationen (234) sowie bei Septorhinoplastiken verwendet wird (235). Es scheint auch einen positiven Effekt bei der Verhinderung pharyngocutaner Fistelbildung nach Laryngektomien zu haben (236).

Weiterführend wird L-PRF auch in der Knochengewebsregeneration verwendet. Knochengewebe besteht aus kollagenösen und nicht-kollagenösen Proteinen, wobei Kollagen I den Hauptbestandteil darstellt (237). Die Neubildung von Knochengewebe wird durch mesenchymale Vorläuferzellen (MPC, mesenchymal progenitor cells) sichergestellt, welche sich u.a. im Knochenmark befinden (238, 239). Diese MPCs differenzieren sich zu Osteoblasten, welche für den Aufbau des Knochengewebes zuständig sind. Für die Differenzierung der MPC und die Migration in das gewünschte Gewebe sind Wachstumsfaktoren notwendig. Hier sind vor allem PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, FGF, IGF und BMP entscheidend (237, 239).

Für die Neubildung von Knochengewebe sind die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  und PDGF wichtig. TGF- $\beta$  führt zu einer verstärkten Bildung von Kollagen, sowohl der

Extrazellulärmatrix als auch des Knochens (192, 193). In vivo Versuche mit Ratten, bei denen TGF- $\beta$  an Knochendefekten der Femurdiaphyse appliziert wurde, zeigen eine signifikant verbesserte Mineralisation des Knochens mit einer höheren Dichte (240). In klinischen Studien zeigt sich, dass die TGF- $\beta$  Konzentration im Serum während der ersten zwei Wochen nach Frakturen erhöht ist. Gleichzeitig besteht bei Patienten mit verzögerter Knochenheilung eine Korrelation mit verminderten TGF- $\beta$  Konzentrationen im Serum (241, 242). Die Rolle des PDGF im Rahmen der Bildung von Knochengewebe scheint weniger leicht zu beantworten zu sein. Da das PDGF Molekül ein Dimer aus PDGF-A und PDGF-B Ketten ist, gibt es drei Isoformen des Wachstumsfaktors: ein Homodimer mit zwei A Ketten, also PDGF-AA, ein Homodimer aus zwei B Ketten, also PDGF-BB, sowie ein Heterodimer, das PDGF-AB (243, 244). PDGF, in seinen verschiedenen Isoformen, hat vor allem einen mitogenen und migrationsfördernden Effekt (237, 239). PDGF-AB scheint die wichtigste Isoform für die Chemotaxis von MPCs zu sein, wohingegen PDGF-BB besonders die Chemotaxis von Osteoblasten induziert (239). VEGF stellt durch die Induktion von Angiogenese einen wichtigen Faktor im Rahmen der Knochengewebsbildung dar. Darüber hinaus haben Street et al. 2002 einen direkten Effekt von VEGF auf die Umwandlung des weichen Kallus hin zum knöchernen, harten Kallus beschrieben. Dies geschieht durch Aktivierung von Osteoklasten sowie eine Chemotaxis und Differenzierung von Osteoblasten (245, 246).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

<b>Chemikalien</b>		
<b>Chemikalie</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Alexa Fluor alpha rabbit	A11008	Invitogen, Carlsbad, USA
Alpha-SMA	A2547	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Ampuwa Spüllösung 1000 ml	4801694	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Bovine Serum Albumin	A7906-50G	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
CD 105 Antikörper	orb10285	Biorbyt, Cambridge, Großbritannien
Dako REAL Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	K5001	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse	K4001	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution	S2023	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako Proteinblock Serum-Free	X0909	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DAPI	D1306	ThermoFischer, Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	31885-023	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	D8537-500ML	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA

Eosin-Lösung 1%	270917/04 (CH.-B.)	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Mainz
Ethanol 70% vergällt	T913.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 % vergällt	T171.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96,5% vergällt	641A	Martin und Werner Mundo OHG, Mainz, Deutschland
Ethanol	5054.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eukitt Quick-hardening mounting medium	03989-100ML	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Fluorescence mount medium	S3023	Dako, Santa Clara, USA
GermDecon Spray bottle	34207.01	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Goat Serum normal	X0907	Dako, Santa Clara, USA
HCl (1N)	181021.1211	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Human TGF beta 1 DuoSet ELISA	DY240	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human VEGF DuoSet ELISA	DY293B	R&D Systems, Minneapolis, USA
Liquid DAB+ Substrate Chromogen	K3468	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Mayer's Hämalunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Reagent Diluent Concen- trate 2 (10x)	DY995	R&D Systems, Minneapolis, USA

Roti-Histofix 4,5%	2213.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol	6640.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefellösung (2N) 1 mol/l	X873.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Substrate Reagent Pack	DY999	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tri-Natrium-Di-Hydrat	6448.500 K10020548	Merck, München, Deutschland
Triton-x-100 50ml	T8787	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
TWEEN 20 Detergent	P5927	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Gerätschaften</b>		
<b>Gerätschaft</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Ausblockmaschine		
Brutmaschine Modell 3000, Type /d	3333DH	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg, Deutschland
BXFM Version 3 Intra- vitalmikroskop	5J07487	Olympus, Shinjuku, Japan
Choukroun PRF Duo System	PRF1020F	PRF Process Choukroun, Nizza, Frankreich
Inkubator HERAcell 240i	90004149	ThermoFischer, Waltham, USA
Inkubator Function line	95010634	ThermoFischer, Waltham, USA
Keyence BZ-9000E Fluoreszenzmikroskop	10153829	Keyence, Osaka, Japan

Kühlschrank -80°C	40854539	ThermoFischer, Waltham, USA
Mikrotom 2030	-	Reichert-Jung, Wien, Österreich
pH-Meter	CG840	Schott, Mainz, Deutschland
Sicherheitswerkbank von Heaeus Instruments, Typ HS12	97106795	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Steam Cooker	MS0505/1139	Venalisia Import GmbH, Ingolstadt, Deutschland
Tango Desktop, Steuergerät für Mikromanipulatoren	00-76-150-1802	Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
VersaMax Mikroplattenreader	BNR06493	Molecular Devices, San José, USA
VHX-1000D digitales Mikroskopsystem	Y1501120034	Keyence, Osaka, Japan
X-Cite exacte, Fluoreszenzlichtquelle	XCT10-0029	Excelitas Technologies, Wiesbaden, Deutschland
<b>Materialien</b>		
<b>Materialie</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
A-PRF Röhrchen	A-PRFPLUS	PRF Process Choukroun, Nizza, Frankreich
A-PRF Zubehör Box	APRF3050	PRF Process Choukroun, Nizza, Frankreich
Blutabnahme System	APRF3042	PRF Process Choukroun, Nizza, Frankreich
Collprotect membrane	603040	biotiss, Zossen, Deutschland
Combitips advanced 2.5mL	0030089.448	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips advanced 10mL	0030089.464	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Deckgläser 24 x 32 mm	H877.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Jason membrane	683040	biotiss, Zossen, Deutschland
Kanüle 26G, BD Microlance 3	303800	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kanüle 21G, BD Micro- lance 3	304432	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Leukosilk S	353003	BSN medical, Hamburg, Deutschland
Light-Duty Tissue Wipers	82003-820	VWR, Radnor, USA
Microplates 96-well plate for ELISA	DY990	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mucoderm membrane	703040	biotiss, Zossen, Deutschland
Parafilm M Verschlussfolie	PM996	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Petrischale	353003	Sigma-Aldrich, St. Lois, USA
Plate sealer	DY992	R&D Systems, Minneapolis, USA
Safe-Lock Tubes 1.5 mL	0030120.086	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Silbernitrat-Kaliumnitrat Ätzstäbchen	11722736	Rösch&Handel, St. Anton/ Arlberg, Österreich
Spritze 10 mL	309110	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Spritze 1 mL	303174	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Tissue embedding cassettes	053861	Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland
Tissue embedding sponge	192922.04	Deltalab, S.L., Barcelona, Spanien

Tubes 50ml	210261	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Wägebapier	TP65.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
6-well Platte	657160	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
<b>Software</b>		
<b>Software</b>	<b>Hersteller, Ort</b>	
BZ-II Analyzer 1.0	Keyence, Osaka, Japan	
BZ-II Viewer	Keyence, Osaka, Japan	
cellSens	Olympus, Shinjuku, Japan	
Fiji	Wayne Rasband	
Hybrid Cell Count	Keyence, Osaka, Japan	
SoftMaxPro5.4	Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA	
VHX-1000	Keyence, Osaka, Japan	
Vessel Analysis	Nivetha Govindaraju, M farna	Plug-In Fiji, erste Veröffentlichung 14.06.2016
Grid	Wayne Rasband	Plug-In Fiji, erste Veröffentlichung 25.04.2001
EndNote X7	Alfasoft GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	
SPSS 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland	

Tabelle 3.1: Verwendete Materialien

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Experimentalanlage

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von autologen PRF-Membranen in Kopplung mit porcinen Kollagenmembranen auf die Angiogenese gemessen. Das Ethikvotum für die Durchführung der vorliegenden Studie ist in der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz zu finden (Nummer 2019-14705\_1).

Hierfür wurde eine A-PRF+ Membran verwendet, welche sich in vorangegangenen Studien als besonders reich an Wachstumsfaktoren herausstellte und eine gute Stabilität besitzt (216). Die Kollagenmembranen wurden anhand ihrer Eigenschaften ausgewählt. Wie bereits beschrieben, gibt es Forschungsergebnisse, die darauf hindeuten, dass eine Kreuzvernetzung des Kollagens Auswirkungen auf das angiogene Potenzial der Kollagenmembranen hat (12, 60). Deshalb wurden zur Gegenüberstellung zwei porcine Kollagenmembranen verwendet, von denen eine kreuzvernetzt ist, wohingegen die andere nicht kreuzvernetzt ist. Die dritte Membran ist ebenfalls nicht kreuzvernetzt, dicker als die beiden anderen und bisher nur für die Regeneration von Weichgewebe zugelassen ist. Diese Membranen wurden mit der A-PRF+ biologisiert und gekoppelt. Als Kontrollgruppen fungieren jeweils die nativen, nicht biologisierten Kollagenmembranen sowie eine nicht gekoppelte A-PRF+.

Da für die Angiogenese die Wachstumsfaktoren VEGF und TGF- $\beta$  von entscheidender Bedeutung sind, wurden in einem ersten Schritt die Konzentrationen dieser beiden Wachstumsfaktoren mit ELISA-Tests *in vitro* gemessen.

Hieran schlossen sich die *in vivo* Versuche an. Zunächst wurden die verschiedenen Gruppen auf die YSM appliziert und es wurde mit einem Auflichtmikroskop die stattgefundene Angiogenese nach 24 h gemessen. Hierbei wurden die geschossenen Bilder ausgewertet und die Gefäße pro mm<sup>2</sup> und die Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup> gezählt.

Zur Validierung der Ergebnisse des YSM-Modells, wurden einige der ausgezählten YSM ausgeschnitten und histologisch aufbereitet. Bei der histologischen Auswertung entstanden zunächst HE-Schnitte, welche unter dem Mikroskop zum Nachweis von morphologischen Gefäßen betrachtet wurden. Zur Operationalisierung wurden hierbei die Gefäße pro mm<sup>2</sup> ausgewertet.

Da die HE-Färbung nicht spezifisch ist, wurden die ausgewerteten Schnitte mit zwei immunhistochemische Marker ( $\alpha$ -SMA und CD 105) für die Angiogenese gefärbt (247, 248). Diese spezifischen Marker für Gefäße sollten die Ergebnisse der HE-Färbung validieren. Hierbei wurden abermals die Gefäße pro mm<sup>2</sup> gemessen sowie der Anteil der  $\alpha$ -SMA/CD 105-positiven Zellen am gesamten Schnitt.

In einem letzten Schritt wurden die verschiedenen Gruppen in ein weiteres *in vivo* Modell (CAM-Modell) mit Hühnerembryonen übertragen, welches bisher besser beschrieben und etabliert ist als das YSM-Modell. Hierbei wurden die Gefäße mittels *in vitro*-Fluoreszenz dargestellt und mit einem entsprechenden Mikroskop die Bilder generiert. Diese wurden dann nach Gefäßen pro mm<sup>2</sup> und Gefäßverzweigungspunkten

pro mm<sup>2</sup> ausgewertet. Mit einer Software konnten zusätzlich die Gefäßdichte und die Vascular length density gemessen werden.

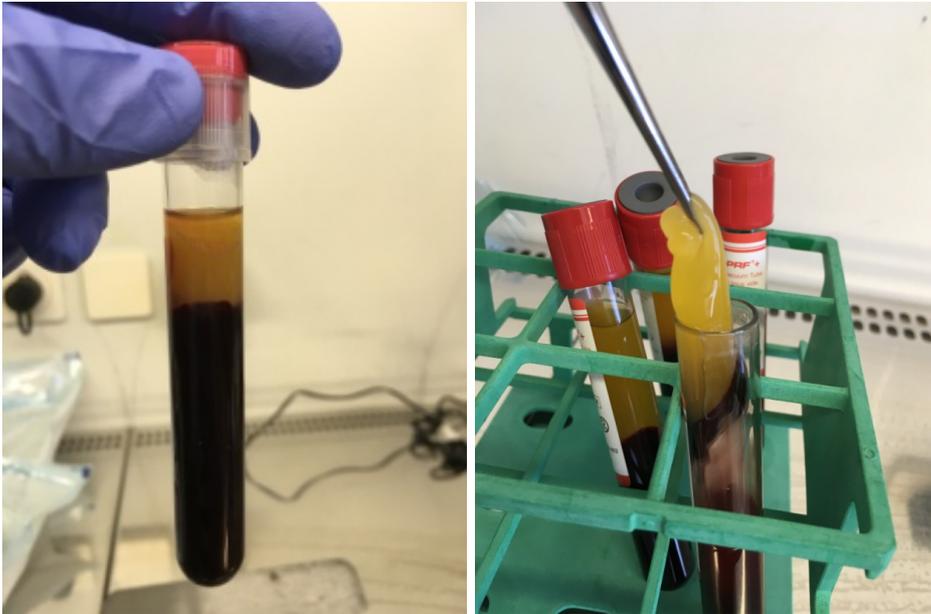
Experimentalschritt	Methode	Zielsetzung	Messgrößen
1	ELISA	Nachweis der Wachstumsfaktoren VEGF und TGF- $\beta$	Konzentration von VEGF [pg/ml] und TGF- $\beta$ [pg/ml]
2	YSM-Modell	Nachweis der Angiogenese in vivo	Gefäße pro mm <sup>2</sup> und Gefäßverzweigungspunkte pro mm <sup>2</sup>
3	Histologische Färbung mittels HE der YSM	Validierung der bereits gemessenen Angiogenese im YSM-Modell	Gefäße pro mm <sup>2</sup>
4	Immunhistologische Färbung der YSM	Validierung der bereits ausgewerteten HE-gefärbten Schnitte	Gefäße pro mm <sup>2</sup> und Anteil des immunhistologisch gefärbten Teils am gesamten Schnitt
5	CAM-Modell mit in vitro-Fluoreszenz	Validierung der gemessenen Angiogenese im YSM-Modell	Gefäße pro mm <sup>2</sup> , Gefäßverzweigungspunkte pro <sup>2</sup> , Gefäßdichte [%] und vascular length density []

Tabelle 3.2: Experimentalanlage

### 3.2.2 Herstellung des Platelet-rich fibrin

Für die Herstellung des A-PRF+ wurde abwechselnd das Blut zweier gesunder Männer, Nichtraucher, 24 und 30 Jahre alt, verwendet. Nach der Punktion der Vena cephalica oder der Vena mediana cubiti wurden 10 ml venöses Blut mit einem Vacutainer System (PRF Process Choukroun, Nizza/Frankreich) in den A-PRF Röhrchen (PRF Process Choukroun, Nizza/Frankreich) gesammelt. Daraufhin wurden die Röhrchen unverzüglich in die Zentrifuge (Duo centrifuge, PRF Process Choukroun, Nizza/Frankreich) gestellt und mittels eines langsamen Zentrifugationsprotokolls bei 1200 rpm acht Minuten lang zentrifugiert (216). Es bildeten sich drei Phasen aus, am Boden des Glasröhrchens die Erythrozyten, in der Mitte das PRF-Koagulum und als

oberste Schicht das PPP in den PRF-Röhrchen, wie bereits in Abschnitt 2.4.2. beschrieben. Das gebildete Fibringerinnsel wurde mit einer Pinzette angehoben und anschließend mit einer Schere unter sterilen Bedingungen von dem Blutgerinnsel getrennt. Nun wurde das Fibringerinnsel in die PRF processing Box (PRF Process Choukroun, Nizza/Frankreich) gelegt und für etwa 30 Sekunden gepresst. Diese hergestellten PRF-Membranen wurden für die folgenden Versuche verwendet.



**Abbildung 3.1: PRF-Röhrchen mit Inhalt**

Links zu sehen ist die Dreischichtung nach Zentrifugation in einem PRF-Röhrchen, rechts zeigt sich das PRF-Koagel, welches aus dem PRF-Röhrchen entnommen wird.

### **3.2.3 In der Studie verwendete Membranen**

#### **3.2.3.1 Collprotect-Membran**

Die Collprotect-Membran (biotiss, Zossen/Deutschland) ist eine doppelschichtige, kreuzvernetzte Kollagenmembran, die aus den Kollagen-Typen I und III, sowie Elastin besteht. Sie wurde aus porciner Dermis gewonnen. Zur Aufbereitung erfolgt ein mehrschrittiges Reinigungsverfahren, eine Lyophilisation, sowie eine  $\gamma$ -Bestrahlung zur Sterilisation. Die Membran ist etwa 0,4 mm dick und soll nach Herstellerinformationen vor allem eine Barrierefunktion in der klinischen Anwendung erfüllen (50, 249).

#### **3.2.3.2 Jason-Membran**

Die Jason-Membran (biotiss, Zossen/Deutschland) besteht aus Kollagen der Typen I und III, welche nicht kreuzvernetzt wurde und aus porcinem Perikard gewonnen wurde. Die Membran ist 0,15 mm dick und hat eine dichte Oberfläche, die den porösen Kern der

Membran verschließt. Nach der Lyophilisation, dem Prozess der Dezellularisation und Sterilisation mittels  $\gamma$ -Bestrahlung bleibt eine 3-dimensionale Membran zurück, die aus Kollagen und Elastin besteht (249, 250).

### 3.2.3.3 Mucoderm-Membran

Die Mucoderm-Membran (biotiss, Zossen/Deutschland) besteht aus Kollagen, welches nicht kreuzvernetzt ist und aus porciner Dermis gewonnen wurde. Nach der Lyophilisation, dem Prozess der Dezellularisation und Sterilisation mittels  $\gamma$ -Bestrahlung bleibt eine 3-dimensionale Matrix zurück, die aus Kollagen und Elastin besteht. Die Kollagenmatrix weist eine Dicke von 1,2-1,7 mm auf, sie soll nach Informationen des Herstellers die Adhäsion von Fibroblasten und Endothelzellen begünstigen (50, 63, 249).

### 3.2.4 Bioaktivierung der Kollagenmembranen

Die Bioaktivierung der Kollagenmembranen erfolgte durch die Koppelung der jeweiligen Membran an ein Fibringerinnsel, das etwa dieselbe Größe aufwies wie die Membran. Hierzu wurden die Membranen je nach Versuchsaufbau in Stücke von 25 mm<sup>2</sup> bis 50 mm<sup>2</sup> Größe geschnitten. Die Stücke wurden auf der PRF processing Box (PRF Process Choukroun, Nizza/Frankreich) positioniert und anschließend mit einem Fibringerinnsel, welches noch nicht zu einer PRF-Membran verarbeitet wurde, bedeckt. Anschließend erfolgte die mechanische Koppelung durch 30-sekündiges Aufdrücken des Deckels der Box.

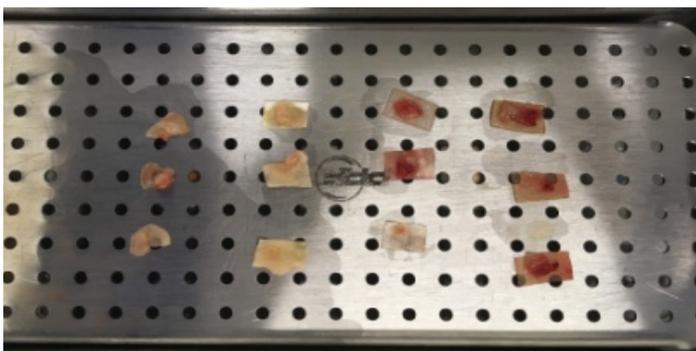


Abbildung 3.2: Bioaktivierte Kollagenmembranen.

### 3.2.5 ELISA

Es wurden ELISA-Sandwich-Verfahren durchgeführt., d.h. es werden zwei für das nachzuweisende Antigen spezifischer Antikörper verwendet. Hierbei bindet der erste Antikörper (Capture Antikörper) eine feste Phase, in diesem Falle die 96-well

Mikrotiterplatten. Die darauffolgende Inkubation mit der Probe führt zu der Bindung des Antigens an den bereits gebundenen ersten Antikörper. Nach Auswaschen der Probe wird ein zweiter, für das Antigen spezifischer, Antikörper dazugegeben. Dieser dockt an die an den Capture Antikörper gebundenen primären Antikörper an. Nach einem weiteren Waschschrift sind die ungebundenen zweiten Antikörper entfernt. Mittels eines markierten sekundären Antikörpers kann nun das Ergebnis quantifiziert werden.

Zur Gewinnung der Proben wurden zunächst A-PRF-Membranen, native Kollagenmembranen und biologisierte Membranen aller Gruppen hergestellt. Diese wurden unter sterilen Bedingungen in die Wells einer 6-well-Mikroplatte platziert. Anschließend wurden jeweils 2 ml eines unbehandelten, glucosearmen EBM (eagle's basal medium) hinzugegeben und für 24, 96 und 168 h in einem Inkubator (Inkubator HERAcell 240i; ThermoFischer, Waltham/USA) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den genannten Zeitpunkten wurden die Proben unter der Werkbank aspiriert und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße asserviert. Hierbei wurden zunächst 1 ml verworfen und für jede Probe zwei Eppendorf Reaktionsgefäße mit 0,5 ml vorbereitet, um Fehler beim Wiederauftauen zu vermeiden. Nun wurden die Wells mit 2 ml des Serums aufgefüllt und unter denselben Bedingungen bis zum nächsten Zielzeitpunkt inkubiert. Die gewonnenen Proben wurden bei -80°C bis zum Zeitpunkt des ELISA Tests im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.5.1 VEGF ELISA

Der VEGF ELISA wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Er weist humanen, natürlichen und rekombinanten VEGF nach. Es wurde das Human VEGF DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis/USA) für den Nachweis von VEGF in den Proben verwendet, die hierin vorhandenen Materialien wurden mit Mischverhältnissen in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

<b>Material</b>	<b>Herstellung</b>
Reagent Diluent	54 ml Aqua destillata (Aqua dest.) + 6 ml Reagent Diluent 2(10x)
Wash Buffer	500 ml PBS + 250 µl 0,05% Tween 20
Capture Antikörper	83 µl Capture Antikörper ad 10 ml PBS
Detection Antikörper	166 µl Detection Antikörper ad 10 ml Reagent Diluent

Standard	16,7 µl Standard in 1000 µl Reagent Diluent für eine Konzentration von 2000 pg
Streptavidin-HRP	50 µl Streptavidin ad 10 ml Reagent Diluent
Substrate Solution	5 ml Color Reagent A + 5 ml Color Reagent B

**Tabelle 3.3: Verwendete Materialien Human VEGF ELISA**

Am Vortag der Versuchsdurchführung wurden 83 µl des Capture Antikörpers mit 10 ml PBS verdünnt und anschließend jeweils 100 µl pro Well in die Mikroplatte pipettiert. Nachdem die Mikroplatte mit einem Plate Sealer verschlossen wurde, wurde über Nacht eine Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Wells nach Aspiration des Inhaltes dreimal mit jeweils 400 µl Wash Buffer (500 ml PBS und 250 µl Tween 20) gewaschen. Das Waschen der Mikroplatten wurde, wie hier beschrieben, nach jedem weiteren Schritt wiederholt. Daraufhin erfolgte eine Blockierung mittels 300 µl Reagent Diluent (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nun wurden 100 µl der Proben sowie des Standards in Dubletts aufgetragen und für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Detection Antikörper (166 µl Detection Antikörper in 10 ml verdünntem Reagent Diluent) für 2 h in die Wells gegeben. Hiernach erfolgten zuerst eine Signalverstärkung mittels 100 µl Streptavidin HRP (1:200 mit Reagent Diluent verdünnt), welches 20 min. im Dunkeln inkubiert wurde. Es schloss sich ein weiterer Waschvorgang an. Die Färbung wurde mittels 100 µl pro Well Substrate Solution abgeschlossen und abermals für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach fertiger Inkubation wurden 50 µl Schwefelsäure zu jedem Well dazugegeben, um den Färbeprozess zu beenden. Anschließend wurden die Mikroplatten in den Mikroplatten-Leser (VersaMax Mikroplattenreader; Molecular Devices, San José/USA) gestellt und mit der SoftMaxPro5.4 Software (Molecular Devices, San José/USA) bei 450 nm Wellenlänge die Konzentrationen von VEGF der Wells gemessen.

### 3.2.5.2 TGF-β1 ELISA

Der TGF-β1 ELISA-Test wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Er weist humanen natürlichen und rekombinanten TGF-β1 nach. Es wurde das Human TGF-β1 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis/USA) für den Nachweis von TGF-β1 in

den Proben verwendet. Die vorhandenen Materialien wurden mit Mischverhältnissen in der Tabelle 3.4 aufgeführt.

<b>Material</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Reagent Diluent	54 ml Aqua dest. + 6 ml Reagent Diluent 2(10x)
Wash Buffer	500 ml PBS + 250 µl 0,05% Tween 20
Capture Antikörper	83 µl Capture Antikörper ad 10 ml PBS
1.2N NaOH/0,5M HEPES	75 ml Aqua dest. + 12 ml 10N NaOH + 11,9 g HEPES + Auffüllen ad 100 ml Aquu dest.
Detection Antikörper	166 µl Detection Antikörper ad 10 ml Reagent Diluent
Standard	16,7 µl Standard in 1000 µl Reagent Diluent für eine Konzentration von 2000 pg
Streptavidin-HRP	50 µl Streptavidin ad 10 ml Reagent Diluent
Substrate Solution	5 ml Color Reagent A + 5 ml Color Reagent B

**Tabelle 3.4: Verwendete Materialien Human TGF-β1 ELISA**

Am Vortag der Durchführung des ELISA-Tests wurden 100 µl/Well des Capture Antikörpers in die 96-well Mikroplatte mittels einer Multipipette pipettiert. Nach Abdeckung durch den Plate Sealer und Beschriftung der Platte wurde über Nacht eine Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Aspiration und Verwerfen des Inhaltes der Wells wurde die Mikroplatte dreimal mit jeweils 400 µl/Well Waschlösung (s.o. Wash Buffer) mittels einer Multipipette gewaschen und anschließend auf einem sauberen Papiertuch ausgeklopft, um Flüssigkeitsrückstände in den Wells zu vermeiden. Nun erfolgte eine Blockierung mittels 300 µl/Well Reagent Diluent, die nach Verschluss der Mikroplatte mit dem Plate Sealer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde der Waschvorgang wie oben beschrieben wiederholt. Es wurden jeweils 200 µl der Probe mit 40 µl 1N HCL gemischt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert. Hiernach wurden weitere 40 µl des 1,2N NaOH/0,5M HEPES hinzugegeben. Man erhielt durch die Aktivierung zusätzlich eine 1,4-fache Verdünnung, welche später während des Messvorganges berücksichtigt wurde. Gleichzeitig wurde der Standard in einer Verdünnungsreihe ausgehend von einer

Konzentration von 2000 pg/ml in Dubletts in die Wells pipettiert. Nach Verschließen der Mikroplatte wurde die Platte für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abermals wurde der Waschvorgang wiederholt. Nun wurden 100 µl/Well Detection Antikörper pipettiert, die Platte mit einem neuen Plate Sealer abgedeckt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und es erfolgte ein erneuter Waschgang. Die Signalverstärkung erfolgte mit 100 µl/Well Streptavidin-HRP, welches nach Abdecken mittels Plate Sealer für 20 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde ein Waschvorgang durchgeführt. Hiernach wurden 100 µl/Well Substrate Solution aufgetragen und nach dem Verschluss mittels Plate Sealer für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach fertiger Inkubation wurden schließlich 50 µl/Well Schwefelsäure hinzugegeben und die fertigen Mikroplatten in den Mikroplatten Leser (VersaMax Mikroplattenreader; Molecular Devices, San José/USA) gestellt. Hier wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm mit der SoftMaxPro5.4 Software (Molecular Devices, San José/USA) die Konzentrationen der Wells gemessen.

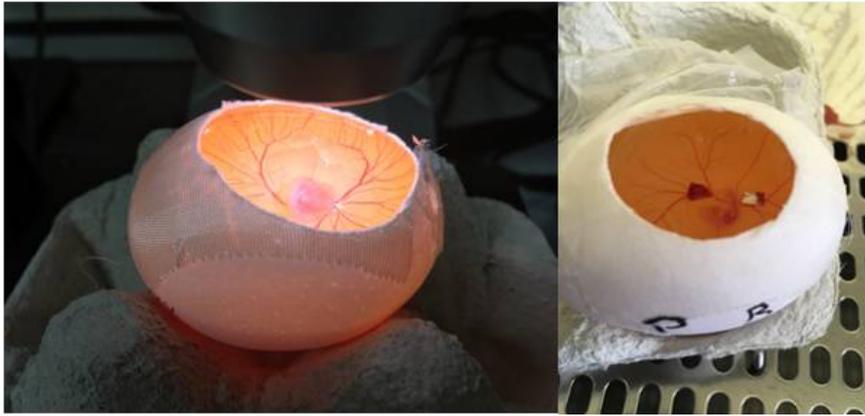
### **3.2.6 Yolk sac membrane Modell**

Aus dem etablierten CAM Modell wurde in den 1980er Jahren das yolk sac membrane (YSM) Modell als Alternative zur Untersuchung der Angiogenese entwickelt. Anfangs wurde es als frühes (early) CAM Modell bezeichnet (251-253). Es handelt sich auch hier um Hühnerembryonen, jedoch ist die Untersuchungseinheit nun nicht mehr die stark vaskularisierte CAM, sondern die sich bereits früher in der Embryogenese entwickelnde YSM (253, 254). Die YSM bildet sich aus dem sich entwickelnden Darm des Embryos am Ende des zweiten Entwicklungstages und breitet sich als Schicht aus Ektoderm über dem Eigelb aus, bis es komplett überzogen ist (255-258). Die YSM ist ab dem 4. Tag gut vaskularisiert und entwickelt sich weiter, bis sie am 7. Tag von der CAM überwachsen und ersetzt wird (259). Die Epithelzellen haben die Aufgabe, das Eigelb aufzunehmen und über das ausgebildete Gefäßnetzwerk den Embryo mit Nährstoffen zu versorgen (257, 260, 261).

Die Vorbereitung der Hühnereier unterscheidet sich anfangs nicht von der Methodik des CAM Modells. Die Eier werden bei etwa 37,5°C für 72 Stunden bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70-80% inkubiert. Im nächsten Schritt wird ein Teil des Eiweißes entfernt, die Eierschale wird eröffnet und anschließend mit einer durchsichtigen Folie verschlossen (252, 254, 259, 262, 263). Auch bei dem YSM Modell ist es möglich, den Hühnerembryo in ovo zu belassen oder eine Überführung in eine Petrischale oder ein anderes geeignetes Gefäß vorzunehmen (259). Die Applikation der zu untersuchenden

Substanz erfolgt schließlich am 4.-6. Tag, womit sich ein Beobachtungsfenster von 1-3 Tagen ergibt (252). Die Applikationsformen unterscheiden sich im Wesentlichen nicht von denen des CAM Modells. Auch die Auswertung des YSM Modells bleibt in den untersuchten Endpunkten zur Quantifizierung der Angiogenese und den eingesetzten Methoden zur Aufnahme der Bilder im Wesentlichen gleich (251, 252, 254, 259, 262). In der vorliegenden Arbeit wurden die Leghorn Eier in einer Brutmaschine Modell 3000, Type /d (Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg/Deutschland) für 3 Tage bei 38,5°C und konstanter Feuchtigkeit, erreicht durch das Einfüllen von Aqua dest., inkubiert. Die Rotationsfunktion der Brutmaschine wurde nicht benutzt, da die Eröffnung der Eier an der oberen Seite des Eies ein ständiges Rotieren unmöglich macht. Am 4. Tag der Entwicklung wurde den Eiern unter einer Werkbank zunächst ein Klebestreifen am spitzen Pol und zwei Leukosilkstreifen an der oberen Seite des Eies aufgeklebt, um ein Splintern der Eischale bei Eröffnung zu reduzieren. Anschließend wurde mittels einer 10 ml Spritze und einer 21G Kanüle die Eischale im Bereich des aufgeklebten durchsichtigen Klebestreifens durchstoßen. Es wurden 8-10 ml Eiweiß, je nach Größe, des Eies abgenommen und anschließend verworfen. Nach Entfernung der Kanüle wurde ein zweiter Klebestreifen über die Einstichstelle geklebt, um unkontrolliertes Austreten von weiterem Eiweiß zu verhindern. Daraufhin wurde mittels einer sterilen Schere an der oberen Seite des Eies eine ovale Öffnung geschnitten. Nun wurden die Öffnung mit Parafilm verschlossen und das Ei für weitere 24 h in die Brutmaschine gelegt.

Die wie oben beschriebenen PRF-, Kollagen- und bioaktivierten Membranen wurden am nächsten Tag auf die YSM appliziert. Anschließend wurde der Parafilm erneuert, um das Risiko einer Infektion der Eier zu vermindern. Bei der Platzierung wurde darauf geachtet, die Membranen auf die erste Abzweigung der Hauptgefäßstämme zu legen, um eine Vergleichbarkeit zu gewähren. Des Weiteren wurden pro Ei zwei Membranen appliziert, je eine pro Seite des Embryos.

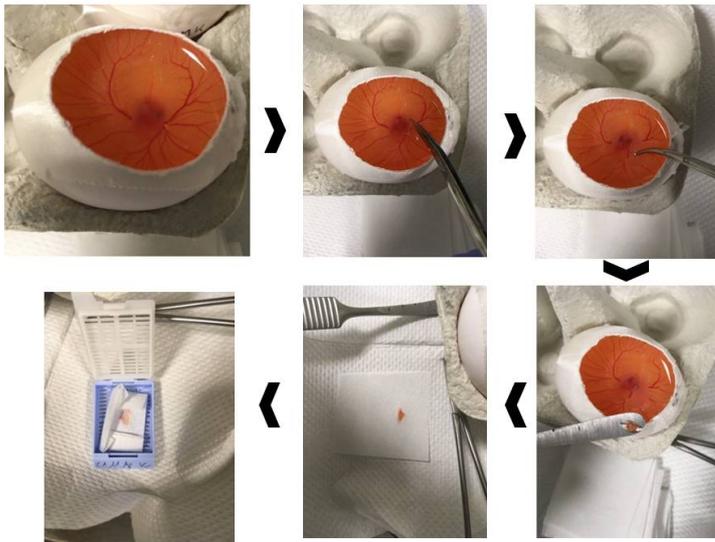


**Abbildung 3.3 Eier nach Eröffnung mit applizierten Membranen.**

Links: Beobachtung mittels Auflichtmikroskop. Rechts: Mit geöffnetem Parafilm und mit Beschriftung nach Applikation der Membranen.

### 3.2.7 Histologie

Es schlossen sich histologische Untersuchungen der YSM an, um die Ergebnisse der Lichtbildmikroskopie zu validieren. Gleichzeitig soll die histologische Untersuchung der Bestätigung dienen, dass es sich bei den beobachteten Strukturen um Gefäße handelt. Es wurden also nach Anfertigung der Fotos die Abschnitte der YSM mittels Schere ausgeschnitten, auf denen zuvor die Membranen lagen. Anschließend wurden sie mit einer Pinzette auf einen Löffel übertragen. Von diesem Löffel konnte der Ausschnitt der Membran auf ein Wägepapier gelegt werden, ohne dass der Ausschnitt zerrissen oder gefaltet wurde. Das Wägepapier wurde zu einem Umschlag gefaltet. Dies sollte verhindern, dass die Probe während des Ausblockprozesses verloren geht. Der gefaltete Umschlag wurde anschließend in eine histologische Kassette gelegt und für 24h in einer Fixationslösung aufbewahrt.



**Abbildung 3.4: Entnahmezyklus der Membranen und der YSM für die weitere histologische Untersuchung.**

Auf dem oberen linken Bild sieht man die YSM bereits nach Abheben der applizierten Membranen und den mit dem Auflichtmikroskop geschossenen Bildern. Im Uhrzeigersinn zum nächsten Bild fortschreitend, wird die YSM, auf der zuvor die Membran lag, mittels Schere ausgeschnitten, mittels einer Klemme gegriffen und auf einen Löffel überführt. Von dem Löffel aus wurden die Membranen vorsichtig auf Wägebepapier gelegt, bevor dieses zu einem Couvert gefaltet wurde und schließlich in die Einbettkassette gelegt wurde.

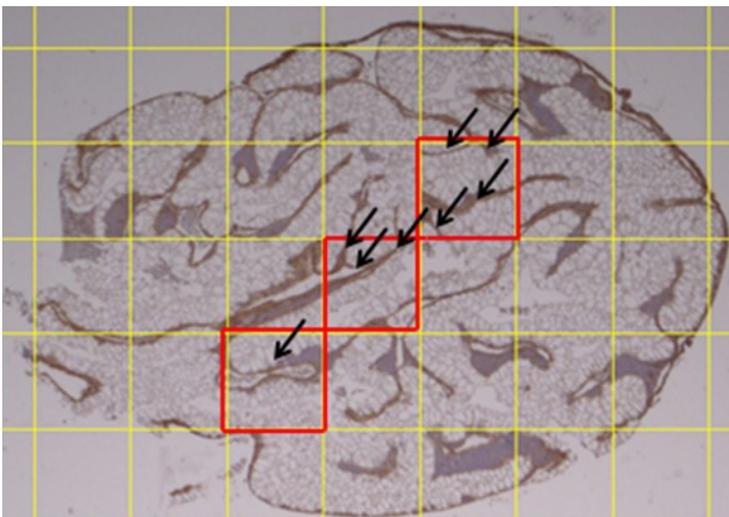
Anschließend wurden die histologischen Schnitte in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit der Dermatologie der Universitätsmedizin Mainz ausgeblockt. Die ausgeblockten Schnitte wurden mittels eines Mikrotoms geschnitten und im Wasserbad auf Objektträger übertragen. Die Objektträger wurden entsprechend der Einbettkassetten beschriftet, um die Zuordnung der Schnitte zu gewährleisten.

Anschließend wurde eine HE-Färbung mit allen gewonnenen Schnitten durchgeführt. Hierfür wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Die Küvette mit den Schnitten wurde dreimal für 5 min. in Xylol getaucht.
2. Daraufhin kam sie zweimal 5 min lang in 100%-iges Ethanol.
3. 5 min. 96%-iges Ethanol.
4. 5 min. 70%-iges Ethanol.
5. 5 min. in 50%-iges Ethanol.
6. Anschließend wurde sie für 20 min. in PBS getaucht, um die Entparaffinierung abzuschließen.
7. Nun kam die Küvette für 5 min. in Hämalaun, welches zuvor 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurde.

8. Hiernach wurde die Küvette für 10 min. unter einen Strahl fließenden Leitungswassers gestellt, um das Hämalaun vom Objektträger abzuwaschen.
9. Die Küvette wurde für 2 min. in Eosin gestellt.
10. Anschließend wurde die Küvette mit Aqua dest. gereinigt, um das Eosin abzuspielen.
11. Die Rehydrierung wurde durch kurzes, mehrmaliges Eintauchen in 70%-iges und danach 96%-iges Ethanol erreicht.
12. Dann wurde die Küvette für 5 min. in 100%-iges Ethanol getaucht.
13. Nachdem sie weitere 5 min. in Xylol stand, konnten die einzelnen Schnitte mit Eukitt und Deckgläsern eingedeckt werden.

Die fertiggestellten histologischen Schnitte wurden unter dem Digitalen Mikroskop (Keyence BZ-9000E Fluoreszenzmikroskop; Keyence, Osaka/Japan) betrachtet und es wurden digitale Bilder der Schnitte angefertigt. Anschließend wurden zufällig jeweils neun Schnitte pro Gruppe ausgewählt. Die Auswertung erfolgte nach Pseudonymisierung und Kodierung der Bilder durch einen weiteren, nicht in die Studie involvierten Arzt händisch. Zunächst wurde ein Gitter mit einer Kantenlänge von 500  $\mu\text{m}$  über die Bilder mit der Fiji Software (Wayne Rasband) gelegt. Es wurden jeweils drei Quadrate ausgezählt, deren Positionen immer ausgehend von der Mitte des Schnittes festgelegt wurden und für alle Schnitte gleich gewählt wurden. Ausgehend von den Ergebnissen der ausgezählten Quadrate wurde die Anzahl der Gefäße pro  $\text{mm}^2$  ermittelt. Anschließend wurden mit den entsprechenden Schnitten zwei weitere immunhistologische Färbungen durchgeführt (s.u.).



**Abbildung 3.5: Exemplarische Auszählung der Gefäße pro  $\text{mm}^2$  der histologischen Schnitte, die zuvor mit dem digitalen Mikroskop betrachtet und digitalisiert wurden.**

### 3.2.8 Immunhistologie

#### 3.2.8.1 $\alpha$ -SMA Färbung

Die  $\alpha$ -SMA Färbung ist spezifisch für glatte Muskelzellen. Sie ist gut geeignet die Media von Gefäßen darzustellen. Daher wurde sie in dieser Studie verwendet. Da es sich bei der Zielstruktur um Gefäße handelt, ist eine Färbung der glatten Muskulatur gut geeignet, um die Media abzubilden. Gleichzeitig können mit der Färbung gut große Gefäße dargestellt werden. Der verwendete  $\alpha$ -SMA-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Lois/USA) ist spezifisch für die Maus, steuerte jedoch auch die in der YSM vorhandenen Gefäße an (247). Die Schnitte waren aus denselben Blöcken geschnitten wie diejenigen, die zuvor der HE-Färbung unterzogen wurden.

Es wurde nach folgendem Protokoll gefärbt:

1. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte nach demselben Protokoll, wie unter dem Abschnitt 3.2.6 in den Schritten 1.-6. beschrieben.
2. Nachdem die Schnitte für 20 min. in PBS lagen, wurden die Proteine demaskiert, indem sie für 30 min. in einem Dampfkocher in einer Natrium-Citratpufferlösung mit einem pH-Wert von 6 standen.
3. Anschließend wurde die Küvette zweimal 10 min. in PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift in PBS wurden die Objektträger mit Light duty tissue papers getrocknet.
4. Nun wurde auf die Schnitte ein Tropfen Peroxidase Block appliziert, für 5 min. einwirken lassen und nach angelaufener Zeit abtropfen gelassen.
5. Es folgte ein weiterer Waschschrift, wie unter 3. beschrieben.
6. Auf die Schnitte wurde der DAKO Protein Block getropft, 10 min. stehen gelassen und nach abgelaufener Zeit abtropfen gelassen.
7. Es folgte das Auftragen des primären Antikörpers ( $\alpha$ -SMA), der für eine Stunde inkubierte. Für diese Zeitspanne wurden die Schnitte in eine Feuchtkammer gestellt, um einem Austrocknen der Schnitte vorzubeugen.
8. Es folgte ein weiterer Waschschrift, wie unter 3. beschrieben.
9. Nun wurde auf die Schnitte ein Tropfen Polymer-HRP anti-Maus appliziert und für 30 min. in der Feuchtkammer inkubiert.
10. Es folgte ein weiterer Waschschrift, wie unter 3. beschrieben,
11. Auf die Schnitte wurde ein Tropfen DAB (1ml DAB Substrat Fl. 3a + 20  $\mu$ l Liquid DAB + Chromogen) appliziert und für 5 min. inkubiert.
12. Es folgte ein weiterer Waschschrift, wie unter 3. beschrieben.

13. Die Rehydrierung und das Eindecken erfolgte, wie unter dem Abschnitt 3.2.6 in den Schritten 11.-13. beschrieben.

### 3.2.8.2 CD 105 Färbung

Die CD 105 (Endoglin) Färbung (Biorbyt, Cambridge/Großbritannien) ist eine spezifische immunhistologische Färbung. Endoglin gilt als kritischer Marker für die Angiogeneese (248).

Es wurde nach folgendem Protokoll gefärbt:

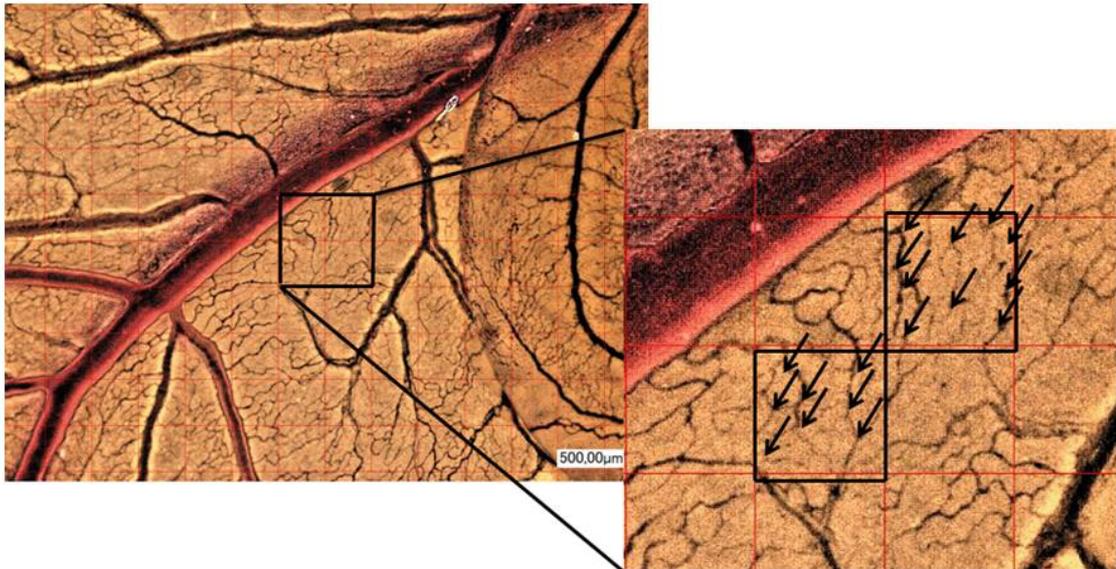
1. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte nach demselben Protokoll, wie unter dem Abschnitt 3.2.6 in den Schritten 1.-6. beschrieben.
2. Die Schnitte wurden dreimal 5min. in PBS gewaschen und anschließend mit light duty tissue paper abgetrocknet.
3. Im Anschluss wurde für 5 min. 0,1%-iges Triton-X-100 (10 ml PBS + 10 µl Triton-X-100) auf die Schnitte getropft.
4. Nun wurde die Küvette zweimal 5 min. in PBS gewaschen und die Schnitte anschließend wie in Schritt 2 beschrieben abgetrocknet.
5. Die Schnitte wurden für 5 min. mittels PBS/BSA blockiert.
6. Es folgte ein Waschschrift, wie unter Schritt 4 beschrieben.
7. Die Schnitte wurden für 10 min. mit PBS/Goat Normalserum blockiert.
8. Es folgte ein Waschschrift, wie unter 4. beschrieben.
9. Anschließend wurde der CD 105 Anti chicken Antikörper in einer Konzentration von 1:750 nach Verdünnung mit PBS/BSA 1% für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
10. Es folgte ein Waschschrift, wie unter 2. beschrieben.
11. Nun wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper Alpha rabbit 488 in einer Konzentration von 1:100 nach Verdünnung mit PBS/BSA 1% für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften inkubiert.
12. Es folgte ein Waschschrift, wie unter 2. beschrieben.
13. Nun wurden die Schnitte für 5 min. mit DAPI, der Zellkernfärbung, im Dunkeln inkubiert.
14. Es folgte ein Waschschrift, wie unter 2. beschrieben.
15. Nun wurden die Schnitte mit Fluoreszenz Mount Medium und Eindeckgläsern eingedeckt.

Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen erfolgte nach Pseudonymisierung und Kodierung der Bilder durch einen weiteren, nicht in der Studie involvierten Arzt händisch, wie bereits für die HE gefärbten Schnitte in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Zusätzlich zu dem Endpunkt der Gefäße pro mm<sup>2</sup> wurde bei der immunhistochemischen Auswertung noch die Percentage, also der Anteil an  $\alpha$ -SMA/CD 105 positiven Gewebes am gesamten Schnitt ermittelt. Hierfür wurden die mit dem digitalen Mikroskop (Keyence BZ-9000E Fluoreszenzmikroskop; Keyence, Osaka/Japan) aufgenommenen Bilder der Schnitte mit der Software Hybrid Cell Count (Keyence, Osaka/Japan) ausgewertet. Hierbei mussten zunächst die Schnitte am Computer markiert werden. Anschließend konnten die eingefärbten Gebiete ausgewählt werden. Hiermit errechnete die Software den Anteil an  $\alpha$ -SMA/CD 105 positiven Gewebe.

### 3.2.9 Lichtbildmikroskopie

Die vorbereiteten Embryonen wurden nach 24 h Inkubationszeit mittels Lichtbildmikroskopie untersucht. Hierfür wurden zunächst der Parafilm entfernt und die Öffnung an der obenliegenden Seite erweitert, um einen besseren Blick auf die YSM zu gewährleisten. Nun wurde eine Aufnahme mit dem VHX-1000D Digitalmikroskop (Keyence, Osaka/Japan) der zu untersuchenden Membran in 30x Vergrößerung gemacht. Hierbei wurde darauf geachtet, die Membran zentriert aufzunehmen. Anschließend wurde die Membran entfernt, sodass ein freier Blick auf die darunterliegende YSM und deren Gefäßnetz erreicht wurde. Es wurde darauf geachtet, die Position der YSM unter dem Mikroskop nicht zu verändern, um die vorher erreichte Zentrierung nicht aufzuheben. Danach wurden Aufnahmen in 30x und 50x Vergrößerung gemacht. Über die Bilder wurde digital ein Gitter mit 500  $\mu$ m Seitenlänge für die spätere Auswertung gelegt.

Die Auswertung erfolgte nach Pseudonymisierung und Kodierung der Bilder durch einen weiteren, nicht in der Studie involvierten Arzt. Durch die Zentrierung der Bilder konnte innerhalb des mittleren Quadratmillimeters davon ausgegangen werden, dass er unter der Membran lag. Hier wurden jeweils zwei gegenüberliegende Kästchen des Gitters repräsentativ als ROI ausgewählt. Es wurden alle Gefäße sowie alle Gefäßverzweigungspunkte (branching points) gezählt.



**Abbildung 3.6:** Exemplarische Auszählung der Gefäßverzweigungspunkte anhand der mit dem Auflichtmikroskop geschossenen Bilder der YSM nach Entfernung der zuvor applizierten Membranen.

### 3.2.10 Chorion-Allantois-Membran Modell

Anfang der 1910er Jahre erfolgte die erste Beschreibung von Tumorangiogenese im CAM Modell durch Peyton Rous und James B. Murphy (264-267). Die Beschreibung als Angiogenesemodell wurde 1974 von der Forschungsgruppe um Folkmann et al. vorgestellt. Es wurde zunächst zur Untersuchung des Entwicklungspotenzials von embryologischen Gewebstransplantaten und der Tumorangiogenese verwendet (268-270).

So wird das CAM Modell häufig in der Erforschung wichtiger Wachstumsfaktoren und Enzyme im Rahmen der Angiogenese verwendet. Auch die Wirkung von pro- und antiangiogen wirksamen Medikamenten (271-273) und den genauen Pathomechanismen der Angiogenese von Tumoren kann hierdurch untersucht werden (263, 272, 273).

Als Untersuchungsobjekt dient die gut vaskularisierte Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryos. Die Allantois entsteht an den Tagen 3-4 der Entwicklung des Embryos. Die Membran der Allantois dehnt sich aus und verschmilzt mit der Chorionmembran am 4.-5. Tag der embryonalen Entwicklung zu der CAM. Diese ist reich an Gefäßen und essentiell für die Entwicklung des Embryos (263, 270, 274). Die CAM dient als respiratorisches System für den Embryo und ist bis zum 19. Tag der Entwicklung zuständig für den Gasaustausch (274, 275). Sie wächst schnell, so beträgt die durchschnittliche Oberfläche am 6. Tag etwa 6 cm<sup>2</sup>. Am 10.-14. Tag ist sie etwa 65 cm<sup>2</sup> groß (274). Das schnelle Wachstum der Membran ist notwendig, um den ebenfalls

schnell wachsenden Embryo zu versorgen. Dies macht gleichzeitig eine schnelle Angiogenese in diesem Zeitraum notwendig (274).

Aufgrund der einfachen Handhabung und der ausgeprägten Gefäßstruktur, wird das CAM Modell häufig für die Forschung im Rahmen der Angiogenese benutzt (263). Es werden befruchtete Hühnereier bei 37°C für 72 Stunden inkubiert. Danach werden die Eierschalen abgewischt, um eine Verschleppung von Mikroorganismen in das Innere des Eies zu verhindern. Nun wird ein Teil des Eiweißes entfernt, um die Anhaftung an die Eischalenmembran möglichst gering zu halten. Um die zu testende Substanz auf einem definierten Ort der CAM zu platzieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten wie Polymerpellets, Schwämme aus Gelatine und Scheiben aus Plastik (270). Es gibt Forschungsgruppen, welche das CAM Modell in ovo ausführen. Alternativ können die Hühnerembryonen in Petrischalen überführt werden und somit eine in vitro Betrachtung der CAM erfolgen (268, 270). 2015 wurde von Huang et al. eine Methode beschrieben, bei welcher der Hühnerembryo nach drei Tagen Bebrütung in eine künstliche, kubische Eischale überführt wird. Hierbei ist es möglich, die CAM von allen Seiten zu beobachten, Durch Modifikation der künstlichen Eischale können Kammern angebaut werden, in welchen eine genaue Beobachtung der CAM oder einzelner Gefäße erfolgen kann. Durch diesen Versuchsaufbau können gleichzeitig mehrere Versuchseinheiten bei nur einer CAM erreicht werden. Die zu untersuchende Substanz kann leicht appliziert werden. Zur Vergleichbarkeit mit den bisher angewendeten CAM Modellen sind noch Studien notwendig (266, 276, 277). In der vorliegenden Arbeit wurden die Leghorn Eier an Tag 0 in eine Brutmaschine bei 38,5°C und einer konstanten Feuchtigkeit durch Zugabe von Aqua dest. inkubiert. An Tag 4 wurden die Eier, wie unter dem Abschnitt 3.2.4 beschrieben, präpariert und wieder in die Brutmaschine Modell 3000, Type /d (Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg/Deutschland) gestellt. Am 11. Entwicklungstag wurden die vorbereiteten PRF-, Kollagen- und bioaktivierten Membranen auf der CAM platziert, wobei hier auch wieder die erste Verzweigung der Hauptgefäße des Embryos als Orientierungspunkt dienten. Die Eier wurden entsprechend ihrer Gruppe beschriftet, mit einem neuen Parafilm versiegelt und für weitere 24 h in die Brutmaschine gestellt.

Mögliche Endpunkte, um die Angiogenese im CAM Modell zu quantifizieren, sind die durchschnittliche Anzahl an Gefäßen in einem definierten Bereich und die Anzahl der Verzweigungspunkte der Gefäße. Des Weiteren können mittels Softwareprogrammen die Länge dieser Gefäße sowie die Dichte des Gefäßnetzwerkes und der Verzweigungspunkte ermittelt werden. So kann ein Anhaltspunkt für die stattgefundenen

Angiogenese oder deren Inhibition gegeben werden (263, 278). Zur Generierung der Bilder wird meist die Mikroskopie herangezogen. Alternativ können andere, aufwändigere Verfahren wie eine optische Dopplertomographie, die Magnetresonanztomographie oder die Positronen-Emissions-Tomographie benutzt werden (278).

### **3.2.11 In-vivo Fluoreszenz**

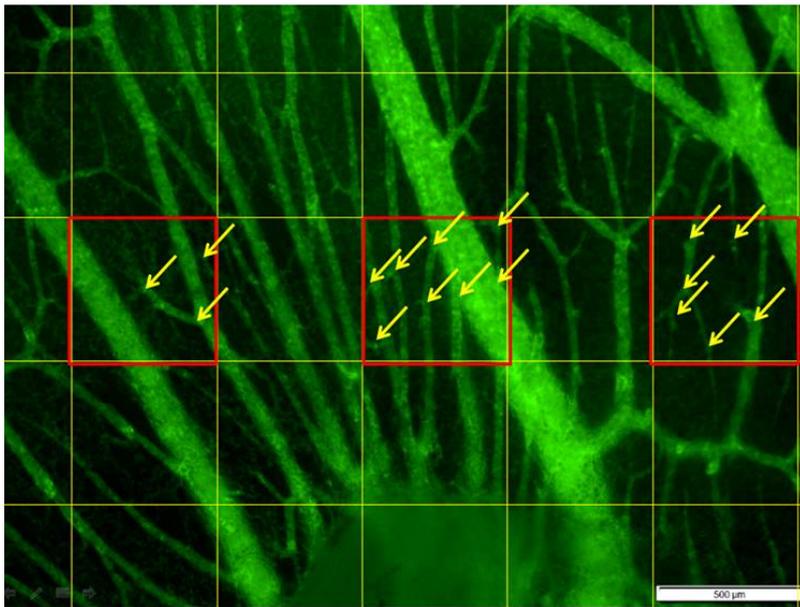
Die vorbereiteten Embryonen des CAM-Modells wurden nach 24 h mittels in-vivo-Fluoreszenz untersucht. Hierzu wurde unter freundlicher Erlaubnis der HNO-Klinik der Universitätsmedizin Mainz und der Biomaterials Förderung das BXFM Version Intravitalmikroskop (Olympus, Shinjuku/Japan) benutzt. Dieses ermöglichte es, die Gefäße valide darzustellen. Zunächst wurden die Öffnungen an der obenliegenden Seite der Eier mit einer Schere vergrößert, um einen besseren Zugang zum Gefäßnetz zu erreichen. Es folgte nach Knicken der 26G Kanüle eine Injektion von 0,3 ml 5%-iger FITC-Dextran-Lösung aufgezogen in einer 1 ml Spritze. Zu vermeiden waren ein Durchstechen des Blutgefäßes sowie das Herbeiführen einer Luftembolie. Nach der Injektion wurde die Spritze entfernt und das Gefäß mit einem Silbernitrat-Kaliumnitrat Ätzstäbchen verschlossen, um das Verbluten und Austreten des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

Es wurden bei 5x Vergrößerung Bilder an der dem Embryo abgewandten Seite der Membran gemacht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Membran aufgenommen wurde, um bei der späteren Auswertung eine Orientierung zu gewährleisten. Der ursprüngliche Ansatz, die applizierte Membran von der CAM mit einer Pinzette zu lösen, wie in dem YSM Modell geschehen und beschrieben, wurde durch das schnelle Einwachsen von Gefäßen in die applizierte Membran wieder verworfen. Es kam zu Blutungen und Verletzungen der CAM beim Versuch, die Membranen zu entfernen. Deshalb erfolgte die Analyse des Randbereiches der applizierten Membranen.

Die Bilder wurden später mit Fiji ausgewertet. Alle Bilder wurden pseudonymisiert und kodiert. Die Auswertung erfolgte durch einen Arzt, welcher nicht in die Studie involviert war. Hierzu wurden sie zunächst bearbeitet, um den Kontrast zwischen schwarzem Hintergrund und grün fluoreszierenden Gefäßen zu erhöhen. Mit dem Plug-In „Grid“ (Wayne Rasband) wurde nun zunächst ein Gitter digital auf das Bild gezeichnet. Das Gitter hatte eine Seitenlänge von 500 µm. Nun wurden drei ROIs ausgewählt, welche für jede Datenerhebung für die Bilder gleich blieben. Es handelte sich um drei definierte

Quadrate, welche sich in der Mitte des Bildes befanden und jeweils 500  $\mu\text{m}$  voneinander entfernt waren (s. Abb. 3.6).

In den ROIs wurden die Gefäße bis zur zweiten Aufteilung/Generation sowie deren Verzweigungspunkte gezählt. Nach der Auszählung erfolgte eine computergestützte Analyse der Bilder. Hierfür wurden Fiji und das „Vessel Analysis“ Plug-In (Nivetha Govindaraju, M farna) benutzt. Mit Hilfe dieses Plug-Ins konnte über Binarisierung der Bilder die Gefäßdichte (Vascular density) und über Skelettisierung die Gefäßlängendichte (Vascular length density) berechnet werden. Die ROIs waren dieselben wie bei der vorangegangenen Analyse.



**Abbildung 3.7:** Exemplarische Auszählung der Gefäßverzweigungspunkte der mit dem Intravitalmikroskop geschossenen Bilder von der CAM im Randbereich der applizierten Membran (s. grüne Fläche im unteren Bildabschnitt).

### 3.3 Statistische Methodik

Die statistische Auswertung wurde mittels IBM SPSS Statistics (Version 23, IBM, Ehningen/Deutschland) durchgeführt. Für die Verwaltung der Forschungsdaten wurde Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond/USA) verwendet. Die Erstellung der Graphiken erfolgte mit Microsoft Office Power Point 2007 (Microsoft, Redmond/USA) und IBM SPSS Statistics.

Aufgrund des explorativen Charakters der Arbeit wurden die Hauptfragen nicht für multiples Testen adjustiert. Die Ergebnisanalyse erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn Philipp Mildenerger, Mitarbeiter am Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI), der Universitätsmedizin Mainz. Vor der Durchführung des jeweiligen Tests wurde eine deskriptive Datenanalyse durchgeführt

und anschließend die Datensätze mit dem Shapiro-Wilk Test auf ihre Normalverteilung untersucht.

Die Versuchsreihe mit der YSM wurde mittels der Poisson-Regression ausgewertet. Bei allen Ergebnissen wurde im Falle einer Normalverteilung der Daten der t-Test für die weitere Analyse verwendet. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde der Mann-Whitney-U Test eingesetzt. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden in Form von Boxplots visualisiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse des ELISAS

Die im Folgenden untersuchten Gruppen setzen sich aus einer jeweils bioaktivierten und nicht behandelten Membran zusammen: biologisierte Jasonmembran (JB), native Jasonmembran (JN), biologisierte Mucodermmembran (MB), native Mucodermmembran (MN), biologisierte Collprotectmembran (CB), native Collprotectmembran (CN) und eine PRF-Gruppe zur Kontrolle der biologisierten Membranen.

Zuerst wurden die Membranen auf ihre Freisetzung der Wachstumsfaktoren VEGF und TGF- $\beta$ 1 in vitro untersucht. Hierbei bestanden die Gruppen aus n=12 für die VEGF-Freisetzung und n=9 in der Messreihe für die TGF- $\beta$ 1-Freisetzung.

#### 4.1.1 VEGF ELISA

Die Ergebnisse des VEGF ELISA Assays zeigen in der univariaten Analyse mittels ANOVA einen starken, statistisch auffälligen Effekt zwischen den Untersuchungszeitpunkten ( $p < 0,001$ ), den Zusammenhang zwischen Untersuchungszeitpunkt und Biologisierung ( $p < 0,001$ ), sowie einen statistisch signifikanten Effekt für den Zusammenhang zwischen Zeit, Biologisierung und der jeweiligen Membran ( $p < 0,05$ ). Die ANOVA zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den Membranen ( $p > 0,05$ ).

Die angeschlossenen Post hoc Tests sollten nun genauer untersuchen, für welche Zeitpunkte Unterschiede zwischen den Gruppen sowie innerhalb der einzelnen Gruppen anhand der vergangenen Zeit bestehen. Hierfür wurden paarweise t- Tests oder Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde aufgrund des explorativen Charakters der Arbeit nicht angepasst und verblieb bei  $p < 0,05$ .

Die Biologisierung führte in allen Gruppen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von VEGF sowie einem im Vergleich zu der PRF-Gruppe vergleichbaren VEGF-Level Vergleichsgruppe (exemplarisch die 24h-Werte: JB: 128,21 pg/ml vs. JN: 8,72 pg/ml,  $p < 0,001$ ; MB: 93,91 pg/ml vs. MN: 13,97 pg/ml,  $p < 0,05$ ; CB: 104,96 pg/ml vs. CN: 2,21 pg/ml,  $p < 0,001$  und PRF: 95,51 pg/ml; s. Abb. 4.1). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen biologisierten Gruppen und der PRF-Gruppe in den paarweisen t-Tests nachgewiesen werden ( $p > 0,05$  für alle, s. Abb. 4.1), jedoch war tendenziell nach 24h die Freisetzung von VEGF in der CB-Gruppe am

höchsten. Für die Jasonmembran wurde gezeigt, dass sie nach 24h ( $p < 0,001$ ), nach 96h (JB: 63,83 pg/ml vs. JN: 9,45 pg/ml,  $p < 0,001$ ) und nach 168h (JB: 26,11 pg/ml vs. JN: 4,83 pg/ml,  $p < 0,001$ ) eine statistisch stark signifikant erhöhte VEGF Freisetzung nach der Biologisierung aufweist (s. Abb. 4.1). Für die Mucodermmembran wurde nach 24h eine signifikant erhöhte VEGF-Freisetzung nach Biologisierung gezeigt (MB: 93,91 pg/ml vs. MN: 13,97 pg/ml,  $p < 0,05$ ), wohingegen bei der Collprotectmembran die Biologisierung nach 24h (CB: 104,96 pg/ml vs. CN: 2,21 pg/ml,  $p < 0,001$ ) und 48h (CB: 26,62 pg/ml vs. CN: 7,15 pg/ml,  $p < 0,01$ ) zu einer vermehrten Freisetzung führten (s. Abb. 4.1). Die Messung nach 24h zeigte in allen biologisierten Gruppen signifikant die höchste VEGF Freisetzung ( $p < 0,05$ ).

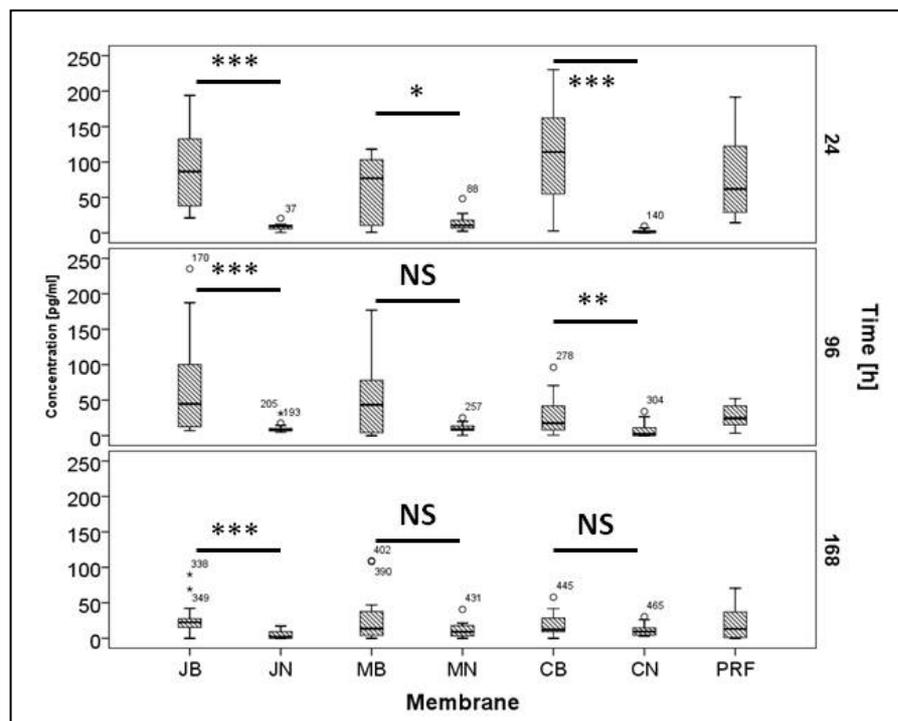


Abbildung 4.1: ELISA VEGF.

Dargestellt wird die Freisetzung von VEGF aus den verschiedenen Membranen in pg/mg über drei verschiedene Zeitpunkte (24h, 96h, 168h). Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = nicht statistisch signifikant (51).

#### 4.1.2 TGF- $\beta$ 1 ELISA

Die Analyse des TGF- $\beta$ 1 ELISA Assays zeigte vergleichbare Ergebnisse zu denen des VEGF ELISA Assays. Es konnte keine Freisetzung des Wachstumsfaktors aus den nativen Membranen gezeigt werden. Die ANOVA zeigt hier einen statistisch signifikanten Effekt für die jeweiligen Messzeitpunkte auf die Freisetzung ( $p < 0,001$ ). Zwischen den biologisierten Membranen konnte kein Unterschied gezeigt werden ( $p > 0,05$ ).

Die Post hoc Tests wurden analog zu denjenigen der Analyse des VEGF ELISAs durchgeführt. Aufgrund der fehlenden TGF- $\beta$ 1-Freisetzung aus den nativen Membranen wurde zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung durch die Biologisierung nachgewiesen (exemplarisch die 24h-Werte: JB: 6063,89 pg/ml vs. JN: 0 pg/ml,  $p < 0,001$ ; MB: 6213,4 pg/ml vs. MN: 0 pg/ml,  $p < 0,001$ ; CB: 8001,84 pg/ml vs. CN: 0 pg/ml,  $p < 0,001$  und PRF: 8010,73 pg/ml, s. Abb. 4.2). Der Vergleich zwischen den einzelnen biologisierten Gruppen sowie zwischen den biologisierten Gruppen und der PRF-Gruppe führte jeweils zu nicht signifikanten Ergebnissen ( $p > 0,05$ ), tendenziell war die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1-Werte jedoch in der CB und PRF-Gruppe am höchsten. Auch in dieser Messreihe konnte über alle Membranen hinweg gezeigt werden, dass die Freisetzung innerhalb der ersten 24h statistisch signifikant am höchsten war.

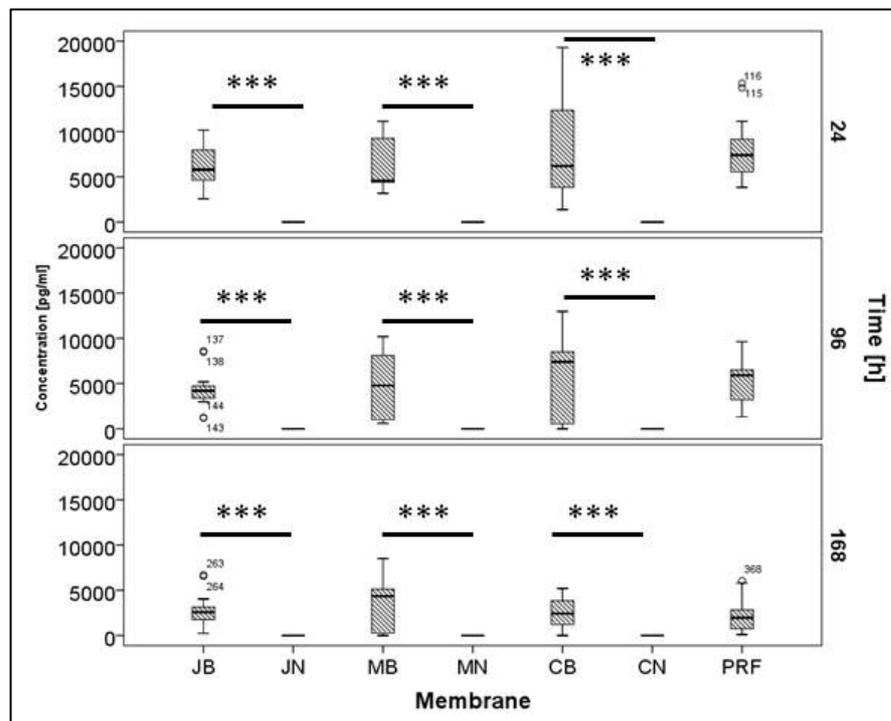


Abbildung 4.2: ELISA TGF- $\beta$ 1.

Dargestellt wird die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 aus den verschiedenen Membranen in pg/mg über drei verschiedene Zeitpunkte (24h, 96h, 168h). Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

## 4.2 Ergebnisse des YSM Modells

In der folgenden Messreihe wurden die in Abschnitt 4.1 bereits beschriebenen Gruppen JB, JN, MB, MN, CB, CN und PRF, sowie die YSM nativ untersucht. Die Gruppen bestanden jeweils aus  $n=28$  Untersuchungseinheiten.

### 4.2.1 Verzweigungspunkte des Gefäßnetzes

In der Poisson-Regression zeigte sich für alle Gruppen, dass die biologisierten Membranen eine signifikant höhere Anzahl an Verzweigungspunkten des Gefäßnetzwerkes aufweisen als in der jeweiligen nativen Vergleichsgruppe (JB:  $51,36 \pm 2,72$  vs. JN:  $33,21 \pm 2,21$ ,  $p < 0,001$ ; MB:  $50,71 \pm 2,71$  vs. MN:  $34,36 \pm 2,24$ ,  $p < 0,001$ ; CB:  $51,93 \pm 2,74$  vs. CN:  $29,93 \pm 2,1$ ,  $p < 0,001$  und PRF:  $49,86 \pm 2,55$  vs. YSM:  $39,57 \pm 2,26$ ,  $p < 0,001$ ; s. Abb. 4.3). Zwischen den einzelnen biologisierten Membranen konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (alle  $p > 0,05$ ). Ebenso gab es keinen Unterschied zwischen der PRF-Gruppe und den einzelnen biologisierten Membranen (alle  $p > 0,05$ ). Allerdings zeigte sich in der Analyse eine Erhöhung der Verzweigungspunkte in der YSM Gruppe im Vergleich zu den nativen Kollagenmembranen (YSM:  $39,57 \pm 2,26$  vs. JN:  $33,21 \pm 2,21$  ( $p < 0,001$ ), MN:  $34,36 \pm 2,24$  ( $p < 0,01$ ) und CN:  $29,93 \pm 2,1$  ( $p < 0,001$ ), s. Abb. 4.3).

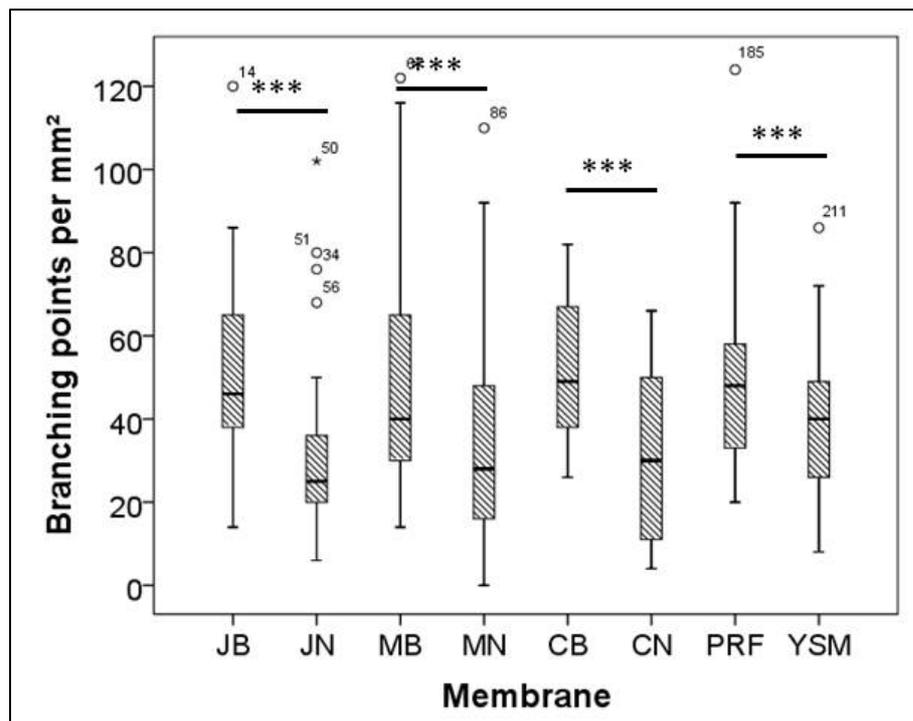


Abbildung 4.3: Verzweigungspunkte pro  $\text{mm}^2$  des Gefäßnetzwerkes der YSM unter dem Auflichtmikroskop.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

### 4.2.2 Gefäße

Die Untersuchung der Bilder auf die Anzahl der Gefäße pro  $\text{mm}^2$  hin zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Poisson-Regression führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Gefäße in der YSM für alle biologisierten Gruppen im Vergleich zu der

jeweiligen nativen Kollagenmembran (JB:  $61,14 \pm 2,97$  vs. JN:  $40,64 \pm 2,43$ ;  $p < 0,001$ , MB:  $60,86 \pm 2,96$  vs. MN:  $40,71 \pm 2,34$ ;  $p < 0,001$ , CB:  $60,64 \pm 2,96$  vs. CN:  $39,29 \pm 2,26$ ;  $p < 0,001$  und PRF:  $61,14 \pm 2,97$  vs. YSM:  $40,64 \pm 2,43$ ;  $p < 0,001$ ; s. Abb. 4.4). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen biologisierten Membranen (alle  $p < 0,05$ ) sowie zwischen den biologisierten Membranen im Vergleich zu der PRF-Gruppe (alle  $p < 0,05$ ).

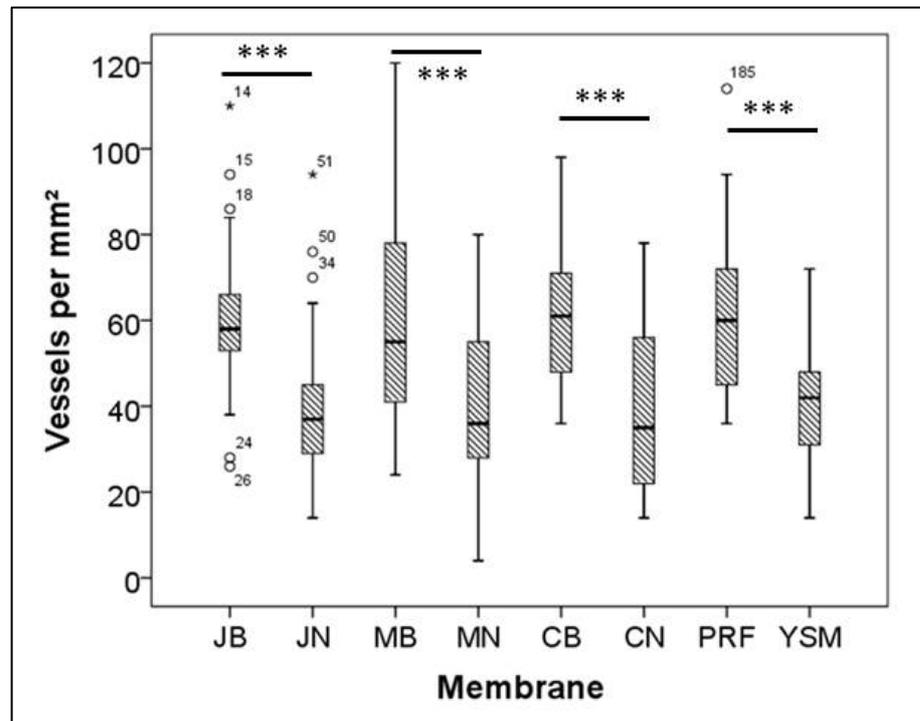


Abbildung 4.4: Gefäße pro mm<sup>2</sup> der YSM unter dem Auflichtmikroskop.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

### 4.3 Ergebnisse der histologischen Auswertung

Nach der Auswertung der Bilder wurden Subgruppen von  $n=9$  einer weiteren histologischen und immunhistochemischen Untersuchung unterzogen, um die vorherigen Ergebnisse zu verifizieren. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit HE gefärbt, bevor die immunhistochemischen Färbungen CD105 und  $\alpha$ -SMA durchgeführt wurden, um die Gefäße spezifisch darzustellen.

Im Falle der HE-Färbung, wurde die Anzahl der Gefäße pro mm<sup>2</sup> semiquantitativ ausgezählt. Für die beiden immunhistochemischen Färbungen wurde zusätzlich zu der semiquantitativen Auswertung eine Software (Hybrid Cell Count; Keyence, Osaka/Japan) verwendet, welche den gefärbten Anteil des histologischen Schnittes

ermittelte. Diese Methode diente der Verifizierung der semiquantitativen Zählung und der Differenzierung zwischen Gefäßanzahl und der Größe der gemessenen Gefäße.

### 4.3.1 HE Färbung

Die Analyse der Anzahl der Gefäße pro  $\text{mm}^2$  zeigte in den biologisierten Gruppen signifikant höhere Werte als in den jeweiligen Vergleichsgruppen (JB:  $20,59 \pm 3,59$  vs. JN:  $13,19 \pm 3,25$ ,  $p < 0,01$ , MB:  $23,26 \pm 4,56$  vs. MN:  $11,41 \pm 2,61$ ,  $p < 0,001$ , CB:  $21,78 \pm 4,13$  vs. CN:  $12,44 \pm 3,84$ ,  $p < 0,01$ , PRF:  $17,48 \pm 3,01$  vs. YSM:  $13,19 \pm 3$ ,  $p < 0,05$ , s. Abb. 4.5). Die Anzahl der Gefäße war in der JB Gruppe ca. 1,60-fach, in der MB Gruppe ca. 2,1-fach, in der CB-Gruppe ca. 1,9-fach und in der PRF-Gruppe ca. 1,4-fach im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe erhöht. Zwischen den einzelnen biologisierten Membranen kam es zu keinen Unterschieden, mit Ausnahme einer ca. 1,3-fach erhöhten Gefäßzahl in der biologisierten Mucodermgruppe im Vergleich zu der PRF (MB:  $23,26 \pm 4,56$  vs.  $17,48 \pm 3,01$ ,  $p < 0,05$ ).

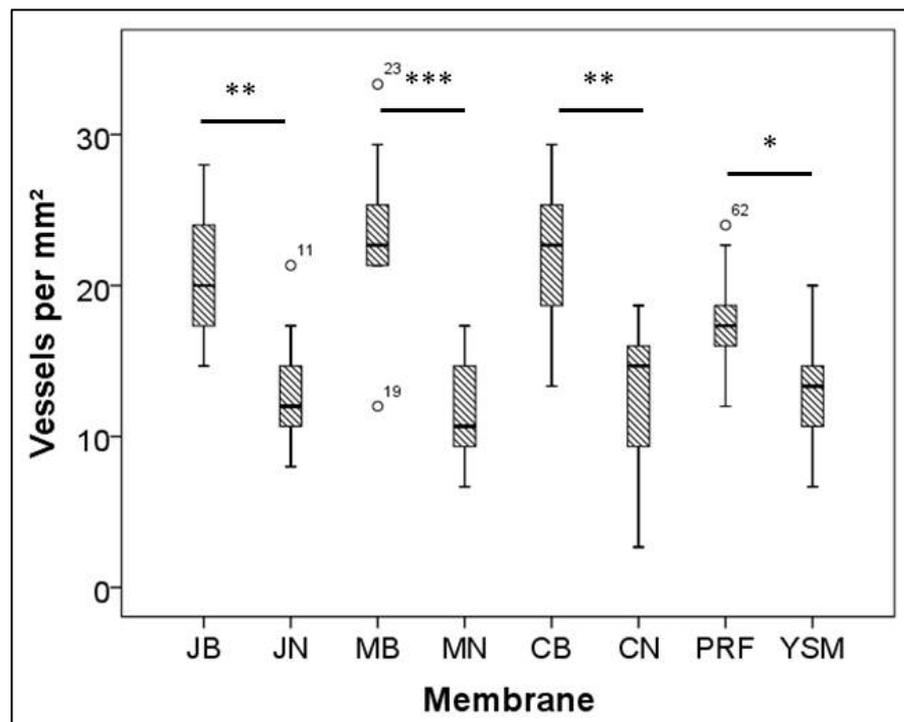


Abbildung 4.5: Gefäße pro  $\text{mm}^2$  nach Auswertung der HE Schnitte der YSM.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

### 4.3.2 $\alpha$ -SMA Färbung

Die Auswertung der  $\alpha$ -SMA-gefärbten histologischen Schnitte zeigte für die Anzahl der Gefäße pro  $\text{mm}^2$  ein vergleichbares Ergebnis zu demjenigen der HE-Schnitte. Auch hier

war in allen biologisierten Gruppen die Anzahl der Gefäße im Vergleich zu den Kontrollgruppen statistisch signifikant erhöht (JB:  $20,3 \pm 3,92$  vs. JN:  $12,44 \pm 3,59$ ,  $p < 0,01$ , MB:  $23,85 \pm 4,57$  vs. MN:  $17,33 \pm 4,97$ ,  $p < 0,05$ , CB:  $26,81 \pm 3,53$  vs. CN:  $16,89 \pm 3,94$ ,  $p < 0,01$  und PRF:  $19,26 \pm 2,76$  vs. YSM:  $13,93 \pm 5,95$ ,  $p < 0,05$ , s. Abb. 4.6). Die Anzahl der Gefäße war in der JB-Gruppe ca. 1,7-fach größer, in der MB-Gruppe ca. 1,4-fach, in der CB-Gruppe ca. 1,7-fach und in der PRF-Gruppe ca. 1,5-fach erhöht im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe. Es zeigte sich in dieser Versuchsreihe eine vermehrte Gefäßzahl in der CB-Gruppe im Vergleich zu der JB- ( $p < 0,05$ ) und zu der PRF-Gruppe ( $p < 0,01$ ).

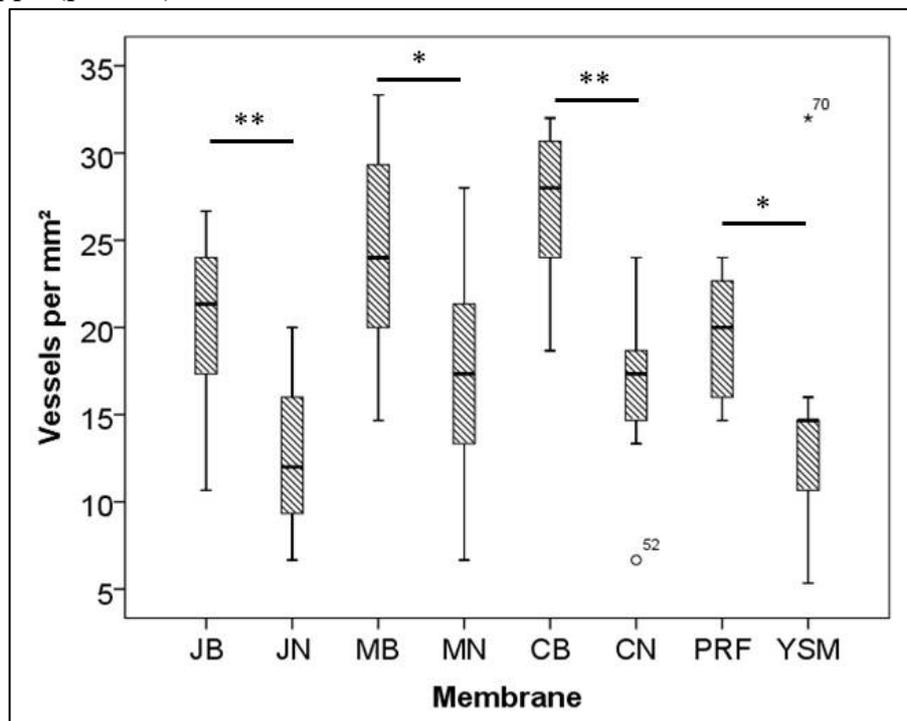


Abbildung 4.6: Gefäße pro  $\text{mm}^2$  nach Auswertung der immunhistochemischen  $\alpha$ -SMA Schnitte der YSM.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

Die Auswertung derselben Bilder mittels der Hybrid Cell Count Software (Keyence, Osaka/Japan) auf den Anteil der  $\alpha$ -SMA positiven Strukturen hin, ergab für den Vergleich zwischen der JB und JN Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied (JB:  $20,65 \pm 3,5\%$  vs. JN:  $16,48 \pm 2,87\%$ ,  $p < 0,05$ , s. Abb. 4.7). Für alle weiteren Gruppen konnte weder im Vergleich zwischen biologisierten und nativen Membranen, noch im paarweisen Vergleich zwischen den einzelnen biologisierten Membranen und der PRF-Membran ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (alle  $p > 0,05$ ), tendenziell zeigte sich in den Gruppen der biologisierten Membranen jedoch höhere Werte als in der PRF Gruppe.

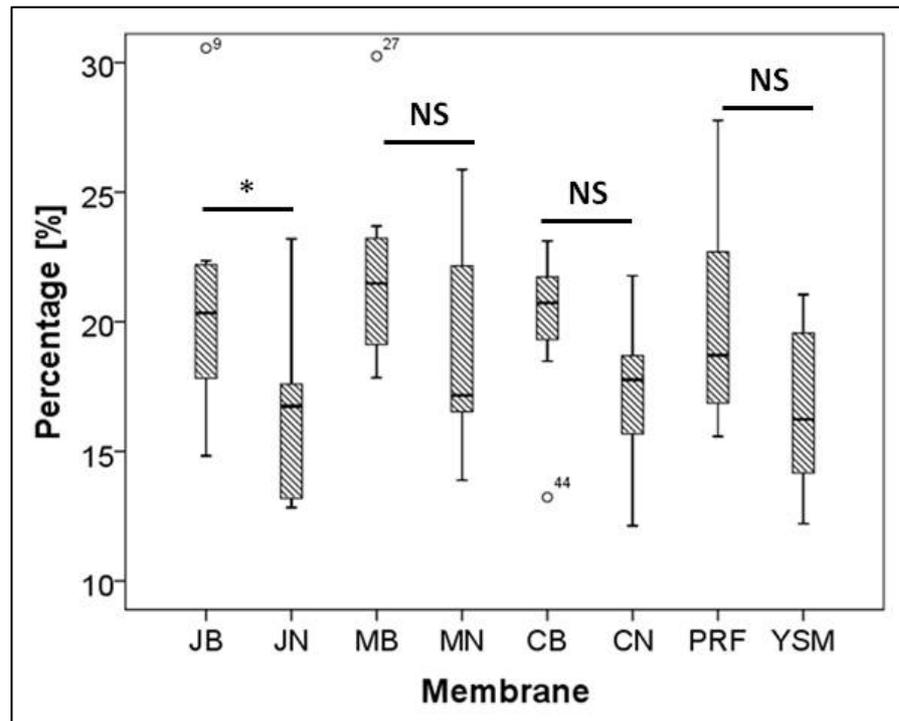


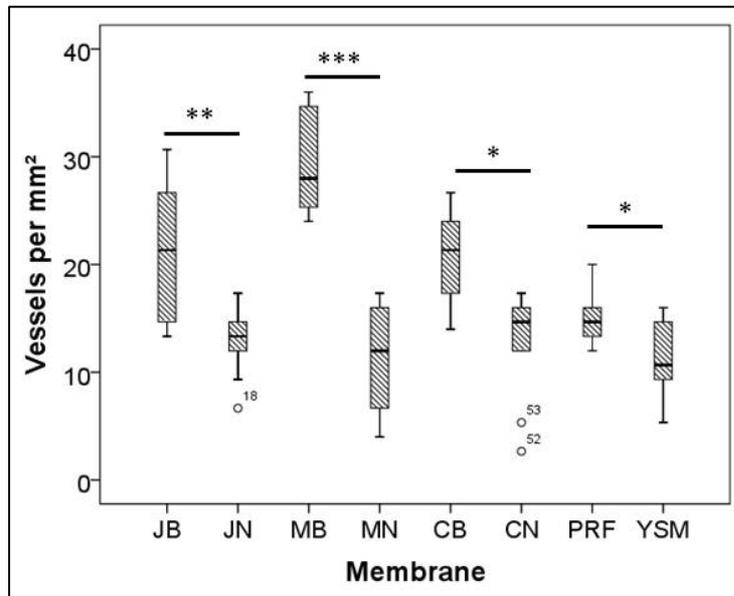
Abbildung 4.7: Anteil des a-SMA positiven Gewebes am histologischen Schnitt der YSM.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

### 4.3.3 CD 105 Färbung

Die immunhistochemische Analyse der CD105 positiven Gefäße pro  $\text{mm}^2$  zeigte eine statistisch signifikant erhöhte Gefäßzahl in allen biologisierten Gruppen (JB:  $20,89 \pm 5,27$  vs. JN:  $12,74 \pm 2,46$ ,  $p < 0,01$ , MB:  $29,48 \pm 3,74$  vs. MN:  $11,11 \pm 3,87$ ,  $p < 0,001$ , CB:  $20,37 \pm 3,41$  vs. CN:  $12,89 \pm 4,1$ ,  $p < 0,01$  und PRF:  $15,11 \pm 2,11$  vs. YSM:  $11,26 \pm 3,16$ ,  $p < 0,05$ , s. Abb.4.8). Im Detail gab es eine etwa 1,6-fache Erhöhung in der JB-Gruppe im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. In der MB-Gruppe war die Anzahl ca. 2,9-fach, in der CB-Gruppe ca. 1,8-fach und in der PRF-Gruppe ca. 1,4-fach erhöht.

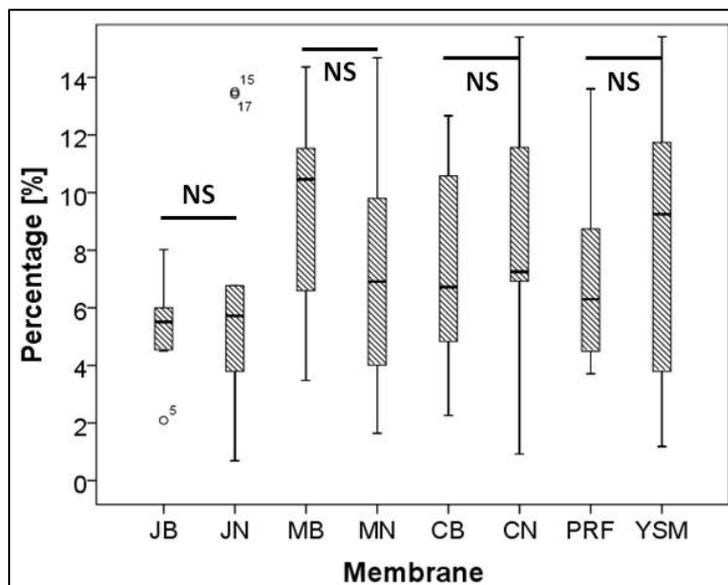
Des Weiteren zeigte sich, dass sich die meisten Gefäße in der MB-Gruppe bildeten. Hier kam es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung im Vergleich zu der JB-Gruppe (MB:  $29,48 \pm 3,74$  vs. JB:  $20,89 \pm 5,27$ ,  $p < 0,01$ ), zu der CB-Gruppe ( $20,37 \pm 3,41$ ,  $p < 0,001$ ) und der PRF-Gruppe ( $15,11 \pm 2,11$ ,  $p < 0,001$ ). In der JB- und CB-Gruppe kam es zu einer erhöhten Anzahl an Gefäßen im Vergleich zu der PRF-Gruppe (JB:  $20,89 \pm 5,27$  vs. PRF:  $15,11 \pm 2,11$ ,  $p < 0,05$ ; CB:  $20,37 \pm 3,41$  vs. PRF:  $15,11 \pm 2,11$ ,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 4.8:** Gefäße pro mm<sup>2</sup> nach Auswertung der immunhistochemischen CD105 Schnitte der YSM.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

Die quantitative Auswertung der Bilder mittels der Hybrid Cell Count Software (Keyence, Osaka/Japan) konnte für keines der Vergleichspaare (exemplarisch: JB:  $5,35 \pm 1,25$  vs. JN:  $6,45 \pm 3,42$ ,  $p > 0,05$ , s. Abb. 4.9) einen statistisch signifikanten Unterschied nachweisen. Ebenso wenig zeigte sich ein Unterschied für den Vergleich zwischen den biologisierten Gruppen und der PRF-Gruppe (alle  $p > 0,05$ ).



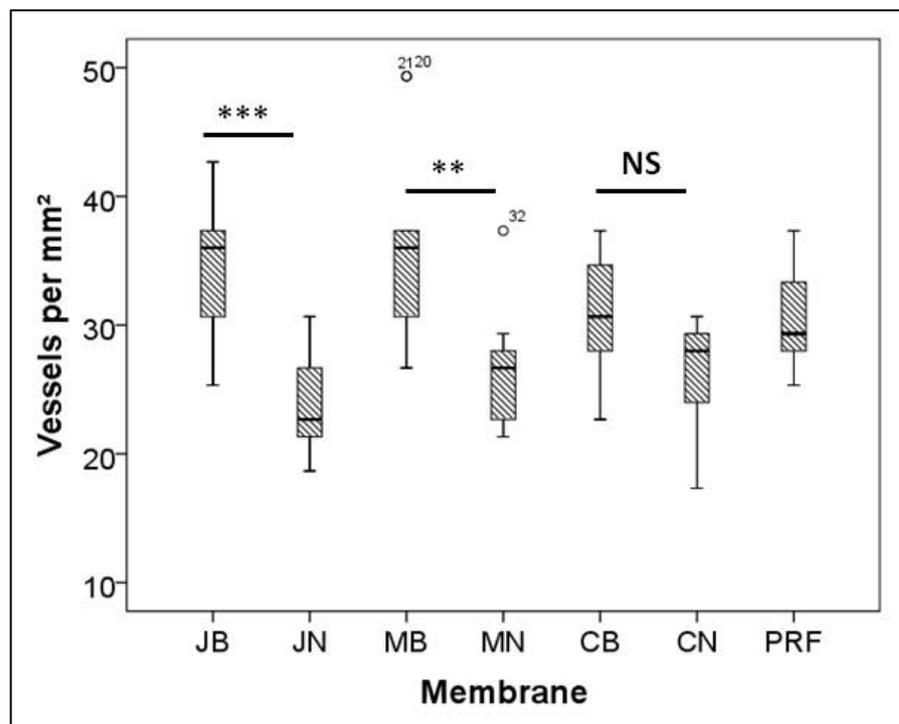
**Abbildung 4.9:** Anteil des CD105 positiven Gewebes am histologischen Schnitt der YSM.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

## 4.4 Ergebnisse des CAM Modells

### 4.4.1 Gefäße

Anschließend wurden Versuche mit der intravital Fluoreszenz Mikroskopie durchgeführt, um die vorangegangenen Ergebnisse zu überprüfen. In diesen Versuchen konnte eine Vermehrung der Gefäße in der CAM nach Applikation der biologisierten JB-Membran (JB:  $34,52 \pm 4,11$  vs. JN:  $24 \pm 3,16$ ,  $p < 0,001$ ), sowie der MB-Membran (MB:  $36,59 \pm 6,3$  vs. MN:  $26,37 \pm 3,86$ ,  $p < 0,01$ ) festgestellt werden (s. Abb. 4.10). Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen stellte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei Applikation der CB-Membran im Vergleich zu der CN-Membran dar (CB:  $30,22 \pm 3,94$  vs. CN:  $25,63 \pm 3,79$ ,  $p > 0,05$ ). Der Vergleich zwischen den biologisierten Gruppen und der PRF-Gruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Es wurden jedoch in den Gruppen JB und MB die meisten Gefäße gezählt.

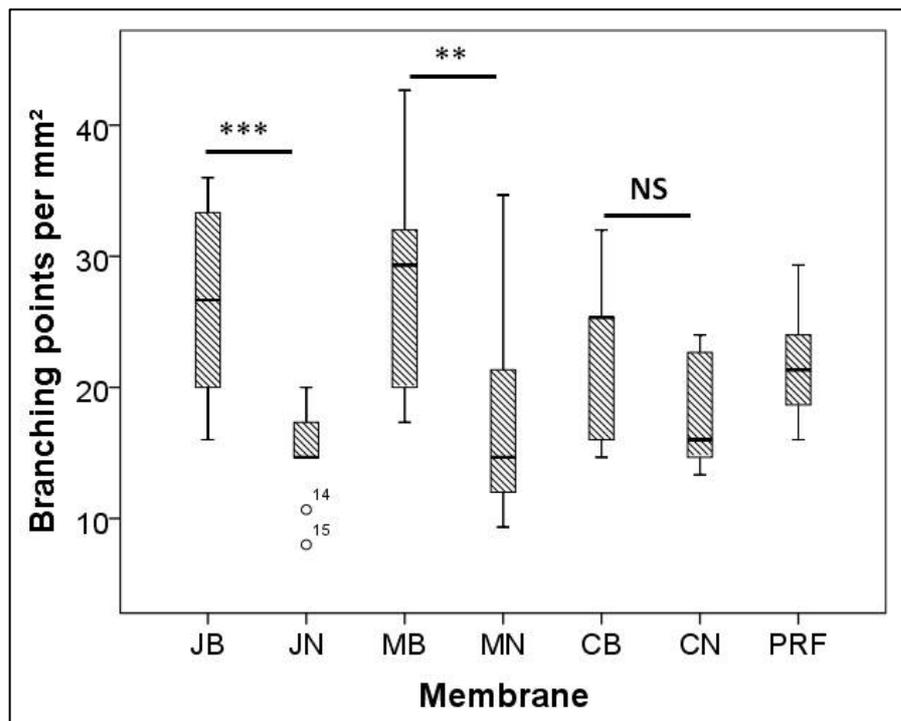


**Abbildung 4.10: Gefäße pro mm<sup>2</sup> in der mittels intravital Fluoreszenz Mikroskopie untersuchten CAM.**

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

#### 4.4.2 Verzweigungspunkte des Gefäßnetzes

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten in der JB Gruppe (JB:  $26,81 \pm 5,72$  vs. JN:  $14,81 \pm 2,79$ ,  $p < 0,001$ ) und in der MB Gruppe (MB:  $28,59 \pm 6,71$  vs. MN:  $17,48 \pm 6,12$ ,  $p < 0,01$ ; s. Abb.4.11). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen CB und CN (CB:  $22,96 \pm 4,75$  vs. CN:  $18,07 \pm 3,29$ ,  $p = 0,1$ ). Wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen biologisierten Gruppen im Vergleich zu der PRF-Gruppe festgestellt werden ( $p > 0,05$ ). Es wurden jedoch in den Gruppen JB und MB die meisten Gefäßverzweigungspunkte beobachtet.

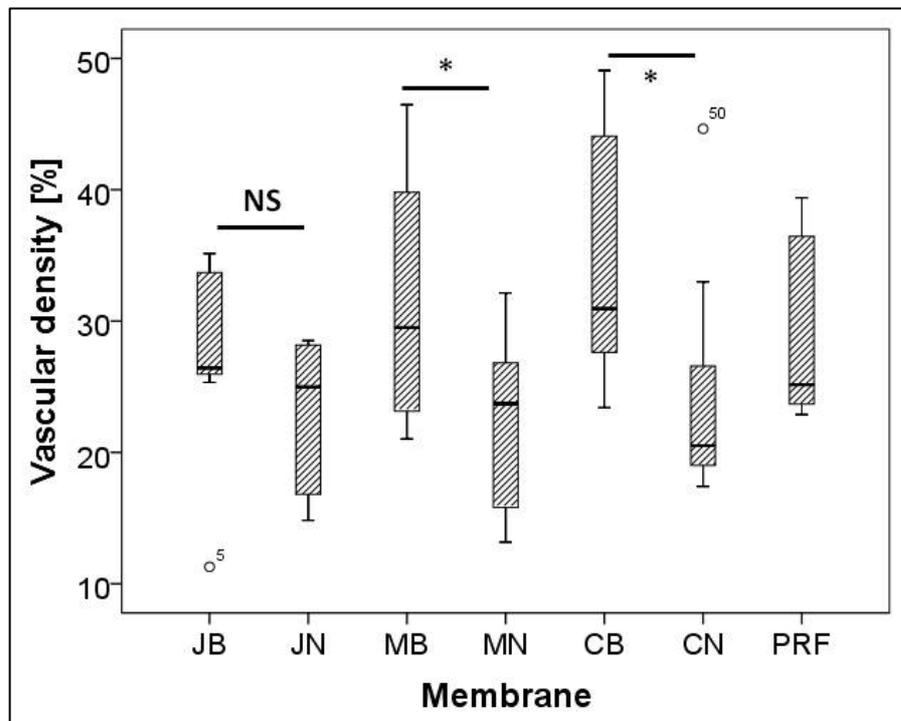


**Abbildung 4.11: Verzweigungspunkte des Gefäßnetzwerkes pro mm<sup>2</sup> nach Untersuchung der CAM mittels intravital-fluoreszenz Mikroskopie.**

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

### 4.4.3 Gefäßdichte

Bei Auswertung derselben Bilder mittels der FIJI Software und dem Vessel Analysis Plug-In zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Gefäßdichte von  $8,36 \pm 8,33$  Prozentpunkten in der CAM, welche mittels MB behandelt wurde (MB:  $31,29 \pm 5,65\%$  vs. MN:  $22,93 \pm 5,19\%$ ,  $p < 0,05$ , s. Abb. 4.12). Auch für die CB-Gruppe konnte eine statistisch signifikante Vermehrung der Gefäßdichte nachgewiesen werden (CB:  $38,83 \pm 8,1\%$  vs. CN:  $24,93 \pm 4,76\%$ ). Zwischen den Gruppen JB und JN konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden (JB:  $27,79 \pm 5,86\%$  vs. JN:  $22,44 \pm 4,17\%$ ,  $p < 0,2$ ). Der Vergleich zwischen den biologisierten Membranen und der PRF-Gruppe ergab keinen Unterschied (JB:  $27,79 \pm 5,86\%$ , MB:  $31,29 \pm 5,65\%$ , CB:  $38,83 \pm 8,1\%$  vs. PRF:  $29,58 \pm 4,92\%$ , alle  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.12: Gefäßdichte der CAM nach Untersuchung mittels intravital-fluoreszenz Mikroskopie.**

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant (51).

#### 4.4.4 Vascular length density

Für die Auswertung der Vascular length density wurde dasselbe Plug-In verwendet, das für die Auswertung der Gefäßdichte zum Einsatz kam. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (JB:  $1,77 \pm 0,64$  vs. JN:  $1,69 \pm 0,67$ , MB:  $2,29 \pm 0,74$  vs. MN:  $1,84 \pm 0,75$ , CB:  $1,99 \pm 0,82$  vs. CN:  $2,07 \pm 1,02$ , PRF:  $2,15 \pm 0,84$ ; s. Abb. 4.13). Des Weiteren konnten keine Unterschiede zwischen den biologisierten Gruppen und der PRF-Gruppe festgestellt werden (alle  $p > 0,05$ ).

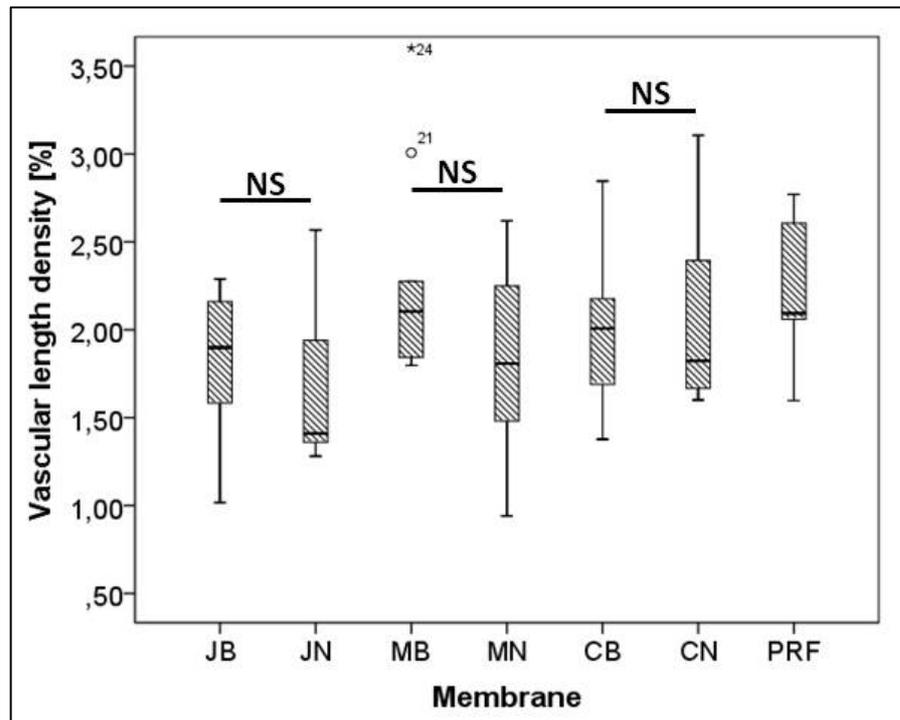


Abbildung 4.13: Vascular length density der CAM nach intravital-fluoreszenz Mikroskopie.

Die eingefügten Balken beschreiben die errechnete Signifikanz, wobei gilt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS = statistisch nicht signifikant.

## 5 Diskussion

Aufgrund der Häufigkeit von Defekten in der Kopf-Hals-Region besteht ein hoher Bedarf an regenerativen Verfahren für die rekonstruktive Chirurgie. Anhand der Literaturdiskussion ist zu erkennen, dass neue Verfahren und Lösungen essentiell für die Weiterentwicklung des Faches sind. Der Einsatz von Kollagenmembranen und PRF-Materialien ist, einzeln gesehen, seit vielen Jahren in der Forschung und klinischen Anwendung präsent. Besonders die Forschung zur Angiogenese ist von breitem Interesse innerhalb der Medizin und das Verständnis auf diesem Gebiet soll eine bessere Behandlung u.a. von chronischen Wunden, periimplantären und parodontalen Defekten ermöglichen. Die leichte Handhabung und die Vorteile in der klinischen Anwendung im Rahmen der GTR/GBR führten dazu, dass aktuell Kollagenmembranen in der regenerativen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie häufig Anwendung finden.

Die Verwendung von PRF-Materialien bietet eine kostengünstige Alternative zu Zelltherapien mit Stammzellen, welche ihrerseits vielversprechende Ansätze zeigen. Durch die schnelle Verfügbarkeit des PRF und die Tatsache, dass es sich um autologes Material handelt, stieg die Zahl der Interventionen mit PRF in den letzten Jahren stark an. PRF-Produkte stehen nicht nur zu Wachstumsfaktoren in Konkurrenz, sondern auch zu anderen Thrombozytenkonzentraten. Hier ist vor allem das PRP zu nennen, welches schon längere Zeit verwendet wird. Außerdem wird das PRF stetig weiterentwickelt und kann in unterschiedlichen Formen wie i-PRF, A-PRF und A-PRF+ hergestellt werden. Mit dem CGF (Concentrated growth factor) wurde eine neue Generation an Thrombozytenkonzentraten eingeführt, hierzu ist die Studienlage allerdings noch nicht sehr ausgeprägt. Da parodontale Defekte eine geringe regenerative Fähigkeit aufweisen, ist hier die bestmögliche Unterstützung für eine Heilung notwendig. Ebendort soll die vorliegende Studie anknüpfen.

In der folgenden Diskussion werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen in den Kontext der aktuellen Forschung zur Angiogenese im Bereich der Gewebsregeneration gesetzt. Es wird diskutiert, welche Unterschiede die Membranen in ihrem Potenzial und ihren Eigenschaften aufweisen und ob dies zu einem signifikanten Unterschied in den Untersuchungen führte.

## 5.1 VEGF und TGF- $\beta$ 1 als wichtige Wachstumsfaktoren der Angiogenese und Gewebsregeneration

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der sich aus dem Zusammenspiel verschiedener Zellen und Wachstumsfaktoren ergibt. Hierbei ist die Wichtigkeit von VEGF für die Angiogenese als zentraler Regulator hervorzuheben (279, 280).

Wie in der vorangegangenen Literaturdiskussion beschrieben, ist VEGF entscheidend für die Selektion der Tip-Zelle, welche neue Aussprossungen der Gefäße einleitet (119). Ein VEGF Konzentrations-Gradient gibt der Aussprossung die Richtung für ihr Wachstum vor. So können das Angebot an Sauerstoff in hypoxischem Gewebe erhöht und Gewebsdefekte wieder geschlossen werden (280). Es zeigt sich jedoch auch, dass VEGF nicht nur im Rahmen der embryonalen Entwicklung und der Regeneration von Gewebe eine Rolle spielt, sondern ebenfalls der wichtigste proangiogene Faktor bei der Tumorgenese ist. So kam es auch zur Forschung an Anti-VEGF Medikamenten zur Versorgung von Tumoren wie beispielsweise Bevacizumab (280).

TGF- $\beta$  hingegen wirkt meist angiostatisch, kann jedoch durch eine bisher noch nicht vollständig verstandene Aktivierung auch proangiogene werden. Des Weiteren ist TGF- $\beta$  Teil vieler Prozesse, die bei der Wundheilung wichtig sind. Hierzu gehört die inflammatorische Reaktion, die Proliferation von Fibroblasten, die Stimulation der Produktion von Kollagen und damit auch die Ausbildung einer neuen EZM (281, 282). Beide Wachstumsfaktoren werden durch Thrombozyten bei deren Aktivierung aus den  $\alpha$ -Granula ausgeschüttet. Dies geschieht physiologisch beim Prozess der Wundheilung (176). Thrombozytenkonzentrate machen sich diesen Umstand zunutze. PRP als Thrombozytenkonzentrat der ersten Generation und PRF als Thrombozytenkonzentrat der zweiten Generation stehen sich in der klinischen Nutzung gegenüber. Dementsprechend interessant sind komparative Studien zwischen den Thrombozytenkonzentraten.

Schär et al. verglichen in ihrer Studie von 2015 die Ausschüttung von TGF- $\beta$ , VEGF, IGF-1, PDGF-AB und IL-1 $\beta$  in L-PRF, L-PRP und einem natürlichen Blutkoagulum. Hierbei fanden die Forscher heraus, dass die Ausschüttung von VEGF aus dem natürlichen Blutkoagulum am höchsten ist, während die Ausschüttung von TGF- $\beta$  aus dem L-PRF am höchsten ist. Über die Zeit gesehen schüttete L-PRP in den ersten 8h mehr VEGF und TGF- $\beta$  aus als das L-PRF. Dies glich sich allerdings nach 24h an und kehrte sich mit zunehmendem Beobachtungszeitraum um. In den angeschlossenen Migrationsmodellen von MSCs und HUVEC (primary human umbilical vein endothelial

cells) zeigten sich für beide Zellreihen höhere Migrationsraten für L-PRF im Vergleich zu L-PRP (283). Masuki et al. vergleichen PRP, A-PRF und CGF. CGF wurde 2006 von Sacco et al. entwickelt (284). Die Herstellung ähnelt derjenigen des PRF, nur wird ein anderes Zentrifugationsprogramm verwendet. Hierbei werden während des Zentrifugationsvorganges die rpm alteriert, was zu einer stabileren Fibrinstruktur führen und gleichzeitig die Konzentration der verschiedenen Wachstumsfaktoren erhöhen soll (285-287). In der Studie von Masuki et al. zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Auch hier ist die Konzentration an VEGF und TGF- $\beta$  in der A-PRF-Gruppe höher als in der PRP-Gruppe, wohingegen die CGF-Gruppe vergleichbare Ergebnisse zu der A-PRF-Gruppe zeigt. Im angeschlossenen Modell zur Proliferation von periostalen Zellen, die aus humanem Alveolarknochen gewonnen wurden, zeigt sich ein heterogenes Ergebnis. Die Proliferation ist von der Konzentration der Thrombozytenkonzentrate abhängig. Bei geringer Konzentration scheint PRP zu einer höheren Proliferation zu führen, bei höheren Konzentrationen hingegen das PRF und CGF (284).

Auch die Wahl der PRF-Röhrchen, Zentrifugen und des Zentrifugationsprotokolls haben einen Einfluss auf das produzierte PRF-Material. Dies arbeiten Dohan Ehrenfest et al. in ihrer Arbeit von 2017 heraus (288). Zunächst werden vier Zentrifugen von verschiedenen Herstellern gegenübergestellt und anhand der Intensität der Vibrationen während des Zentrifugationsprozesses. Hierbei fiel auf, dass es große Unterschiede in der Intensität der Vibrationen gibt, exemplarisch sollen die Intra-Spin und die A-PRF-Zentrifuge herausgegriffen werden. In einem nächsten Schritt wurden die hergestellten PRF-Koagel gemessen und es zeigte sich, dass die Zentrifugen, in welchen eine höhere Intensität an Vibrationen herrscht (A-PRF 12), auch ein kleineres PRF-Koagel erzeugen. In der Rasterelektronenmikroskopie zeigte sich ein dichteres Fibrinnetzwerk bei dem L-PRF (Intra-Spin Zentrifuge) als bei dem A-PRF. Und auch die Wachstumsfaktorenexpression war in dem L-PRF über 7 Tage hinweg höher (288). Diese Ergebnisse implizieren, dass eine hohe Intensität an Vibrationen während des Zentrifugationsprozesses eine negative Auswirkung auf die Qualität und damit auch das angiogene Potenzial des PRF-Produktes hat.

In einer Studie von 2012 untersuchten Kobayashi et al. PRF in Hinsicht auf seine Herstellung. Es wurden zwei Gruppen verglichen. Eine der Gruppe wurde mit einer Gaze zur PRF-Membran komprimiert, die andere Gruppe wurde mit einem speziellen Kompressionswerkzeug behandelt. Hierbei stellten sie fest, dass in der mit der Gaze behandelten Gruppe ein niedrigeres Gewicht herrscht, weniger Zellen vorhanden sind und auch die Konzentration einiger Wachstumsfaktoren wie VEGF-D, PDGF-AB,

PDGF-BB und IGF-II vermindert ist. Gleichzeitig stellten sie im CAM-Modell eine verminderte Angiogenese in dieser Gruppe fest, was die vorherigen Ergebnisse bestätigt. Dies ließ die Forschergruppe zu der Annahme kommen, dass die Wachstumsfaktoren zum Teil im Plasma sind, welches bei Kompression durch die Gaze beinahe vollständig aufgesogen wird, wohingegen nur ein kleiner Teil in dem Fibrinnetz zu verbleiben scheint (289).

Dies deckt sich mit den Aussagen der Übersichtsarbeit von Clark. Hier kommt er zu der Annahme, dass Fibrin Wachstumsfaktoren direkt oder indirekt binden kann. Zu den direkt gebundenen Faktoren gehören Thrombin, PDGF und TGF- $\beta$ . Da Fibrin auch Heparin bindet, kommt es indirekt zur Adhäsion von heparinbindenden Wachstumsfaktoren. Zu diesen gehören VEGF, PDGF und bFGF (290). Dies könnte eine Erklärung für die Ergebnisse der Studie von Kobayashi liefern. Die PRF verfügt über eine stärker vernetzte Fibrinstruktur als das PRP (213). Dies könnte zu einer höheren Retention von Wachstumsfaktoren in dem Fibrinnetz der PRF führen und erklären, warum die Konzentrationen von ausgeschütteten Wachstumsfaktoren wie VEGF und TGF- $\beta$  bei in vitro Versuchen mit der PRF höher ausfallen als diejenigen der PRP. Außerdem kann es auch dafür verantwortlich sein, dass die Ausschüttung in den ersten Stunden im PRP höher ist und in der PRF erst sukzessive ausgeschüttet wird. Dohan Ehrenfest et al weisen in ihrer Arbeit von 2009 nach, dass die Wachstumsfaktoren in dem stark vernetzten Fibrinnetz zunächst verbleiben und langsam über 7 Tage an die Umgebung abgegeben werden. Ihre Ergebnisse ließen sie zu dem Schluss kommen, dass die Leukozyten und Thrombozyten, die ebenfalls in dem Fibrinnetz verbleiben, auch über die gesamte Zeit weiterhin Wachstumsfaktoren ausschütten (291).

Die Ergebnisse der in vitro Versuche konnten durch in vivo Studien bestätigt werden. Hierfür wurden sowohl Tierversuche als auch klinische Studien durchgeführt. Kim et al. untersuchten drei Thrombozytenkonzentrate im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Knochengewebsregeneration. Hierzu wurden operative Defekte in Schädel von Hasen zugefügt und anschließend erfolgte eine Behandlung mittels Thrombozytenkonzentrat. Hierbei stellten sich keine Unterschiede zwischen den Interventions-Gruppen heraus, untersucht wurden das Knochenvolumen und die Knochendichte. Nach 6 Wochen waren die Thrombozytengruppen dem physiologischen Heilungsprozess durchgehend überlegen, nach 12 Wochen glichen sich die Ergebnisse teilweise an (292). Eine Fall-Serie mit PRF als Füllungsmaterial im Rahmen eines Sinuslifts und gleichzeitiges Setzen eines Zahnimplantats bei Menschen zeigt ebenfalls nach sechs Monaten eine gute Knochenregeneration. Sowohl die Röntgenaufnahmen als auch die Biopsien zeigen eine

voll ausgebildete und intakte Knochenstruktur. Aufgrund der Natur der Fall-Serie gab es keine Vergleichsgruppe (293). Eine ähnliche Fall-Studie mit einer längeren Beobachtungsdauer von bis zu sechs Jahren konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Knochenhöhe nachweisen. So waren die Knochen bei Implantation im Mittel 1-3 mm dick und nach Beendigung der Beobachtungsdauer konnte ein Knochenzuwachs von 8,5-12 mm verzeichnet werden. Gleichzeitig heilten alle Implantate erfolgreich ein und es kam zu keiner Explantation innerhalb der sechs Jahre. Ein interessanter Nebeneffekt der Fall-Serie war, dass keine zusätzliche Kollagenmembran oder xenogene Knochenmaterialien verwendet wurden, um dem Sinus als Schutz vor einwachsendem Bindegewebe zu dienen. In den Röntgenkontrollen zeigte sich trotzdem ein intaktes Knochengewebe ohne von außen einwachsenden Bindegewebes (294).

Eine weitere Indikation zur Knochengewebsregeneration ist die Extraktion von Zähnen. Hier knüpft die Studie von Varghese et al. von 2017 an. Es wurden 30 Patienten mit beidseitiger Extraktion des dritten Molaren behandelt. Dabei wurde eine Seite nach Extraktion primär verschlossen und die andere mit PRF als Füllmaterial behandelt. Es zeigte sich in den nachfolgenden Untersuchungen mittels Röntgenaufnahmen, dass die PRF-Gruppe eine höhere Knochendichte aufwies. Gleichzeitig kam es auch bei dem Heilungsindex des Weichgewebes zu besseren Ergebnissen der PRF-Gruppe (295). Dies zeigt das hohe Potenzial des PRF zur Knochengewebsregeneration und bestätigt gleichzeitig die *in vitro* Ergebnisse, welche die Proliferation von Osteoblasten beschreiben.

Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von den VEGF und TGF- $\beta$  Konzentrationen in den verschiedenen Studien ist nur bedingt gegeben, da es interindividuelle Unterschiede gibt. Hierbei ist die Studienlage kontrovers, welche Faktoren die Konzentrationsunterschiede bedingen. Weibrich et al. stellen in ihrer Studie von 2002 fest, dass keine Korrelation zwischen den Thrombozyten und der späteren Konzentration an Wachstumsfaktoren besteht, was mit hohen interindividuellen Unterschieden der Wachstumsfaktorkonzentrationen begründet wurde. Gleichzeitig konnte man keine Korrelation zwischen Alter und Geschlecht für die spätere Konzentration im PRP zeigen (296). 2014 wurde eine vergleichbare Studie, ebenfalls mit PRP, durchgeführt. Hier fanden Evanson et al. jedoch heraus, dass Frauen für die gemessenen Wachstumsfaktoren (EGF (epidermal growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), IGF-1, PDGF-AB, PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1 und VEGF) höhere Werte aufweisen. Die Ergebnisse waren mit Ausnahme von PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1 und VEGF signifikant. Des

Weiteren arbeiteten sie eine Korrelation zwischen Alter und der Konzentration von Wachstumsfaktoren heraus. So wiesen alle Wachstumsfaktoren bis auf HGF und VEGF eine signifikant höhere Konzentration in der Gruppe der Patienten auf, die 25 Jahre und jünger waren (297). Eine Schwäche beider Studien ist die ungleichmäßig verteilte Stichprobe bezüglich des Geschlechts der Probanden.

Ein weiterer häufig unterschätzter Faktor für die Ausbeute an Thrombozytenkonzentrat ist die Zeit zwischen Blutentnahme und Start der Zentrifugation. Miron et al. beschreiben in ihrer Studie von 2018 den Zusammenhang von Alter, Geschlecht und Verzögerung bis zur Zentrifugation mit der Größe der PRF-Membranen. Sie zeigen eine signifikant verringerte Größe der PRF-Membranen ab einer Verzögerung von 90s und eine weitere Verminderung ab 120s. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass Frauen signifikant größere PRF-Membranen bilden als Männer, dieser Effekt lässt jedoch nach 60s Verzögerungszeit nach. Für das Alter konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, jedoch waren die PRF-Membranen der älteren Versuchsgruppen tendenziell größer (298).

Trotz der hohen Unterschiede der Proben für die Konzentration der Wachstumsfaktoren, soll in den folgenden Kapiteln ein Vergleich zu anderen Studien erfolgen (s. Abschnitte 4.1.1 und 4.1.2).

### **5.1.1 Diskussion der Ergebnisse: VEGF-Konzentration**

Die in der vorliegenden Arbeit mittels ELISA gemessene VEGF-Konzentration bezieht sich auf die VEGF Isoformen VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>165b</sub> (299). Dies sind die häufigsten Isoformen von VEGF-A und damit von entscheidender Bedeutung für die Angiogenese (300).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie zeigen, dass die Freisetzung von VEGF aus den biologisierten Kollagenmembranen über die Zeit nachlässt. Die höchsten Konzentrationen wurden in jeder Gruppe jeweils nach 24h gemessen. Danach wurde die Freisetzung in den biologisierten Gruppen und der PRF-Gruppe geringer. Im Vergleich der Gruppen fiel auf, dass die VEGF Freisetzung aus der biologisierten und nicht kreuzvernetzten JB-Membran über alle Zeitpunkte hinweg höher war als in den anderen Gruppen. Selbst in der PRF-Gruppe zeigten sich niedrigere Freisetzungsniveaus (s. Abschnitt 4.1.1). Dies ist verwunderlich, da man davon ausgeht, dass die Wachstumsfaktoren aus der biologisierenden Komponente, also der PRF-Membran, kommen und die Kollagenmembranen nativ keine Wachstumsfaktoren ausschütten. Gleichzeitig waren die Konzentrationen der VEGF-Freisetzung in den Gruppen der

nativen Kollagenmembranen konstant nachweisbar. Dies könnte auf einer Ungenauigkeit des angewendeten ELISA-Sets beruhen. Die erhöhte Konzentration von VEGF der JB-Gruppe könnte damit zusammenhängen, dass die benutzten PRF-Membranen in ihrer Größe variierten und geteilt wurden, um an die eingesetzten Kollagenmembranen angepasst zu werden. Gleichzeitig ist es nicht möglich, eine gleichmäßige Verteilung von Wachstumsfaktoren innerhalb einer PRF-Membran zu garantieren. Auch dies kann zu den Abweichungen zwischen den Gruppen führen.

Da in der aktuellen Literatur nach Kenntnis des Autors keine Arbeiten existieren, die eine Biologisierung von Kollagenmembranen mittels A-PRF+ vornehmen und anschließend die Konzentration von VEGF messen, ist ein Vergleich mit anderen Studien nur bedingt möglich. Die Konzentration der A-PRF+ lag in dieser Arbeit nach 24h bei 95,51 pg/ml, nach 96h bei 27,6 pg/ml und nach 168h bei 21,13 pg/ml (s. Abb. 4.1). In der Arbeit von Masuki et al. werden deutlich höhere Konzentrationen von etwa 1000 pg/ml für VEGF angegeben. Jedoch nennt die Forschungsgruppe nicht die gemessene VEGF-Isoform und auch nicht den Zeitpunkt der Probenentnahme (284). Schär et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine VEGF-Konzentration von 852 pg/ml in den hergestellten L-PRF Membranen über 28 Tage gemessen. Jedoch stieg hier die VEGF-Konzentration kontinuierlich bis zum 7. Tag an (283). Die Studie von Ratajczak et al. aus dem Jahr 2018 misst ebenfalls höhere VEGF-Level, die sich kontinuierlich vom 2. bis zum 6. Tag steigern. Nach 4 Tagen ist die hier gemessene VEGF-Konzentration bei 1322 pg/ml (301), zum Vergleich konnte in der vorliegenden Arbeit hier nur eine Konzentration von 27,60 pg/ml in der PRF-Gruppe und 63,83 pg/ml in der JB-Gruppe gemessen werden (s. Tabelle 7.4). Bei Ratajczak kam jedoch ein anderes Zentrifugationsprotokoll mit 2700 rpm zum Einsatz und es wurde unter Zugabe von Antibiotika und anschließend Zentrifugation ein anderes Medium zur Messung der Wachstumsfaktorenfreisetzung benutzt. Liang et al. beschreiben in ihrer Studie, bei der die L-PRF mit einem vergleichbaren Protokoll zu der Arbeit von Ratajczak hergestellt wurde, deutlich geringere VEGF-Konzentrationen von unter 100 pg/ml nach dem ersten Tag und etwa 350 pg/ml nach sieben Tagen. Jedoch ist auch in dieser Arbeit ein Gipfel der Konzentration nach einer Woche beobachtbar. Dies gilt nicht nur für VEGF sondern auch für die Konzentrationen von bFGF, EGF, PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, IL-4, IL-6 und MMP-1 (302). Die ansteigenden VEGF-Level konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Dies kann mit der Teilung der PRF-Membranen zusammenhängen oder mit dem ausgewählten Medium. Es könnte ebenfalls zu einer Wechselwirkung zwischen dem Kollagen der verwendeten Membranen und dem VEGF aus der A-PRF

gekommen sein. Da die Gruppen der biologisierten Kollagenmembranen jedoch keine niedrigeren VEGF-Konzentrationen zeigen als die alleinige PRF-Gruppe, scheint dies eher unwahrscheinlich als Begründung für die niedrigeren Level und die veränderte Freisetzungsdynamik.

Wang et al. vergleichen in ihrer Studie von 2019 eine L-PRF Membran mit einer lyophilisierten PRF-Membran. Die Lyophilisierung soll zusätzlich zu der leichten Lagerung eine bessere Stabilität aufweisen. In dieser Arbeit wurden ebenfalls fragmentierte PRF-Membranen untersucht und nach einer 14-tägigen Inkubation wurden die freigesetzten Wachstumsfaktoren gemessen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der verwendeten L-PRF und der lyophilisierten PRF gemessen. Hierbei lag die detektierte VEGF-Konzentration bei 95,3 pg/ml (303), was wiederum eine geringere Konzentration als in der vorliegenden Studie bedeutet (s. Abb. 4.1).

Taniguchi et al. beziffern die gesamte Konzentration der von ihnen erzeugten PRP-Membranen bei männlichen Probanden im Mittel auf 240 pg/ml und bei Frauen deutlich geringer auf 140 pg/ml (304). Dieses Ergebnis ist dem der vorliegenden Studie recht ähnlich, da hierbei nicht zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde, sondern die gesamte Konzentration. Die Ergebnisse von Taniguchi et al. stehen jedoch in einem Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeiten von Weibrich und Evanson, welche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachten konnten, bzw. leicht erhöhte Konzentrationen für die PRP-Membranen von Frauen sahen (296, 297).

In der Arbeit von Kleinheinz et al., die 2010 durchgeführt wurde, wird die Wechselwirkung von VEGF<sub>165</sub> an Kollagen Typ I untersucht, aus welchem auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kollagenmembranen bestehen. Hierbei stellen die Forscher bei Strukturanalysen mittels Raster- und Transmissionselektronenmikroskop fest, dass sich ein Komplex aus den beiden Molekülen bildet. Sie konnten eine recht stabile VEGF-Freisetzung für die ersten 50h nachweisen, wobei es zunächst eine frühe Ausschüttung gab und anschließend das VEGF langsamer durch den Abbau des Komplexes freigesetzt wurde. Dieser Komplex scheint sich außerdem positiv auf das Überleben des VEGF auszuwirken, da die ermittelte Halbwertszeit für freies VEGF bei 90 min. lag, die Freisetzung jedoch deutlich länger auf hohem Niveau zu beobachten war. Des Weiteren konnten Hinweise für einen Sättigungsprozess beobachtet werden, da höhere VEGF-Dosen nicht zu einer höheren Freisetzung führten (305).

Eine Bindung von VEGF an Fibrinogen und Fibrin wurde durch Sahni et al. nachgewiesen. Die Forschergruppe um Sahni zeigt, dass VEGF eine starke Bindung eingeht, wobei Fibrin bevorzugt wird. Sie diskutieren, dass dies zusammen mit der

Bindung von FGF-2 ein Faktor für die Angiogenese an der Wunde sein kann. Außerdem weisen sie nach, dass VEGF durch die Bindung nicht seine Funktionalität einbüßt (306). In der Studie von Martino et al. wurde VEGF nach seinen Isoformen aufgeschlüsselt in seiner Bindung an die Heparin-bindende Domäne von Fibrin und Fibrinogen untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass vor allem VEGF-B eine starke Bindung eingeht. VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>121</sub> scheinen hingegen nicht stark gebunden zu werden. In einem angeschlossenen Versuch, in dem die Freisetzung von VEGF aus einer Fibrinmatrix detektiert wurde, zeigte sich, dass nach einem Tag bereits mehr als 85% entwichen (307). In der vorliegenden Arbeit konnte nicht beobachtet werden, dass die biologisierten Kollagenmembranen eine verminderte VEGF-Freisetzung im Vergleich zu der alleinigen PRF zeigen. Dies spricht gegen einen übermäßigen Verlust von VEGF durch eine Komplexbildung mit dem Kollagen der Membranen. Gleichzeitig konnte eine langanhaltende Freisetzung gezeigt werden, was durch Komplexbildung von VEGF mit dem Kollagen oder Fibrin zusammenhängen könnte.

Die schnelle Freisetzung von VEGF in der Studie von Martino et al. unterstützt eher die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den über die Zeit sinkenden VEGF-Konzentrationen im Vergleich zu den Studien von Schär, Ratajczak und Liang.

Es ergeben sich weitere interessante Fragen, die es durch nachfolgende Studien noch zu klären gilt. Wie gestaltet sich die Verteilung des VEGF in den biologisierten Membranen? Kommt es zu einer Bindung von VEGF am Kollagen der Membranen oder wird es durch seine Bindungsfähigkeit zu Fibrin in der PRF-Membran gehalten?

### **5.1.2 Diskussion der Ergebnisse: TGF-Konzentration**

Die gemessene TGF-Konzentration bezieht sich in der vorliegenden Arbeit auf TGF- $\beta$ 1 (308). TGF- $\beta$ 1 ist, wie schon in der Literaturdiskussion beschrieben, für die Hämatopoese und Differenzierung von Endothelzellen verantwortlich und deshalb wichtig für die Angiogenese.

In der vorliegenden Studie zeigte sich in der ANOVA-Analyse, dass die Zeit als Faktor einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung des Wachstumsfaktors hat. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Membranen konnte nicht nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.1.1.). In den Post-hoc Tests ergaben sich jedoch unterschiedliche Freisetzungsdynamiken für die verschiedenen biologisierten Membranen und die PRF. So wurden für die MB- und PRF-Gruppen signifikant verringerte TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen nach 96h (MB) bzw. 128h (MB und PRF) gemessen. Die anderen beiden biologisierten Membranen zeigen zwar ebenfalls eine

Verringerung des TGF- $\beta$ 1, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Die höchsten Werte für die Freisetzung nach 24h wurden in der CB-Gruppe (8001,84 pg/ml) und der PRF-Gruppe (8010,73 pg/ml) gemessen (vgl. Abb. 4.2).

In der Literatur konnten nach Recherche keine Arbeiten gefunden werden, die eine TGF- $\beta$ 1-Freisetzung aus mittels PRF biologisierten Kollagenmembranen messen. Deshalb erfolgt hier auch vor allem ein Vergleich mit Studien, welche die TGF-Konzentration in PRF-Membranen nachweisen. Masuki et al. geben deutlich höhere Level für TGF- $\beta$  in der A-PRF an, so liegt hier die Konzentration bei 400 ng/ml, einem Vielfachen der gemessenen 8 ng/ml in der vorliegenden Studie (284). Die Arbeit von Schär et al. gibt hingegen für die L-PRF nur eine TGF- $\beta$ 1-Konzentration von 37,8 ng/ml an. Hier zeigte sich eine Freisetzungsdynamik, bei der ein Maximum nach 7 Tagen erreicht wird (283). Wang et al. hingegen messen in ihrer Studie in dem erzeugten L-PRF TGF- $\beta$ -Werte von 210,5 pg/ml (303). Die vorliegenden Ergebnisse der verschiedenen Studien zeigen eine hohe Variabilität. Dies stützt die These von Weibrich et al., dass die interindividuellen Unterschiede der vorhandenen Wachstumsfaktoren in Thrombozytenkonzentraten extrem ausgeprägt sind (296). Zusätzlich erschwert die Verwendung verschiedener PRF-Varianten den Vergleich zu anderen Studien.

Da in der vorliegenden Studie im Vergleich zu anderen eine verringerte Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 über die Zeit beobachtet wurde, müssen die konträren Ergebnisse diskutiert werden. Ein eventueller Zusammenhang mit der Kopplung an eine Kollagenmembran könnte die Ursache sein. 2006 untersuchten Caballé-Serrano et al. die Wechselwirkungen von BCM, welches TGF- $\beta$ 1 enthält, und einer nicht kreuzvernetzten Kollagenmembran porciner Herkunft. Hierbei stellten sie fest, dass die Kollagenmembran das TGF- $\beta$  absorbiert und dies auch nach längerer Zeit weiterhin abgeben kann. Die Tatsache, dass die Genexpression in den untersuchten Fibroblasten unabhängig von der Oberfläche der Membran und von UV-Einstrahlung war, lässt die Forschungsgruppe von einer stabilen Bindung ausgehen (309). Stähli et al. untersuchen in einem ähnlichen Versuchsaufbau die Wechselwirkungen von TGF- $\beta$  sowie EMD und verschiedenen Kollagenmembranen. Die verwendeten Kollagenmembranen gleichen denjenigen der vorliegenden Arbeit. Hierbei stellen sie fest, dass sowohl EMD als auch TGF- $\beta$  eine Bindung mit den Kollagenmembranen eingeht. Der Nachweis von TGF- $\beta$  bzw. einer TGF- $\beta$ -ähnlichen Aktivität des EMD geschah über den Nachweis der Genexpression von IL11, NOX4 und PRG4 in Fibroblasten. Die Tatsache, dass es nach Waschungen der Membranen und ohne Zugabe von Kollagenasen auch nach fünf Tagen

noch zu einer Stimulation der Genexpression kam, ließ die Forschergruppe von einer starken Bindung ausgehen. Die Natur der Bindung bleibt jedoch weiterhin unklar (250). Martino et al. untersuchten 2003 die Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren an die Heparin-bindende Domäne von Fibrin und Fibrinogen. Hierbei zeigten sie, dass TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 jeweils eine starke Bindung zu Fibrin(ogen) ausbilden. In anschließenden Versuchen wurde die Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus einer Fibrinmatrix gemessen, wobei TGF- $\beta$  ein verzögertes Freisetzungsverhalten im Vergleich zu weniger stark bindenden Wachstumsfaktoren wie etwas VEGF zeigte (307).

Di Summa et al. untersuchen deshalb die Auswirkungen der Kopplung von PRF-Membranen mit Kollagenmembranen und Titanoberflächen. Hierbei stellen sie fest, dass das TGF- $\beta$  durch die beiden Materialien absorbiert wird. Dies gelang über den Nachweis der durch TGF- $\beta$  induzierten Genexpression von IL11, NOX4 und PRG4. Die untersuchten Kollagenmembranen wurden 1h mit TGF- $\beta$  inkubiert und anschließend gewaschen. Das galt dem Forscherteam als Beweis dafür, dass TGF- $\beta$  Bindungen mit dem Kollagen der Membran eingeht und trotzdem weiterhin aktiv und in der Lage ist, Gene zu stimulieren (310).

Die Frage, wie die Bindung zwischen TGF- $\beta$  und Kollagen respektive Fibrin charakterisiert ist und die Stärke der jeweiligen Bindung, könnte zu einer Beantwortung für die veränderte Freisetzungsdynamik im Vergleich zu anderen Studien führen. Nichtsdestotrotz war auch die Freisetzung aus der PRF-Gruppe geringer und schneller als bei vergleichbaren Studien, wie auch schon bei den Versuchen zu der Freisetzung von VEGF beschrieben. Durch die verschiedenen verwendeten PRF-Typen ist nur eine bedingte Vergleichbarkeit gegeben.

Da jedoch in der vorliegenden Studie die höchsten Wachstumsfaktorkonzentrationen innerhalb der ersten 24h freigesetzt wurden, wurde bei den anschließenden Angiogenesemodellen ein Beobachtungszeitraum von ebenjenen 24h gewählt.

## **5.2 YSM zur Messung der Angiogenese**

Angiogenesemodelle nehmen eine wichtige Rolle in der Erforschung der Angiogenese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ein. Gerade in der Tumorforschung ist die Angiogenese ein zentraler Dreh- und Angelpunkt, um neue Therapien zu entwickeln (108, 109).

Angiogenesemodelle haben verschiedene Limitierungen. Die in vitro Modelle können das komplexe Zusammenspiel aus EZM, verschiedenen in die Angiogenese involvierten Zelltypen, hämodynamischen und metabolischen Faktoren nicht ausreichend abbilden.

Sie sind vor allem dafür geeignet, erste Annäherungen an die Vorgänge zu generieren. Außerdem sind *in vitro* Versuche gut dafür geeignet, hohe Fallzahlen zu generieren. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse müssen jedoch *in vivo* bestätigt werden. *In vivo* Modelle haben mit eigenen Limitationen zu kämpfen. Hier sind vor allem ethische Probleme durch das Wohl der Tiere, niedrige Fallzahlen bei hohen Kosten und andere Voraussetzungen als im menschlichen Organismus zu nennen. Dazu gehören in Modellen mit kleinen Tieren etwa veränderte hämodynamische Gegebenheiten (108).

Das YSM-Modell gehört zu den *in vivo* Angiogenesemodellen. Deutlich häufiger verwendet wird das CAM-Modell, welches derselben Modellgruppe angehört. Nichtsdestotrotz ist das YSM Modell in der experimentellen Forschung bereits seit Jahren Bestandteil der Angiogeneseforschung. Zuerst beschrieben Rosenbruch und Holst 1990 in ihrer Arbeit die Eignung des YSM-Modells für toxikologische Studien. Sie postulierten als optimalen Applikationszeitpunkt den 4. Tag nach Beginn der Inkubation und maßen die Toxizität semiquantitativ durch hämorrhagische Ereignisse (Größe und Anzahl) auf der YSM. Als wichtigen Aspekt, welcher das YSM-Modell über das CAM-Modell stellt, nannten sie das noch nicht ausgebildete Nervensystem in den ersten Tagen der Embryonalzeit (252, 311). Im Vergleich hierzu ist nach 10-14 Tagen, was der Beobachtungszeit für das CAM-Modell entspricht, bereits das Nervensystem weiter fortgeschritten und man kann Reflexe nachweisen sowie sensible Empfindungen des Embryos (312).

Heutzutage steht die Benutzung von Tiermodellen zur Forschung vor großen Herausforderungen und steht in der Gesellschaft häufig in der Kritik. Dieser großen Verantwortung sind sich Forscher bewusst und trotz der Unerlässlichkeit von Tierversuchen besteht Übereinkommen darüber, dass Tierversuche auf ein Minimum reduziert werden müssen. So soll vor allem das Wohl der Tiere in den Mittelpunkt gestellt werden. Deshalb sollen sich Tierversuche an dem 3R-Prinzip (reduce, refine, replace) orientieren, also das Vermeiden, Verringern und Verbessern der Versuche (313). Dies führte zu der Beliebtheit u.a. von Hühnerembryonen und einem weitgehenden Verzicht von größeren Tieren in der Angiogeneseforschung. So gesehen, kann man das YSM-Modell im Rahmen des 3R-Prinzips als weitere Verbesserung des CAM-Modells sehen.

Die Studie von Jin et al. aus dem Jahr 2013 untersucht die Vaskulogenese und Angiogenese in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. Hierzu wurden sowohl das YSM- als auch das CAM-Modell verwendet. Es wurde jeweils ein Silikonring auf die Membran gegeben, in welchem die Glucose in verschiedenen Konzentrationen appliziert

wurde. Es zeigte sich, dass die Glucose mit zunehmender Konzentration eine antiangiogene Wirkung entfaltet. Dies wurde zum einen durch eine verminderte Gefäßdichte der YSM und zum anderen durch eine verringerte Ausdehnung des Gefäßplexus ermittelt. Die angeschlossenen Versuche mit dem CAM-Modell bestätigten die Ergebnisse (314). Eine Forschergruppe um Wang und Ma benutzte das YSM-Modell 2015 zur Untersuchung des Einflusses von Ethanol und Koffein auf die Angiogenese (315, 316). In der Studie zum Einfluss von Koffein auf die Angiogenese werden die YSM und CAM mit der humanen Placenta verglichen, wobei morphologisch einige Ähnlichkeiten beschrieben werden. Des Weiteren kam es zu einer Bestimmung der Expression von Genen, die für die Angiogenese wichtig sind. Hierbei stellen die Forscher ebenfalls eine Ähnlichkeit in der Expression zwischen YSM und CAM fest und können zentrale bioaktive Faktoren für die Angiogenese wie VEGF, VEGFR2, IGF2, HIF-2 nachweisen. Die antiangiogene Wirkung des Koffeins kann sowohl im YSM- als auch im CAM-Modell nachgewiesen werden, sie zeigen darüber hinaus eine verminderte Expression proangiogener Faktoren wie VEGF, was sie als Ursache der verminderten Angiogenese angeben (315). In einer zweiten Studie, die mit Ethanol durchgeführt wurde, zeigen sie vergleichbare Ergebnisse für diese Substanz. Es kam zu einer verkürzten Lebensdauer der Zellen der YSM und CAM, zu einer verminderten Expression proangiogen wirksamer Wachstumsfaktoren sowie zu einer verringerten Blutgefäßdichte (30% in der Kontrollgruppe vs. 15-20% in den Ethanolgruppen) und einer verminderten Ausdehnung des Gefäßplexus. Die meisten Ergebnisse waren abhängig von der zugeführten Ethanolmenge, d.h. eine erhöhte Zugabe von Ethanol hatte schwerwiegende antiangiogene Auswirkungen (316). Diese Ergebnisse demonstrieren die Eignung des YSM als Modell zur Erforschung der Angiogenese.

2018 erfolgte durch As at al. eine Etablierung des YSM-Modells. Hierbei wurden antiangiogene Substanzen auf die YSM appliziert. Hierbei gab es unbehandelte YSMs, welche als Kontrolle dienten, mittels 0,9%-iger NaCl behandelte YSMs, welche als vehicle control dienten, und Applikationen von Arginin und Avastin als pro- und antiangiogen wirksame Substanzen für die positiv Kontrollgruppe. Durch diese breite Auswahl an Gruppen lassen sich die Effekte der applizierten Substanzen gut einschätzen. Die Forschungsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass das in ovo YSM-Modell vergleichbare Untersuchungen wie das CAM-Modell ermöglicht, und dass die Kosten geringer sind, da der Bebrütungszeitraum von über 10 Tagen auf maximal 5-6 Tage begrenzt ist. Außerdem konnte ein hohes Überleben der Eier über alle Gruppen von insgesamt 97,77% bei 180 Versuchsobjekten erreicht werden. Des Weiteren waren die

Ergebnisse für die Veränderung der Gefäßanzahlen in YSM- und CAM-Modell für die Gruppen miteinander vergleichbar (317). Es stellt sich trotz der Studie weiterhin die Frage, ob die Unterschiede zwischen den einzelnen pro- und antiangiogen wirksamen Substanzen in beiden Modellen gleich gut abgebildet werden können. Hier fällt bei Durchsicht der Ergebnisse auf, dass die Unterschiede zwischen den proangiogenen Gruppen für die Werte der quartären Gefäße im YSM-Modell weniger stark ausgeprägt sind als beim CAM-Modell, was auf ein geringeres Ansprechen der Gefäße in der YSM hinweisen könnte.

### **5.2.1 Diskussion der Ergebnisse: Gefäße und Verzweigungspunkte**

Zur Messung der Angiogenese im Modell mit Hühnerembryonen gibt es verschiedene Methoden, die sich in quantitative und semiquantitative unterteilen lassen. Zur Evaluation gehören die Quantifikation von anti- und proangiogenen Wachstumsfaktoren, Hormonen und die Expression von Genen, die für die Angiogenese wichtig sind (278). Um die unmittelbaren Auswirkungen dieser bioaktiven Moleküle zu messen, werden verschiedene wichtige Endpunkte für die Angiogenese herangezogen: die Anzahl der Gefäße in einem definierten Bereich, Anzahl der Verzweigungspunkte von Gefäßen in einem definierten Bereich, Gefäßdichte und durchschnittliche Gefäßlänge (263, 278, 318, 319). Häufig wird mittels eines digitalen Mikroskops ein Bild der YSM oder CAM gemacht, welches später ausgewertet werden kann. Hierbei kann auch auf die Hilfe von Software-Programmen zurückgegriffen werden. Dies kann die Ermittlung der Gefäßdichte und durchschnittliche Gefäßlängen erleichtern oder erst ermöglichen (318). Nguyen et al. beschreiben 1993 in ihrer Studie eine spezielle Form des Nachweises zur Angiogenese. Hierzu wird auf die CAM ein Kollagengel zwischen zwei Gitter aufgetragen. Die zu untersuchenden Stoffe werden in das Kollagengel gemischt und es kommt zu einer vertikalen Angiogenese in das Kollagengel hinein. Als Argument für eine genauere Quantifikation der Angiogenese führen die Autoren an, dass die vertikale Angiogenese nicht fehleranfällig sei für normale Wachstumsprozesse des Gefäßnetzwerkes innerhalb der CAM oder Kontraktionen der Membran durch Verschiebungen des pH-Wertes und Verletzungen der Oberfläche. Ein weiterer positiver Effekt ist, dass das Kollagen einen weißen Hintergrund bietet, von dem sich die Gefäße gut abgrenzen lassen (320). Aufgrund der leichteren Handhabung wird dennoch meist die Angiogenese in der Ebene der YSM oder CAM gemessen, wie auch in der vorliegenden Arbeit geschehen.

Im YSM-Modell wurden mit einem Auflichtmikroskop die Bilder gemacht und anschließend die Gefäße pro mm<sup>2</sup> und Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup> ausgezählt. Hierbei zeigten sich Werte von 50,71 - 51,93 Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup> im Durchschnitt für die biologisierten Gruppen, wobei die CB-Gruppe die höchste Anzahl zeigte. In der PRF-Gruppe wurden 49,86 Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup> gezählt. Zwischen den Gruppen herrschten keine signifikanten Unterschiede, in den biologisierten Gruppen wurden jedoch signifikant mehr Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup> beobachtet als bei den jeweiligen nativen Kollagenmembranen. Auffällig war die signifikant höhere Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten in der Kontrollgruppe, der unbehandelten YSM, im Vergleich zu den Gruppen der nativen Kollagenmembranen. Die Ergebnisse der Gefäße pro mm<sup>2</sup> sind analog zu denjenigen der Gefäßverzweigungspunkte pro mm<sup>2</sup>, mit Ausnahme eines Angleichens der nativen Kollagenmembran-Gruppen und der unbehandelten YSM-Kontroll-Gruppe (s. Abschnitt 4.2.1, 4.2.2, s. Tab. 7.6, 7.7).

Die Gruppenstärke betrug jeweils n=28 (s. Abschnitt 4.2). Damit waren die Gruppen vergleichbar mit der Studie von As et al., welcher eine Gruppengröße von n=30 zugrunde lag (317), Ma et al. untersuchten Gruppen von n=25 (315), wohingegen die Studie von Wang et al. aus dem Jahr 2015 mit einer deutlich kleineren Gruppengröße von n=10 arbeitete (316). Dies zeigt, dass die Stichprobe der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu anderen Studien gleichwertig oder gar größer ist, die erzeugten Ergebnisse also von nicht unerheblichem Wert sind.

As legte in seiner Studie der Auswertung der Gefäße eine andere Zählweise zugrunde als die vorliegende Arbeit. Er ordnete die Gefäße nach ihrem Rang, d.h. in Gefäße erster, zweiter, dritter und vierter Ordnung. Hierbei waren die Gefäße erster Ordnung diejenigen, die direkt ohne Verzweigung aus dem Embryo entsprossen. Nach jeder Verzweigung fallen die Gefäße in ihrem Rang bis hin zu den Gefäßen vierter Ordnung, zu denen das Kapillarnetzwerk gehört. Außerdem wurde in dieser Studie ein 300x300 Pixel großes Fenster händisch ausgezählt, was allerdings nicht näher in einen Größenbezug gestellt wurde (321). Diese fehlende Bezugsgröße verhindert eine Vergleichbarkeit der absoluten Ergebnisse zu der vorliegenden Studie. Viele andere Arbeiten beschreiben jedoch im YSM-Modell meist die Gefäßdichte, so geschehen bei Wang et al. (316), Jin et al.(314) und Jiao et al. (322). Auffällig ist, dass die eben genannten Arbeiten ihre Bilder in einer deutlich niedrigeren Vergrößerung aufgenommen haben als es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Es war zwar in keiner der Arbeiten eine genaue Vergrößerung angegeben, jedoch ist die niedrigere

Vergrößerung augenfällig bei Durchsicht der Ergebnisse der Studien. Die recht hohe Vergrößerung von 50x rückt den Fokus der Angiogenese hinein in den kapillären Bereich und weg von den großen Gefäßen der YSM. Dementsprechend wären die verschiedenen Ergebnisse der gemessenen Gefäße nur bedingt bis gar nicht miteinander vergleichbar. Es muss ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass während der Durchführung der Untersuchung weiterhin Angiogenese und Vaskulogenese von statten gehen. Das Untersuchungsobjekt ist nicht starr, auch durch äußere Einflüsse geprägt und damit ist die Messung der Angiogenese hier stets schwierig isoliert untersuchbar. Wang et al. beschreiben in ihrer Studie die Vergrößerungsrate der YSM-Region, der Blutgefäßregion auf der YSM und der Gefäßdichte innerhalb von 12h, nachdem die Embryonen zuvor 60h inkubiert wurden. Hierbei kommen sie auf eine Vergrößerung der Gefäßregion von 120% und der Gefäßdichte von etwa 70% (323). Dies zeigt das schnelle Wachstum der YSM und die Notwendigkeit einer Kontrollgruppe, um zwischen den pro- bzw. antiangiogenen Eigenschaften der applizierten Substanz und der durch die Entwicklung stattfindenden Angiogenese unterscheiden zu können.

Die Einordnung der Gefäße nach Rängen ermöglicht sicherlich eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien und ist weniger anfällig für Fehler aufgrund des ausgewählten Ausschnittes der YSM, allerdings muss auch hier eine feste Bezugsgröße festgelegt werden, um Studien untereinander vergleichen zu können. Hierfür eignet sich das Auszählen pro Quadratmillimeter oder Quadratzentimeter, da dies gebräuchliche Größen sind, abgeleitet von der SI-Einheit Meter und leicht standardisierbar (324).

### **5.2.2 Diskussion der Ergebnisse: HE Färbung**

Die histologische Untersuchung der YSM wird auch in anderen vergleichbaren Studien durchgeführt. Sie dient der Validierung der Ergebnisse aus den vorherigen Ergebnissen der Auszählung der Gefäße. Die Gefäßverzweigungspunkte sind hierbei jedoch nicht nachvollziehbar, da ein histologischer Schnitt immer nur einen kleinen Ausschnitt des Gesamten zeigt und nur selten den Verlauf von Gefäßen. Die Ausrichtung der Schnitte (horizontal vs. vertikal) ändert ebenfalls das Ergebnis der Auszählung von Gefäßen. In der vorliegenden Studie wurde eine horizontale Schnittführung der YSM gewählt, da hierdurch ein repräsentativerer, weil größerer Ausschnitt untersucht werden kann. Durch die dünne YSM kommt es in der Tiefe der Membran trotzdem zu einem „blinden Fleck“, welcher bei dieser Methode nicht sichtbar wird. Allerdings ist die Entnahme des betroffenen Abschnitts der YSM leichter zu standardisieren als bei einer vertikalen

Probenentnahme. In der vorliegenden Studie wurde dementsprechend immer die gesamte YSM unter der zu untersuchenden Membran entnommen. Bei einer vertikalen Schnittführung ist der untersuchte Ausschnitt unter der Membran sehr variabel und durch diese Variabilität entsteht eine gewisse Fehleranfälligkeit.

Wang et al. beschreiben in ihrer Arbeit die Auswirkung von hoher Salzexposition auf den Hühnerembryo u.a. durch das Gefäßnetzwerk der YSM. Hierbei maßen sie die Gefäßdichte, welche in der unbehandelten YSM bei 9,02% lag und mittels einer Software ermittelt wurde, und analysieren danach histologische Schnitte aus der YSM. Sie beschreiben in der histologischen Auswertung HE-gefärbte Schnitte. Die definierten Endpunkte waren der Gefäßdurchmesser und die Anzahl an Gefäßen in der YSM. In der unbehandelten YSM zählen sie pro Schnitt 6,4 Gefäße (325). Zum Vergleich wurden in der vorliegenden Studie 13,19 Gefäße pro mm<sup>2</sup> in der YSM Gruppe ausgezählt. Die histologischen Schnitte wurden bei Wang et al. im Gegensatz zu der vorliegenden Studie vertikal durch die YSM angefertigt und nicht horizontal. Dies könnte die geringere Anzahl an gezählten Gefäßen gegenüber der vorliegenden Studie erklären.

### **5.2.3 Diskussion der Ergebnisse: Immunhistochemische Färbungen**

In der vorliegenden Studie wurden ferner nach der HE Färbung weitere immunhistochemische Färbungen der Schnitte mit einem  $\alpha$ -SMA-Antikörper und einem CD105-Antikörper durchgeführt.  $\alpha$ -SMA ist ein Protein, welches in glatten Muskelzellen und Perizyten exprimiert wird (326, 327). Hiermit zeigt eine immunhistochemische Färbung mit  $\alpha$ -SMA an, wo sich diese beiden Zelltypen befinden, ist damit also ein indirekter Nachweis für das Vorhandensein von Gefäßen. Nach der Aussprossung sind die neuen Gefäße zunächst nur Endothelzellrohre, ohne weitere Wand. Deshalb rekrutieren die Endothelzellen im Prozess der Reifung murale Zellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen, die sich zur Stabilisierung um das bestehende Endothelzellrohr legen (203). Wichtige Wachstumsfaktoren in diesem Zusammenhang sind vor allem PDGF-B und TGF- $\beta$ , die für die Rekrutierung, Differenzierung der muralen Zellen und deren Adhäsion an das Endothelzellrohr sorgen (203). Diesen Umstand machten sich auch Kobayashi et al. in ihrer Studie von 2015 zunutze, färbten jedoch Schnitte aus der CAM und nicht der YSM (247).

In der vorliegenden Studie wurden für die Auswertung der  $\alpha$ -SMA-Färbung signifikante Unterschiede für die bioaktivierten Kollagenmembrangruppen im Vergleich zu den nativen Kollagenmembrangruppen gefunden. So fand sich eine 1,44-1,69-fache Vermehrung der Gefäßzahl durch die Bioaktivierung. Tendenziell waren auch für die

Ermittlung des Anteils an  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen die Prozentzahlen für die bioaktivierten Gruppen höher als für ihre jeweiligen Vergleichsgruppen, ein signifikanter Unterschied fand sich jedoch nur im Vergleich von der CB- und CN-Gruppe (s. Abschnitt 4.3.2). Ein Grund für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der ausgezählten  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Gefäßen und der Ergebnisse des Anteils an  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen am gesamten Schnitt ist vermutlich in der Tatsache zu finden, dass die Rekrutierung der muralen Zellen bis zu 48h dauert. Benjamin et al. fanden in einem Modell der Retina von Nagetieren heraus, dass nach 2 Tagen nur die größeren Arteriolen mit Perizyten bedeckt waren, obwohl das Gefäßnetzwerk bereits voll ausgebildet war. Es dauerte 10 Tage, bevor die primären Verzweigungen mit Perizyten bedeckt waren und erst nach 18 Tagen kam es zu einer Umhüllung der sekundären und tertiären Verzweigungen (328). Trotzdem bedienen sich viele Studien der  $\alpha$ -SMA-Färbung im Zusammenhang mit dem Nachweis der Angiogenese (247). Hiermit waren nach dem Beobachtungszeitraum von 24h also häufig der Prozess der Reifung der Gefäße noch nicht abgeschlossen und somit noch keine signifikant erhöhte Anzahl an  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Zellen in dem Schnitt zu finden. Lin et al. weisen nach, dass die  $\alpha$ -SMA-Expression über die Zeit konstant ist. Der Fehler liegt also nicht in einer erst über die Zeit zunehmenden bzw. späteren  $\alpha$ -SMA-Expression (329).

In der Studie von Kobayashi et al., in welcher verschiedene Thrombozytenkonzentrate gegeneinander getestet werden und auf die CAM aufgetragen werden, wurden ebenfalls histologische Untersuchungen gemacht. Die erfolgte  $\alpha$ -SMA-Färbung zeigte Ergebnisse von über 50  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Gefäßen pro mm<sup>2</sup> für die unbehandelte CAM und von über 100  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>-Gefäßen für die PRF-Gruppe (247). Zum Vergleich zeigten sich in der vorliegenden Studie lediglich 13,93 Gefäße pro mm<sup>2</sup> in der YSM-Gruppe und 19,26 Gefäße in der PRF-Gruppe (s. Abschnitt 4.1.6). Ein Grund für den eklatanten Unterschied der Ergebnisse könnte die Tatsache sein, dass die CAM stärker vaskularisiert ist als die YSM. Des Weiteren ist der starke Anstieg der Gefäße in der PRF im Vergleich zu der CAM in der Studie von Kobayashi eventuell auch der längeren Inkubationszeit von 3 Tagen im Vergleich zu dem einen Tag in der vorliegenden Studie geschuldet.

Des Weiteren sind diese Ergebnisse auch in anderen Tiermodellen nachweisbar, so geschehen bei Chen et al.. Untersucht wurde der Einfluss von einer Mischung aus PRF und aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen auf die Heilung von oralen und maxillofacialen Defekten. Hierbei wurde eine immunhistochemische Färbung für den Faktor VIII angewandt, um Gefäße nachzuweisen. Es konnte eine signifikante

Steigerung der Gefäßzahl von 11,2 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> auf 22,3 in der PRF-Gruppe und 26,4 in der kombinierten Gruppe beobachtet werden (219).

Endoglin (CD105) ist ein Marker für proliferierende Endothelzellen von Blutgefäßen (248). Die Aufgabe von CD105 ist die Modulation der Signalantwort von TGF- $\beta$ , dieser Aufgabe kommt es als TGF- $\beta$  Typ III Rezeptor nach (330, 331). CD105 wird von aktiven Gefäßendothelzellen exprimiert und kann deshalb als Marker für die Angiogenese eingesetzt werden. Endothelzellen, die sich in ihrer Ruhephase befinden, exprimieren hingegen kein CD105 (331). CD105 ist essentiell für die Ausbildung eines gut funktionierenden Gefäßnetzwerkes, dies zeigt sich bei Krankheiten wie der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT), für welche ein Defekt im Endoglinen zu Gefäßmalformationen und einem Verlust der Kapillaren führt (332). Die Wichtigkeit von CD105 für die Angiogenese konnte auch für das Huhn von Raab et al. in ihrer Arbeit von 1999 gezeigt werden (333). Rossi et al. beschreiben weiterhin, dass das CD105 von Hühnern demjenigen von Säugetieren sehr ähnlich ist. Trotz dieser hohen Ähnlichkeit konnten sie keine funktionale Bindung von humanem TGF- $\beta$  und dem CD105 von Hühnern nachweisen (334). In der vorliegenden Studie zeigte sich für alle bioaktivierten Gruppen eine signifikant erhöhte Gefäßzahl pro mm<sup>2</sup>. Die MB-Gruppe zeigte hierbei die höchste Gefäßzahl mit 29,48 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> und auch die höchste Steigerung der Gefäßzahl im Vergleich mit der nativen Kontrollgruppe mit einer 2,92-fachen Erhöhung. Gleichzeitig zeigte die MB-Gruppe auch im Vergleich zu den anderen biologisierten Gruppen eine signifikant erhöhte Gefäßzahl. Ebenfalls auffällig war, dass die reine PRF-Gruppe die geringsten Gefäßzahlen aufwies und signifikant verminderte Zahlen für die Gefäße pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den biologisierten Kollagenmembrangruppen zeigte (s. Abschnitt 4.3.3). Da das eingesetzte PRF humane Wachstumsfaktoren enthielt, könnte es zu einer verminderten Endothelzellaktivierung gekommen sein, dies erklärt allerdings nicht den Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Ein eventueller Einfluss des Kollagens aus den eingesetzten Kollagenmembranen auf das Endoglin kann diskutiert werden. In der aktuellen Literatur findet sich jedoch keine Arbeit, die sich der Interaktion dieser beiden Moleküle widmet.

Raab et al. beschreiben die Angiogenese in der CAM ebenfalls anhand einer Färbung von Endoglin, die angefertigten histologischen Schnitte wurden jedoch nicht quantifiziert. Es erfolgte lediglich der Nachweis, dass Endoglin tatsächlich in den Gefäßen vorhanden ist (333). Ferician et al. untersuchten in ihrer Studie von 2015 ebenfalls histologische Schnitte aus der CAM, nachdem zuvor ein Nierenzellkarzinom implantiert wurde. Die Färbung folgte u.a. mit CD105-Nachweis. Allerdings werden die

Ergebnisse in Gefäßen pro Sichtfeld bei 400-facher Vergrößerung angegeben und es wurde auch nur die Anzahl in der CAM mit implantierten Nierenzelltumoren berichtet, die bei 30 CD105<sup>+</sup>-Blutgefäßen pro Sichtfeld lag (335). Immunhistochemische Färbungen mit CD105 werden auch in anderen Tiermodellen verwendet, wie etwa bei Nagern. Aktuelle Versuche mit Monoklonalen Antikörpern gegen Endoglin zur Verminderung des Tumorgefäßwachstums zeigen eine signifikante Effektivität (336-338). Die fehlenden Studien zum Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie machen eine Einordnung in die Gesamtliteratur schwierig. Es ist jedoch möglich, eine Konsistenz der Ergebnisse innerhalb der Arbeit zu erkennen. So wurden für die PRF Gruppe in der HE-Färbung 17,48 Gefäße pro mm<sup>2</sup> ausgezählt, in der  $\alpha$ -SMA-Färbung waren es 19,26 Gefäße und in der CD105-Färbung 15,11 Gefäße. Exemplarisch sollen noch die Ergebnisse von der JB-Gruppe aufgeführt werden: HE-Färbung: 20,59;  $\alpha$ -SMA-Färbung: 20,3; CD105-Färbung: 20,89 (s. Abschnitte 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3). Die Ergebnisse der verschiedenen Färbungen liegen also sehr nah beieinander, was ein Indiz dafür ist, dass sie die Wirklichkeit gut abbilden. Kleinere Abweichungen können durch das unterschiedliche Anschneiden der histologischen Schnitte und Fehler beim Zählen erklärt werden.

### 5.3 CAM zur Messung der Angiogenese

Die CAM ist ein sehr beliebtes in vivo Modell zur Untersuchung der Angiogenese. Sie eignet sich aufgrund der leichten Handhabung und der Möglichkeit hohe Fallzahlen zu generieren hervorragend als Untersuchungseinheit. Gleichzeitig steht sie im Einklang mit den 3R-Richtlinien zum Schutz von Labortieren im Zusammenhang mit der Forschung (266).

Es gibt verschiedene Protokolle des CAM-Modells, was eine Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse erschwert. Meist wird am 9. oder 10. Tag die Applikation des zu untersuchenden Stoffes oder Materials vorgenommen. Anschließend wird dieser nach einer bestimmten Inkubationszeit ausgewertet (339-341). Wilting et al. postulierten 1991, dass eine Applikation erst ab dem 13. Tage erfolgen sollte, da vorher die Angiogenese noch nicht abgeschlossen und die Rate an positiven und negativen Antworten auf die Trägerstruktur des zu untersuchenden Stoffes deutlich höher sei (341). Es gibt jedoch auch Lehrmeinungen, die den optimalen Zeitpunkt der Applikation auf den 7. Tag datieren, da hier die Gebiete zwischen den großen Gefäßen noch nicht stark vaskularisiert sind. Das Immunsystem des Hühnerembryos ist noch nicht voll ausgebildet und die Interaktion zwischen dem Material und dem sich entwickelnden

Mesoderm bietet zu diesem Zeitpunkt ein optimales Umfeld für sich neu entwickelnde Gefäße (266).

Die Angiogenese der CAM kann in drei Phasen eingeteilt werden. Die erste dauert etwa von Tag 5-7, wobei der vorherrschende Mechanismus das Aussprießen neuer Gefäße ist. Hier kommt es zu einem raschen Anstieg der Anzahl von Kapillaren. Schlatter et al. gehen in ihrer Arbeit davon aus, dass zu diesem Zeitpunkt vor allem eine Vermehrung durch ein Aussprossen stattfindet (340). In der zweiten Phase, welche von Tag 8-12 andauert, wird die Intussuszeption wichtiger. Trotz eines weiteren Anstiegs der Gefäßdichte der CAM können kaum noch Aussprossungen neuer Gefäße beobachtet werden. In der letzten Phase, den Tagen 13 und 14, dehnt sich zwar das Gefäßnetz weiter aus, die Komplexität reduziert sich jedoch eher. Die Gefäßdichte nimmt ab und der interkapilläre Abstand nimmt wieder zu (270, 340). Dies deckt sich mit der Arbeit von Wilting et al., die forderten, dass die Untersuchungen zur Angiogenese erst ab dem 13. Tag stattfinden sollten (341).

Ein Problem bei einer solch späten Applikation ist die Ausbildung des Immunsystems ab dem 11. Tag. So konnten Janse et al. ab dem 13.-14. Tag eine zellvermittelte Immunreaktion feststellen, indem sie Leukozyten und Phagozyten in verschiedenen Geweben des Hühnerembryos nachwiesen (342). Murphy beschreibt hingegen in seiner Arbeit, dass eine Implantation von Gewebe aus Ratten problemlos und scheinbar ohne Immunreaktion bis zum 18. Tag in den Hühnerembryo möglich ist. Ab dem 19. Tag zeigten die implantierten Zellen Zeichen der Nekrose (343). Trotz der späten Immunreaktion wird ab dem 15. Tag häufig eine unspezifische inflammatorische Reaktion beschrieben, die jedoch umso seltener auftritt, je früher die Applikation der Testsubstanz oder des Testmaterials geschieht (344).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kollagenmembranen am 11. Tag appliziert und nach 24h kam es zu einer Auswertung der Angiogenese. Dieser etwas spätere Zeitpunkt wurde aufgrund der Beschreibung der Eigenschaften der Endothelzellen in der CAM von Ausprunk et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 1974 ausgewählt. Hierbei kommt die Forschergruppe zu dem Ergebnis, dass die Endothelzellen vor dem 11. Tag recht undifferenziert und unreif sind. Dies wurde durch eine Molekülmarkierung der Endothelzellen durch Thymidin bestimmt. So lag der Molekülmarkierungsindex der Endothelzellen vor dem 11. Tag bei etwa 23% und fiel danach auf 2,8% ab. Dies ließ die Autoren zu der Annahme kommen, dass die Endothelzellen nach dem 11. Tag eher die Charakteristika reifer Endothelzellen aufweisen (269).

### 5.3.1 Diskussion der Ergebnisse: Gefäße und Verzweigungspunkte

Zur Quantifikation der Angiogenese in der CAM sind verschiedene Möglichkeiten vorhanden, wie schon bei der Quantifikation der Angiogenese im YSM-Modell besprochen. Es kommen semi-quantitative und quantitative Verfahren in Frage. Die gewöhnlichste Variante ist das manuelle Auszählen der Gefäße, dies wurde u.a. durch DeFouw et al. durchgeführt (274). Die Forschergruppe teilte die Gefäße nach ihrer Ordnung ein, ähnlich wie bei As et al. geschehen (321). Ein Unterschied ist, dass die Ordnung der Gefäße bei DeFouw et al. mit dem Zusammenfließen der Gefäße zunimmt, Gefäße erster Ordnung also Kapillaren darstellen, und bei As et al. Gefäße erster Ordnung die Umbilikalgefäße des Embryos repräsentieren. In der Studie von DeFouw et al. wurde, wie in der vorliegenden Studie, ein definierter Bereich untersucht, in diesem Fall ein Quadrat von 0,7cm x 0,7cm. Anschließend erfolgte eine manuelle Auszählung nach Ordnung der Gefäße (274). Auch bei dieser Studie ist eine Vergleichbarkeit nur bedingt möglich, da die ausgezählten Gefäße in einer ungewöhnlichen Fläche von 0,49cm<sup>2</sup> angegeben wurden. Dasselbe Problem ergibt sich in der Studie von Célérier et al. aus dem Jahr 2002, wo ebenfalls die Gefäße der ersten und zweiten Ordnung an einem zufälligen Ort der CAM ausgezählt wurden, jedoch keiner Bezugsgröße zugeordnet wurden (345). Und auch As et al. zählen zwar die Gefäße in der CAM aus, geben allerdings etwa 20 Gefäße pro 300x300 Pixel an, was einen Vergleich unmöglich macht (317).

In der Studie von Kobayashi et al. wird, wie auch in der vorliegenden Studie, das angiogene Potenzial der PRF mit dem CAM-Modell gemessen. Es ergibt sich für die unbehandelte CAM ein Wert von etwa 30 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> und etwa 60 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> nach Behandlung mit einer PRF (247). Diese Werte konnten in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Hier wurden 30,81 Gefäße pro mm<sup>2</sup> in der PRF Gruppe gezählt. Die Gruppen der nativen Kollagenmembranen wiesen 24(JN)-26,37(MN) Gefäße pro mm<sup>2</sup> auf. Die biologisierten Kollagenmembranen der JB und MB-Gruppe 34,52 bzw. 36,59 Gefäße pro mm<sup>2</sup> und hatten damit eine signifikant vergrößerte Anzahl (s. Abschnitt 4.4.1). Nichtsdestotrotz sind die Zahlen der biologisierten Gruppen deutlich geringer als in der vergleichbaren Studie von Kobayashi, wohingegen die Zahlen der unbehandelten CAM und der nativen Kollagenmembranen aus der vorliegenden Studie vergleichbar hoch sind. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der deutlich längeren Inkubationszeit in der Studie von Kobayashi et al. von 72h (247). Bei Ratajczak et al. wird ebenfalls eine L-PRF-Membran auf die CAM appliziert und es kommt zu einer Auszählung der

Gefäße. Jedoch wird nicht weiter angegeben, wie und wo die Gefäße ausgezählt werden. Dementsprechend sind die absoluten Zahlen der Ergebnisse nicht miteinander zu vergleichen. Die Forscher zeigten jedoch ebenfalls eine signifikante Steigerung der Gefäßzahl in der CAM durch eine Behandlung mit PRF (301).

Hilfreich bei der Quantifikation der Gefäße kann die Injektion von fluoreszierenden Substanzen in das Gefäßsystem des Embryos sein. Ein beliebter Fluoreszenzfarbstoff ist die FITC-Dextran-Lösung, welche mittels eines Intravitalfluoreszenzmikroskops dargestellt wird. Diese Methode garantiert die Detektion der durchbluteten Gefäße, gleichzeitig ist die Lösung toxisch und der Embryo stirbt innerhalb einiger Minuten bis Stunden. Eine langfristige Beobachtung der Angiogenese ist hiermit also nicht möglich. Diese Methode ist auch nur für das CAM-Modell geeignet, da die Injektion eine gewisse Größe der Gefäße voraussetzt (266, 274, 346). Deshalb beschreiben Leong et al. 2010 in ihrer Arbeit eine Methode, die sich fluoreszierende virale Nanopartikel zu Nutze macht. Diese sollen eine bessere Biokompatibilität aufweisen und dadurch eine längere Beobachtung der Angiogenese ermöglichen (347). Eben solche Forschungsansätze können einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Angiogenese leisten, da sie eine bessere Untersuchung über einen längeren Zeitraum möglich machen.

Des Weiteren muss die Inkubationszeit von 24h in der vorliegenden Studie diskutiert werden. Ribatti et al. postulierten eine Inkubationszeit von 72-96h zur Messung einer pro- oder antiangiogenen Antwort der CAM. Bei der empfohlenen Inkubationszeit handelt es sich allerdings um die Testung von Substanzen, die mittels Polymeren auf die CAM aufgebracht werden. Diese Polymere werden abgebaut und geben über die Zeit die Testsubstanz an die CAM ab (348). In einer früheren Arbeit untersuchte Ribatti die Reorganisation von Gefäßen nach deren Durchtrennung in der CAM. Er zeigte, dass innerhalb von 24-72h eine Anastomosierung stattfand, was die Angiogenese innerhalb von 24h in der CAM beweist (349).

Die Fallzahl von  $n=9$  pro Gruppe war deutlich niedriger als im zuvor durchgeführten YSM-Modell. Dies lag zum einen an der Tatsache, dass das CAM-Modell zeitaufwändiger ist als das YSM-Modell und zum anderen an der hohen Anzahl an Hühnerembryonen, die bis zum 11. Tag verstarben. In der Studie von Célérier et al. variierten die Gruppengrößen zwischen  $n=6$  und  $n=20$  (345), Kobayashi et al. arbeiteten hingegen nur mit  $n=5$  (247), was den Fallzahlen pro Gruppe von  $n=7$  in der Arbeit von Strick et al. sehr ähnlich war (350). Die Fallzahlen der vorliegenden Studie wurden für das CAM-Modell also in üblichem Ausmaß gewählt und sind in der Lage valide Ergebnisse zu liefern.

In der vorliegenden Studie konnte klar gezeigt werden, dass auch bei einem Beobachtungszeitpunkt von 24h bereits eine Angiogenese detektiert werden kann (s. Abb. 4.10, 4.11, 4.12). Es wurde eine signifikante Vermehrung der Gefäße und der Gefäßverzweigungspunkt pro mm<sup>2</sup> für die biologisierten JB und MB-Gruppen beobachtet. In der CB-Gruppe kam es nicht zu einer signifikanten Steigerung der Gefäße oder Gefäßverzweigungspunkte. In dieser Hinsicht sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie konstant. Nichtsdestotrotz steht die Tatsache, dass es in der CB-Gruppe nicht zu einer Vermehrung kam, konträr zu den bereits diskutierten Ergebnissen des YSM-Modells. Dies kann an der Tatsache liegen, dass der Beobachtungszeitraum von 24h für das CAM-Modell doch zu kurz gewählt wurde, obwohl er für das YSM-Modell ausreichend zu sein scheint. Ein weiterer Indikator hierfür sind die Ergebnisse der Gefäßdichte der CAM. Hier ergab sich nur für die MB und CB-Gruppen eine Erhöhung des Gefäßanteils der CAM. Dies ist vor allem für die JB und die GB-Gruppen inkonsistent im Vergleich zu den Ergebnissen der Gefäße pro mm<sup>2</sup>. Wenn man davon ausgeht, dass mehr Gefäße auch gleichzeitig eine höhere Gefäßdichte bedeuten, ist die Erklärung für diese Inkonsistenz in der Software oder dem Versuchsaufbau zu suchen. Möglicherweise kam es innerhalb der 24h in der JB-Gruppe zwar zu einer Erhöhung der Gefäßzahl pro mm<sup>2</sup>, diese Gefäße scheinen jedoch nicht genügend Zeit zur Reifung und Vergrößerung ihres Lumens gehabt zu haben, sodass die höhere Anzahl nicht in einer höheren Gefäßdichte resultierte (328).

Andere in vivo Modelle konnten ebenfalls eine gesteigerte Angiogenese durch die Benutzung von PRF nachweisen. So untersuchten Roy et al. 2011 den Einfluss von PRF im Zusammenhang mit der Angiogenese von Wunden. Hierzu wurden den Rücken von Schweinen chirurgisch Hautdefekte von einer bestimmten Größe zugefügt. Die Behandlung mit PRF führte zu einer schnelleren und verbesserten Wundheilung. Zur Quantifikation der Angiogenese wurde mit einem Laser-Doppler der Blutfluss gemessen. Es zeigten sich signifikant höhere Blutflussraten in der PRF-Gruppe, was die Forscher zu der Annahme brachte, dass auch die Angiogenese durch die PRF verbessert wurde. Die Messung wurde 14 Tage nach Implantation durchgeführt, die sehr kleine Fallzahl von n=3 schränkt die Aussagekraft der Studie jedoch ein (218). Suzuki et al. benutzen einen ähnlichen Versuchsaufbau für ihre Studie an Ratten. Hierzu wurden den Ratten am Rücken chirurgisch Hautdefekte von etwa 1,5 cm zugefügt, anschließend wurde ein Gelatinalgel, mit PRF, PRP und verschiedenen Wachstumsfaktoren getränkt, eingefügt. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Gewebeentnahme. Zur Messung der Angiogenese wurde hier die Menge an Hämoglobin quantifiziert, die auf das

Vorhandensein von Blutgefäßen hinweisen soll. Hierbei zeigte sich für das PRF eine Erhöhung der Menge an Hämoglobin mit einem Maximum nach 3 Tagen, was für die Forscher mit einer schnellen Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus dem PRF zusammenhängt und es konnte eine Erhöhung der Angiogenese nachgewiesen werden (351). Diese Studien zeigen, dass sich die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie, trotz der Tatsache, dass sie in einem Tiermodell mit Vögeln durchgeführt wurden, auch mit in vivo Versuchen in Säugetieren reproduzieren lassen.

### **5.3.2 Diskussion der Ergebnisse: Gefäßdichte und Vascular length density**

Die Gefäßdichte als Methode des Nachweises von Angiogenese wurde bereits kurz in Abschnitt 5.2.1 diskutiert. Die Messung der Gefäßdichte zum Nachweis von Angiogenese ist durch die vermehrte Anzahl an Gefäßen bei einer Stimulation der Endothelzellen zu erklären. Durch ein Mehr an Gefäßen steigt ebenfalls die Gefäßdichte. In der vorliegenden Studie lag die gemessene Gefäßdichte zwischen 27,79 % in der JB Gruppe und 38,83 % in der CB-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen den biologisierten Gruppen nicht festgestellt werden. Für die CB und MB-Gruppen konnte jeweils eine statistisch signifikante Erhöhung der Gefäßdichte im Vergleich zu der jeweiligen nativen Kollagenmembrangruppe ermittelt werden (s. Abschnitt 4.4.4).

Miller et al. vergleichen in ihrer Studie u.a. die Auswertung der Gefäßdichte durch einen Score von 0 bis 4 (0 bedeutete keine Angiogenese in der CAM sichtbar, 4 bedeutete eine starke Angiogenese in der CAM sichtbar), welcher von 3 unabhängigen Untersuchern ausgeführt wurde. Um die Gefäße besser darzustellen, wurde in dieser Studie ebenfalls FITC-Dextran verwendet. Verglichen mit der Computeranalyse konnten im Score-System keine Änderungen durch die Behandlung mit bFGF entdeckt werden, wohingegen die Analyse durch die Software eine signifikante Steigerung der Gefäßdichte in der CAM detektierte. Dies ließ die Autoren zu der Vermutung kommen, dass eine computergestützte Auswertung zu exakteren Ergebnissen führt und die Wirklichkeit für die Gefäßdichte besser abbilden kann (352). Deshalb geschah die Ermittlung in der vorliegenden Studie mit der Fiji-Software, welche zunächst eine Skelettierung des Gefäßnetzwerkes vornahm, um später daraus die Gefäßdichte zu messen. Du et al. beschreiben in ihrer aktuellen Studie aus dem Jahr 2020 die Gefäßdichte in der CAM und deren Änderung durch die Implantation von humanen Brustkrebszellen. Hierbei benutzen sie ebenfalls die Fiji-Software und kommen auf vergleichbare Ergebnisse. Zum Vergleich liegt hier die Gefäßdichte in der unbehandelten

CAM bei 23,8% und in der vorliegenden Studie bei 22,39% bzw. 22,44% in den beiden nativen Kollagengruppen JN und MN (353) (s. Abschnitt 4.4.3).

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen beschreiben Nica et al. in ihrer Studie zur Wundheilung in Ratten keine positiven Auswirkungen von PRF auf die Angiogenese. Hier sind sowohl die Gefäßdichte als auch die Anzahl der Blutgefäße in den histologischen Schnitten nicht signifikant erhöht. Es zeigte sich lediglich eine verminderte Nekroserate durch die Behandlung mit PRF (354). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den Methoden liegen, da histologische Schnitte nur schwierig das gesamte Gefäßnetzwerk abbilden können. Dies erklärt jedoch nur den Unterschied in der Gefäßdichte, nicht das Ausbleiben einer Erhöhung der Gefäßzahl.

In der Studie von Strick et al. erfolgte ebenfalls eine Untersuchung der CAM, bei der sowohl ein vascular density index als auch die vascular length density bestimmt wurden. Der vascular density index wird hier mit Schnittpunkten des Gefäßnetzwerkes pro mm gemessen, beschreibt also eher die Verzweigungspunkte als die Gefäßdichte und auch die Einheit der vascular length density wird ungewöhnlicherweise in mm/mm<sup>2</sup> angegeben (350).

Vergleichbare Studien zur vascular length density in der CAM konnten in der Literaturrecherche nicht gefunden werden, nichtsdestotrotz wird diese Zielgröße häufig im Zusammenhang mit der Untersuchung des Gefäßplexus der Retina beschrieben (355, 356). Hier ist die vascular length density folgendermaßen definiert:  $\text{skeletonized vessel area} / \text{total area} \times 100 \%$ . So ist sie etwa bei Patienten mit Sepsis in der Retina vermindert und korreliert mit Laktat und dem Herzindex (356). In der vorliegenden Studie konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der biologisierten Gruppen oder der PRF auf die vascular length density gezeigt werden. Die vascular length density war jedoch stets in der biologisierten Gruppe höher als in der jeweiligen nativen Kollagenmembran-Gruppe. Eine fehlende Signifikanz der Ergebnisse könnte an dem zu kurz gewählten Beobachtungszeitraum liegen oder aber daran, dass die Zielgröße nicht für die Messung der Angiogenese im CAM-Modell geeignet ist. Für Letzteres würde auch die fehlende Vergleichsliteratur sprechen.

## **5.4 Auswirkungen der Eigenschaften der Kollagenmatrices auf die Angiogenese und Gewebsregeneration**

In der vorliegenden Studie wurden drei Kollagenmembranen verglichen, die aufgrund ihrer Herstellung unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Alle drei bestehen aus porcinem Kollagen der Typen I und III. Eine der Membranen (Collprotect) ist kreuzvernetzt, was zu einer höheren Stabilität führen soll und die Größe der Poren in der Kollagenmembran vermindert. Die anderen beiden Membranen sind hingegen nicht kreuzvernetzt, besitzen jedoch unterschiedliche Dicken. Dies sollte es ermöglichen, einen Effekt der Kreuzvernetzung und der Dicke der Membran auf die Angiogenese sowie die Speicherung und Expression von Wachstumsfaktoren zu untersuchen.

Bei einem Überblick über die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann man festhalten, dass eine Biologisierung der Kollagenmembranen durchgängig in allen Versuchen mit wenigen Ausnahmen zu einer erhöhten Angiogenese führt.

Dies zeigte sich sowohl im YSM-Modell, in den histologischen Untersuchungen und im CAM-Modell. Auch die *in vitro* Untersuchung der biologisierten Kollagenmembranen in den ELISA-Tests konnte eine erhöhte Freisetzung von VEGF und TGF- $\beta$  nachweisen. Es ist jedoch aufgrund der erhaltenen Ergebnisse nicht möglich, eine Aussage über den Einfluss der verschiedenen eingesetzten Kollagenmembranen auf die Angiogenese zu treffen (s. Abschnitt 4.1.1, 4.1.2).

In der Studie von Stähli et al. wurden dieselben Kollagenmembranen wie in der vorliegenden Arbeit verwendet. U.a. erfolgte eine Untersuchung der Membranen mit dem Rasterelektronenmikroskop, wobei die nicht kreuzvernetzte Kollagenmembran (Jason) eine sehr dichte Oberfläche zeigt, wohingegen die kreuzvernetzte Kollagenmembran eine etwas losere Porenstruktur aufweist (Collprotect). Dies ist anhand der Literatur ein verwunderliches Ergebnis. Die nicht kreuzvernetzte Kollagenmatrix zeigt die rauste Oberfläche (Mucoderm) (250).

Aus bisherigen Studien zu dem Thema lässt sich ableiten, dass die verschiedenen Beschaffenheiten der Kollagenmembranen durchaus zu unterschiedlichen angiogenen Reaktionen führen können. Rothamel et al. untersuchen in den Studien von 2005 und 2006 den Einfluss einer Kreuzvernetzung des Kollagens auf die Biokompatibilität und die Angiogenese in Ratten (12, 357). Hierbei zeigen ihre Ergebnisse, dass Kollagenmembranen, die nicht kreuzvernetzt sind, tendenziell schneller durch den Körper abgebaut werden und es schneller zu einer Vaskularisierung der Membran kommt. So waren die nicht kreuzvernetzten Kollagenmembranen nach 2 Wochen

größtenteils vollständig vaskularisiert, wohingegen es bei den kreuzvernetzten Kollagenmembranen 4-8 Wochen dauerte, um eine ähnliche Vaskularisierung zu erreichen. Gleichzeitig ergab die morphologische Untersuchung der Membranen unter dem Rasterelektronenmikroskop vor allem für die kreuzvernetzten Kollagenmembranen das Erscheinungsbild einer porösen Oberfläche (12). Diese Ergebnisse sind kontrovers zu diskutieren, da die Forschergruppe in einer vergleichbaren Studie zu weniger eindeutigen Ergebnissen kommt, wonach auch kreuzvernetzte Matrices ebenfalls eine schnelle Vaskularisation innerhalb der ersten 2 Wochen induzieren können, ohne gleichzeitig einem frühen Abbau durch den Körper zu unterliegen. Diese Effekte sind jedoch nach dem vollständigen Abbau der Membran nicht mehr nachweisbar, was wiederum einen schnellen Abbau wichtiger machen würde (357).

Die Größe der Poren in der Kollagenmatrix scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Vaskularisation der Matrix zu haben. Es zeigt sich in einem Modell zur Regeneration von Knochengewebe mit einer Matrix aus Hydroxyapatit, dass die optimale Porengröße bei 300-400  $\mu\text{m}$  liegt. Hierbei wächst nur ein Gefäß pro Pore und das Knochenwachstum entlang des Gefäßes scheint im Vergleich zu den anderen Porengrößen physiologischer abzulaufen (358). In der Rückenhautkammer von Mäusen wurde in den ersten 8-12 Tagen eine bessere Angiogenese bei einer Porengröße von 250-300  $\mu\text{m}$  festgestellt (359). Demgegenüber weisen die Ergebnisse einer anderen Forschungsgruppe für osteogene Vorgängerzellen der Ratte auf eine bessere Zelladhäsion bei einer deutlich kleineren Porengröße einer Kollagen-Glykosaminoglykan-Matrix von etwa 90  $\mu\text{m}$  hin. Mit zunehmender Größe zeigte sich gleichzeitig eine geringere Adhäsion (360). Zeltinger et al. konnten hingegen keine Präferenz von Fibroblasten für eine bestimmte Porengröße zwischen 38 und 150  $\mu\text{m}$  nachweisen sowie eine bevorzugte Porengröße von <38  $\mu\text{m}$  für mikrovaskuläre Endothelzellen (361). Diese konträren Studienergebnisse müssen durch folgende Studien überprüft werden, um die optimale Morphologie für Kollagenmembranen zur Unterstützung der Angiogenese zu herauszufinden und diese dementsprechend herstellen zu können.

Magnaudeix et al. untersuchen in ihrer Studie den Einfluss der Porenform auf die Angiogenese im CAM-Modell. Hierbei stellen sie fest, dass Formen mit spitzen Winkeln, also etwa Rhomben und Dreiecke, zu einem besseren Einwachsen der Gefäße in die Poren führen (362). Da in den Kollagenmembranen ebenfalls Poren vorhanden sind, die spitze Winkel aufweisen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass mehr dieser Poren zu einer besseren Vaskularisierung führen können. Dieses Wissen könnte darüber

hinaus hilfreich sein für zukünftige Experimente mit künstlich hergestellten Membranen zur Weich- und Knochengewebsregeneration.

Da die *in vitro* und *in vivo* Studienergebnisse nicht eindeutig sind, ist der Blick in die klinische Anwendung wichtig zur Einordnung der Ergebnisse. In einer präklinischen Studie mit Schafen wurden von Dogan et al. Implantate gesetzt und später histologisch untersucht. Hierbei zeigen die vorläufigen Ergebnisse einen verbesserten Knochen-Implantat-Kontakt, der als Messgröße für die Knochengewebsregeneration herangezogen wurde. Es zeigte sich für alle verwendeten Membranen ein besseres Ergebnis als für die Implantation ohne begleitende Membranimplantation und gleichzeitig ein besseres Ergebnis für die kreuzvernetzte Membran als für die nicht kreuzvernetzte Membran. Aufgrund der geringen Fallzahl von  $n=4$  sind die Ergebnisse jedoch nur bedingt aussagekräftig (363). Eine Studie erfolgte am Hund zur GTR im Rahmen des Weichgewebsaufbau am Kieferkamm nach Zahnextraktion. Die Ergebnisse zeigen für alle Zeitpunkte (4, 8 und 26 Wochen nach der chirurgischen Intervention) ein dickeres Weichgewebe in der Gruppe, welche mit der kreuzvernetzten Kollagenmembran behandelt wurde, als in der Kontroll- und der nicht-kreuzvernetzten Kollagenmembrangruppe. Eine statistische Signifikanz zwischen den beiden Kollagenmembrangruppen ließ sich jedoch nur nach 4 Wochen für zwei Messpunkte nachweisen. Für die Messung des nativen Weichgewebes zeigt sich nach 26 Wochen sogar eine leichte Erhöhung in der Gruppe der nicht kreuzvernetzten Kollagenmembran (364). Insgesamt scheinen die Ergebnisse aus den praktischen *in vivo* Studien eher Vorteile im Einsatz von kreuzvernetzten Kollagenmembranen zu sehen, was daran liegen könnte, dass die Tatsache der besseren Stabilität und dadurch des besseren Schutzes vor einwandernden Zellen in der Praxis wichtiger ist als eine schnelle Vaskularisierung der Kollagenmembran. Trotzdem gilt es im Hinterkopf zu behalten, dass die durchgeführten Studien an Tieren stattfanden und damit nur eine Annäherung an die Situation in der humanen Mundhöhle darstellen. Gleichzeitig handelte es sich um kleine Studien und der Aspekt der besseren Biokompatibilität der nicht kreuzvernetzten Kollagenmembranen wurde trotz seiner hohen klinischen Relevanz nicht explizit untersucht. Die Übersichtsarbeit von Al-Maawi et al. fasst die Immunantwort auf verschiedene Biomaterialien zusammen, u.a. auch von Kollagenmembranen und gibt hiermit Antwort auf die unterschiedliche Biokompatibilität. Es wird impliziert, dass nicht-kreuzvernetzte Kollagenmembranen vor allem nicht-inflammatorische M2-Makrophagen induziert, wohingegen eine Kreuzvernetzung der Membranen eher zu der Ausbildung des proinflammatorischen M1 Phänotypen führt (365).

Die Übersichtsarbeit von García et al. aus dem Jahr 2017 kommt ebenfalls zu dem Schluss, dass keine Unterschiede im Knochengewebsaufbau zwischen dem Einsatz von kreuzvernetzten und nicht kreuzvernetzten Kollagenmembranen auszumachen sind. Es wurden zehn Studien in die Übersichtsarbeit mit aufgenommen, von denen neun randomisierten kontrollierten Studien entsprachen. Ein Kritikpunkt der Autoren war die geringe Fallzahlen der Studien, weshalb die jeweiligen Ergebnisse nur bedingte Aussagekraft besitzen. Die Komplikationsrate war, über die Studien gesehen, leicht niedriger bei den nicht-kreuzvernetzten Membranen, jedoch konnte auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden (89).

Die vorliegende Studie kann aufgrund ihrer Anlage nur eine bedingte Aussage zu den unterschiedlichen angiogenen Eigenschaften der Kollagenmembranen machen. Eine histologische Untersuchung der Kollagenmembranen hätte die Frage nach der unterschiedlichen Vaskularisierung beantworten können. Da allerdings in den gefärbten Kollagenmembranen keine Gefäße beobachtet werden konnten, wurde auf eine weitere Färbung der Membranen verzichtet und nur die YSM als Nachweis der Angiogenese untersucht. Die Versuche anderer Forschungsgruppen zu diesem Thema bedienten sich jedoch anderer Versuchsmodelle, die einen längeren Beobachtungszeitraum ermöglichen (vgl. die Studien von Rothamel et al. zu diesem Thema (12, 60, 357)). Vermutlich kam es in der vorliegenden Studie nach 24h noch zu keiner relevanten Vaskularisierung der Kollagenmembranen.

## **5.5 Bioaktivierte Kollagenmatrices und ihre Rolle in der regenerativen rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie**

Gerade im Rahmen der GTR und GBR tritt die Verwendung von bioaktivierten Kollagenmatrices mit zahlreichen anderen Verfahren in Konkurrenz, die sich teilweise bereits in der klinischen Anwendung etabliert haben.

Im Falle der GBR ist sowohl der alleinige Einsatz von Kollagenmembranen als auch die Kombination mit Knochenersatzmaterialien (366, 367), EMD (368, 369) oder PRF (370, 371) möglich. In der Übersichtsarbeit von Wessing et al. von 2017 wird in 20 Studien (17 RCT und 3 prospektiven Studien) der Einfluss von Kollagenmembranen und verschiedenen Knochenersatzmaterialien beleuchtet. Hierbei kommen die Forscher zu dem Ergebnis, dass die Kopplung von Knochenersatzmaterialien und Kollagenmembranen im Rahmen der GBR eine effektive Methode zur Augmentation des

Alveolarkamms ist und ein simultanes Einsetzen des Implantates keine Nachteile im Implantatüberleben darstellt. Darüber hinaus konnte für kreuzvernetzte Membranen eine um 30% höhere Komplikationsrate im Vergleich zu nicht-kreuzvernetzten Kollagenmembranen beobachtet werden, welche jedoch nicht statistisch signifikant war. Eine weitere wichtige Aussage der Übersichtsarbeit ist, dass die Fixation der Kollagenmembran, wenn auch nicht statistisch signifikant, zu einer besseren Knochenregeneration führt. Dies wird mit dem besseren Schutz durch einwandernde Zellen und mit der Fixation des Knochenersatzmaterials an der gewünschten Stelle begründet (372). Hier deutet sich eine Chance an, welche sich durch die Kopplung des PRF und der Kollagenmembran ergibt. In diesem Falle kann das PRF präzise platziert und fixiert werden, was ohne die Kollagenmembran nicht möglich wäre.

Die Übersichtsarbeit von Sanz-Sánchez et al. kommt zu ähnlichen Ergebnissen. Nur wird zusätzlich noch der Einfluss von autologem Knochen untersucht. Hierfür wurden in den eingeschlossenen Studien meist Knochenblöcke verwendet, das Outcome wurde jedoch durch den Zusatz von xenogenem Knochenmaterial verbessert. Des Weiteren bestätigen die Daten, dass die Verwendung von einer Okklusionsmembran die Knochenregeneration signifikant steigert. Da der Beobachtungszeitraum der meisten inbegriffenen Studien lediglich ein Jahr beträgt werden Komplikationen wie Gingivitis und Periimplantitis kaum beobachtet. Hierfür müsste das Follow-up deutlich länger gewählt werden (373).

In einer Studie, die an Hunden durchgeführt wurde, untersuchten Schmitt et al. nach 10 Monaten histologisch und immunhistologisch die Gingiva nach Implantation von Kollagenmembranen. Es zeigte sich für die Verwendung eines subepithelialen autologen Bindegewebestransplantat eine höhere Dicke des Bindegewebes als bei der Verwendung einer Kollagenmatrix. Verwendet wurde eine dreidimensionale nicht kreuzvernetzte porcine Kollagenmatrix (Mucoderm). Für die Dicke des Alveolarknochens, des oralen Epithels und des Parodontalligaments zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Außerdem unterschieden sich die Gruppen nicht für die VEGF-Konzentration im Gewebe sowie die Kollagen-I-Expression und die Qualität des Bindegewebes (374). Jankovic et al. vergleichen das autologe Bindegewebestransplantat bei gingivaler Rezession mit dem Einsatz von PRF. Hierbei finden sich sowohl nach einer als auch nach zwei Wochen statistisch signifikante Verbesserungen beim Heilungsindex, welcher sich aus verschiedenen Parametern wie Rötung, Blutung und Vorhandensein von Granulationsgewebe zusammensetzt. Auch die gemessene Schmerzintensität war innerhalb der ersten Woche signifikant niedriger in der PRF-Gruppe. Nach sechs

Monaten waren jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen (375). Im Zusammenhang mit gingivaler Rezession zeigen sowohl PRF als auch die Kollagenmembranen vergleichbare Ergebnisse zu den etablierten Verfahren wie etwa autologe Bindegewebstransplantate. In der randomisierten kontrollierten Studie von Sharma et al. von 2019 wird bei gingivaler Rezession eine Kollagenmatrix mit dem Einsatz von PRF verglichen. Die Forschungsgruppe kommt zu dem Ergebnis, dass der Einsatz beider Verfahren zu einer signifikant verbesserten Heilung führt, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede in Blutungen, Dicke der Gingiva und Schmerz zwischen beiden Gruppen detektiert werden. Durch die PRF kam es lediglich zu einer etwas schnelleren Heilung zu Beginn des Prozesses (376). Kulkarni et al. beschreiben in ihrer Fallserie die Behandlung der Stelle der entnommenen autologen freien Gingivatransplantate, da es hier häufig zu Problemen der Wundheilung kommt. Hierbei zeigte sich, dass sich sowohl die Heilung durch den Einsatz von PRF verbessern lässt als auch eine Schmerzreduktion damit zu erreichen ist (377). All diese Studien demonstrieren für die Weichgewebsregeneration und GTR Vorteile durch die Nutzung von PRF und Kollagenmembranen.

Ein zu dem Versuch der Bioaktivierung der Kollagenmembranen in der vorliegenden Studie ähnlicher Versuch wurde durch Al-Maawi et al. 2019 unternommen. Hierbei handelte es sich jedoch um liquid-PRF und nicht das A-PRF+. Sie untersuchten, inwiefern die verschiedenen Kollagenmembranen das liquid-PRF aufnehmen können. Hierbei wurden fünf verschiedene Kollagenmembranen porcinen Ursprungs untersucht. Es zeigten sich für alle fünf unterschiedliche Aufnahmefähigkeiten des liquid-PRF. Dies wird durch die unterschiedliche Morphologie begründet, so zeigte die Mucograft®-Kollagenmembran in der histologischen Untersuchung eine komplette Durchsetzung mit Leukozyten und Thrombozyten. Die anderen untersuchten Membranen, unter denen auch die Collprotect-Membran und die Mucoderm-Membran waren, zeigten nur eine teilweise bis oberflächliche Aufnahme der o.g. Blutzellen. Bei den Versuchen zur Aufnahme von Wasser und liquid-PRF durch Messung der Gewichtsänderung zeigte sich ebenfalls für die Mucograft-Membran die höchste Gewichtszunahme und damit Aufnahmekapazität. Zwischen den anderen Membranen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (50). Diese Studie zeigt, dass die Auswahl der richtigen Kollagenmembran für die Kopplung mit dem PRF von entscheidender Bedeutung ist. Deshalb ist der Vergleich zwischen verschiedenen Kollagenmembranen auch weiterhin in Versuchen anzustreben und eminent wichtig, um durch Bioaktivierung ein optimales klinisches Ergebnis zu erzielen.

Aufgrund der guten proangiogenen Eigenschaften des PRF gibt es nicht nur Studien zur Kopplung mit Kollagenmembranen, sondern auch mit Knochenersatzmaterialien. Blatt et al. untersuchen in ihrer aktuellen Studie von 2021 den Einfluss von liquid-PRF im Zusammenhang mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien auf das angiogene Potenzial. Es zeigt sich, dass die Bioaktivierung der Knochenersatzmaterialien zu einer verminderten Freisetzung von Wachstumsfaktoren (VEGF und TGF- $\beta$ ) und einer verminderten Anzahl an Gefäßen gegenüber dem alleinigen Einsatz von PRF führt (378). Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals die Wichtigkeit von Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen PRF und dem anderen Material. Dies gilt sowohl für Knochenersatzmaterialien als auch für Kollagenmembranen.

Eine alternative Methode zur Bioaktivierung von Kollagenmembranen und Knochenersatzmaterialien mittels PRF stellt das EMD dar. Es kommt u.a. in der Behandlung von gingivaler Rezession, Periimplantitis und parodontalen Defekten zum Einsatz. Jankovic et al. untersuchten 2010 in einer randomisierten kontrollierten Studie die Heilung durch PRF und EMD von gingivaler Rezession gepaart mit einem koronalen Verschiebelappen. Hierbei zeigte sich für keine der beiden Methoden ein eindeutiger statistisch signifikanter Vorteil. Die Gruppe mit dem EMD führte zu einer vergrößerten Breite des koronalen keratinisierten Gewebes nach 12 Monaten und in der PRF-Gruppe ließ sich in den ersten 5 Tagen ein vermindertes Schmerzlevel nachweisen (379). Miron et al. kommen in ihrer Arbeit von 2020 zu dem Schluss, dass der Einsatz von PRF nicht besser ist als der Einsatz von anderen Biomaterialien wie EMD und Amnionmembranen. Die Autoren bemängeln vor allem die schlechte Studienlage durch wenige RCTs und die nicht näher bezeichneten chirurgischen Verfahren in den Studien, die ebenfalls zu unterschiedlichen Outcomes führen können (380). Im Tiermodell ließ sich ebenfalls eine positive Auswirkung auf die Heilung des EMD bei gingivaler Rezession nachweisen. Hier zeigte sich auch im Zusammenspiel mit einer porcinen Kollagenmembran ein besseres Heilungsvermögen (368).

Des Weiteren ist das EMD auch im Zusammenhang mit Parodontaldefekten eine Behandlungsmöglichkeit, die vielversprechende Ergebnisse liefert. Heijl et al. zeigten bereits 1997 in ihrer klinischen Placebo-kontrollierten Studie, dass EMD zu signifikant verbesserten Heilungen des Knochens bei parodontalen Defekten führt. Es konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 36 Monaten radiologisch eine Vermehrung der Knochendicke beobachtet werden (381). Die Übersichtsarbeit von Zhou et al. aus dem Jahr 2018 untersuchte verschiedene klinische Studien zu der Behandlung parodontaler Knochendefekte. Bei einem Vergleich von PRP, PRF und EMD konnten lediglich für

PRP und PRF positive Effekte auf den Heilungsprozess beobachtet werden, wohingegen die eingeschlossenen Studien für EMD keine verbesserte Heilung zeigten. Zhou et al. kommen zu dem Schluss, dass PRF vor allem die Heilung von Weichgewebe induziert, dies war aus den signifikanten Verbesserungen der Taschentiefe und des klinischen Attachments ersichtlich. Dagegen verbesserte PRP als einziges untersuchtes Biomaterial die Regeneration des Knochengewebes signifikant (382). Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu vielen Studien aus der Implantologie, in denen auch für das PRF eine verbesserte Knochenregeneration nachgewiesen wurde (383-386). Ebenso wird im Review von Castro et al. dem PRF ein positiver Effekt auf die Regeneration von Knochengewebe, zusätzlich zu der verbesserten Heilung von Weichgewebe, zugeschrieben (387).

Ein Problem der A-PRF-Technik wird in der aktuellen Studie von Tsujino et al. diskutiert. Die Forscher wiesen in der A-PRF-Membran Siliziumoxidmikropartikel nach, welche sich aus der Beschichtung der PRF-Röhrchen, vermutlich während des Zentrifugationsprozesses, lösen. Tsujino et al. stellen die Hypothese auf, dass die Mikropartikel zu einer zytotoxischen Wirkung nach Implantation führen können (388). In einer anschließenden Arbeit untersuchte die Forschergruppe die zytotoxische Wirkung der entdeckten Mikropartikel. Hierbei konnten sie zytotoxische Effekte auf humane Periostzellen nachweisen, auch wenn die Konzentration des eingesetzten Siliziumoxides nicht auf das Niveau in einem A-PRF angepasst wurde (389). Im Rahmen anschließender Studien ist es zu klären, inwiefern der zytotoxische Effekt der Mikropartikel auch in applizierten A-PRF-Membranen zu beobachten ist und ob es andere Beschichtungsmöglichkeiten gibt. In der vorliegenden Studie wurden Glasröhrchen verwendet, welche ohne entsprechende Beschichtung auskommen. Die Unterschiede in den verwendeten PRF-Röhrchen können ebenfalls zu Fehlern in Studien zur Wirksamkeit von PRF-Produkten führen und machen damit eine Vergleichbarkeit vieler Studien schwieriger.

Ein weiteres eklatantes Problem in der Forschung mit PRF ist die dürftige Studienlage. Es werden zwar viele Arbeiten zu dem Thema verfasst, sowohl in vitro als auch in vivo und im klinischen Umfeld, allerdings werden nur sehr wenige randomisierte kontrollierte Studien veröffentlicht, die ein ausreichendes Evidenzlevel garantieren. Zu diesem Schluss kommen auch Ghanaati et al. in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2018, welche zwar 38 Studien mit ausreichendem Evidenzlevel aufzählt, jedoch umfassen diese verschiedene Indikationen und Krankheitsbilder, zeigen also eine hohe Heterogenität. Außerdem sind auch hier die unterschiedlichen PRF-Herstellungen ein

---

Thema, was von den Autoren als mögliche Fehlerquelle hervorgehoben wird (390). Dies macht den Vergleich der PRF als Möglichkeit der Bioaktivierung schwierig zu anderen Biomaterialien wie zum Beispiel dem EMD.

## 5.6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie sollte eine Möglichkeit zur Regeneration von Weich- und Knochengewebe für die klinische Anwendung *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurden Kollagenmatrices mit A-PRF+-Membranen gekoppelt und biologisiert. Da die Regeneration von Knochen- und Weichgewebe für viele Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich von essentieller Wichtigkeit ist, ist es evident, neue rekonstruktive Verfahren in diesem medizinischen Feld zu entwickeln, die den besonderen Gegebenheiten gerecht werden können. Hierbei ist die Verwendung von Kollagenmatrices schon lange Zeit ein zentraler Aspekt der Behandlung verschiedener Krankheitsbilder, wie parodontaler Defekte, Zahnimplantationen, damit einhergehender periimplantärer Entzündungen, gingivaler Rezession und der Behandlung von Wundhöhen nach Zahnextraktionen. Seit den 2000er Jahren ist auch das PRF auf diesen Gebieten eine etablierte Behandlungsmöglichkeit. Da die Gewebsregeneration sehr stark von einer ausreichenden Vaskularisierung durch Angiogenese abhängig ist, wurde in der vorliegenden Studie der Fokus auf die Messung der Angiogenese gelegt. Die Zusammenführung dieser beiden Verfahren soll die okklusive Wirkung der Kollagenmatrices mit dem regenerativen Potenzial des PRF verbinden. Gleichzeitig müssen bei der Kopplung und Verbindung verschiedener Behandlungsmethoden immer Interaktionen bedacht werden, in diesem Falle ging es vor allem um die Wachstumsfaktoren aus dem PRF und dem Kollagen der Matrices.

In den ELISA-Versuchen fiel auf, dass sich durch die Bioaktivierung die Freisetzung von VEGF und TGF- $\beta$  aus den Kollagenmembranen signifikant steigern ließ. Gleichzeitig zeigte sich kein signifikanter Nachteil zu dem alleinigen PRF. In dem Vergleich zu anderen Studien zeigten sich jedoch verminderte Wachstumsfaktorenlevel mit einer veränderten Freisetzungsdynamik, was die Vermutung zulässt, dass es zu einer Interaktion mit dem Kollagen der Matrices kommt. Der Charakter der Interaktion muss durch folgende Studien untersucht werden. Des Weiteren zeigte sich zwischen den verschiedenen verwendeten Kollagenmatrices kein Unterschied in der Freisetzung der Wachstumsfaktoren.

Die angeschlossenen *in vivo* Versuche an Hühnerembryonen im YSM- und CAM-Modell sollten der Validierung der *in vitro* erzeugten Ergebnisse dienen. Hierbei zeigte sich ebenfalls für die biologisierten Membranen eine signifikante Steigerung der Angiogenese im Vergleich zu den nativen Kollagenmembranen. Interessant war auch die Beobachtung, dass es durch die Auflage der nativen Kollagenmembranen teilweise zu

einer Inhibition der Angiogenese kam, was vermutlich durch den erhöhten Druck auf die CAM zu erklären ist. Die Ergebnisse waren in YSM und CAM größtenteils stringent, es zeigten sich nur für wenige Versuche Unterschiede zwischen den verwendeten biologisierten Kollagenmatrices, was nicht den Schluss auf die bessere Eignung einer der Matrices für das Verfahren zuließ. Allerdings war auch hier die vorliegende Studie lediglich der Wegbereiter für weitere Studien auf diesem Feld, welche sich auf Säugetiere und größere Organismen konzentrieren müssen, um eine bessere Vergleichbarkeit für den klinischen Gebrauch zu ermöglichen. Dieser Weg der klinischen Forschung steht in Übereinstimmung mit dem 3R-Prinzip zum Tierschutz in der klinischen Forschung.

Die angeschlossenen histologischen und immunhistologischen Versuche zur Validierung der Angiogenese in der YSM konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigen. Sowohl die HE-, als auch die CD105- und die  $\alpha$ -SMA-Färbungen zeigen eine stärkere Vaskularisierung in den YSMs, welche mit biologisierten Kollagenmatrices behandelt wurden. Es ergaben sich ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen verwendeten Kollagenmatrices. Dies war jedoch auch nach der vorherigen Auszählung unter dem Mikroskop nicht zu erwarten.

Insgesamt ist die vorliegende Studie ein wichtiger Beitrag auf dem Weg zur Erweiterung und Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten verschiedener oraler Erkrankungen. Gleichzeitig muss hervorgehoben werden, dass, aufgrund des experimentellen Charakters der Arbeit, weitere Studien zu dem Thema durchgeführt werden müssen, um den Mehrwert biologisierter Kollagenmatrices in der klinischen Anwendung genau bestimmen und mit anderen Heilverfahren vergleichen zu können.

**Literaturverzeichnis**

1. Edgar L, Pu T, Porter B, Aziz JM, La Pointe C, Asthana A, et al. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *British Journal of Surgery*. 2020;107(7):793-800.
2. Lanza R. Regenerative medicine: the last 10 years. *Regenerative Medicine*. 2016;11(8):745-6.
3. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*. 2008;3(1):1-5.
4. Brouwer KM, Lundvig DMS, Middelkoop E, Wagener FADTG, Von den Hoff JW. Mechanical cues in orofacial tissue engineering and regenerative medicine. *Wound Repair and Regeneration*. 2015;23(3):302-11.
5. Larsson L, Decker AM, Nibali L, Pilipchuk SP, Berglundh T, Giannobile WV. Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases. *Journal of dental research*. 2016;95(3):255-66.
6. Ciccocioppo R, Cantore A, Chaimov D, Orlando G. Regenerative medicine: the red planet for clinicians. *Internal and Emergency Medicine*. 2019;14(6):911-21.
7. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2011;2(1):403-30.
8. Gianni-Barrera R, Di Maggio N, Melly L, Burger MG, Mujagic E, Gürke L, et al. Therapeutic vascularization in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(4):433-44.
9. Aprile P, Letourneur D, Simon-Yarza T. Membranes for Guided Bone Regeneration: A Road from Bench to Bedside. *Advanced Healthcare Materials*. 2020;9(19):2000707.
10. Maurer T, Stoffel MH, Belyaev Y, Stiefel NG, Vidondo B, Küker S, et al. Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205027.
11. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
12. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clinical oral implants research*. 2005;16(3):369-78.
13. Smirani R, Rémy M, Devillard R, Naveau A. Engineered Prevascularization for Oral Tissue Grafting: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020;26(4):383-98.
14. Amrollahi P, Shah B, Seifi A, Tayebi L. Recent advancements in regenerative dentistry: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;69:1383-90.
15. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim H-W, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. *Journal of Dentistry*. 2014;42(8):915-28.
16. Bulsara VM, Worthington HV, Glenny A-M, Clarkson JE, Conway DI, Macluskey M. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;12(12):CD006205-CD.
17. Eguia A, Bagán-Debón L, Cardona F. Review and update on drugs related to the development of osteonecrosis of the jaw. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2020;25(1):e71-e83.
18. Khan A. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Can Fam Physician*. 2008;54(7):1019-21.

19. Taylor KH, Middlefell LS, Mizen KD. Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2010;48(3):221-3.
20. Van Poznak C. Osteonecrosis of the jaw and bevacizumab therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(1):189-91.
21. Brunello A, Saia G, Bedogni A, Scaglione D, Basso U. Worsening of osteonecrosis of the jaw during treatment with sunitinib in a patient with metastatic renal cell carcinoma. *Bone*. 2009;44(1):173-5.
22. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical oral investigations*. 2017;21(6):1913-27.
23. Ustaoglu G, Uğur Aydın Z, Özelçi F. Comparison of GTR, T-PRF and open-flap debridement in the treatment of intrabony defects with endo-perio lesions: a randomized controlled trial. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2020;25(1):e117-e23.
24. Li Q, Pan S, Dangaria SJ, Gopinathan G, Kolokythas A, Chu S, et al. Platelet-Rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Augmentation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:638043.
25. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(2):225-34.
26. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):299-303.
27. Kao RT, Conte G, Nishimine D, Dault S. Tissue engineering for periodontal regeneration. *Journal of the California Dental Association*. 2005;33(3):205-15.
28. Melcher AH. On the Repair Potential of Periodontal Tissues. *Journal of periodontology*. 1976;47(5):256-60.
29. McCulloch CA. Tony Melcher's Contributions to the Regeneration of the Periodontium. *Journal of Dental Research*. 1999;78(7):1292-7.
30. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease\*. *Periodontology 2000*. 2006;40(1):11-28.
31. Zippel N, Schulze M, Tobiasch E. Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Recent patents on biotechnology*. 2010;4(1):1-22.
32. Matichescu A, Ardelean LC, Rusu L-C, Craciun D, Bratu EA, Babucea M, et al. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration-A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2020;13(22):5303.
33. Baranova J, Büchner D, Götz W, Schulze M, Tobiasch E. Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate? *International journal of molecular sciences*. 2020;21(11):4031.
34. Witzler M, Alzagameem A, Bergs M, Khaldi-Hansen BE, Klein SE, Hielscher D, et al. Lignin-Derived Biomaterials for Drug Release and Tissue Engineering. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018;23(8).
35. Ottensmeyer PF, Witzler M, Schulze M, Tobiasch E. Small Molecules Enhance Scaffold-Based Bone Grafts via Purinergic Receptor Signaling in Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
36. Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, O'Doherty E, et al. Engineered vascularized bone grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(8):3311.

37. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.* 2006;12(8):2093-104.
38. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med.* 1973;138(4):745-53.
39. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer.* 1955;9(4):539-49.
40. Ren L, Ma D, Liu B, Li J, Chen J, Yang D, et al. Preparation of Three-Dimensional Vascularized MSC Cell Sheet Constructs for Tissue Regeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:301279.
41. Dissanayaka WL, Zhu L, Hargreaves KM, Jin L, Zhang C. Scaffold-free Prevascularized Microtissue Spheroids for Pulp Regeneration. *J Dent Res.* 2014;93(12):1296-303.
42. Bae YK, Kim GH, Lee JC, Seo BM, Joo KM, Lee G, et al. The Significance of SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 Axis in *in vivo* Angiogenic Ability of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Molecules and cells.* 2017;40(6):386-92.
43. Lee J, Shin D, Roh JL. Promotion of skin wound healing using prevascularized oral mucosal cell sheet. *Head & neck.* 2019;41(3):774-9.
44. Brown BN, Badylak SF. Chapter 25 - The Role of the Host Immune Response in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press; 2014. p. 497-509.
45. Fiorillo L, Cervino G, Galindo-Moreno P, Herford AS, Spagnuolo G, Cicciù M. Growth Factors in Oral Tissue Engineering: New Perspectives and Current Therapeutic Options. *Biomed Res Int.* 2021;2021:8840598-.
46. Bosshardt DD. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? *Journal of Dental Research.* 2005;84(5):390-406.
47. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of Maxillary and Mandibular Bone Defects Using a Membrane Technique: An Experimental Study in Monkeys. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery.* 1990;24(1):13-9.
48. Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain ADH, Wikesjö UME, Nilvúus RE. Regenerative Surgery of Intrabony Periodontal Defects Using ePTFE Barrier Membranes: Scanning Electron Microscopic Evaluation of Retrieved Membranes Versus Clinical Healing. *Journal of periodontology.* 1992;63(12):974-8.
49. Tempro PJ, Nalbandian J. Colonization of Retrieved Polytetrafluoroethylene Membranes: Morphological and Microbiological Observations. *Journal of periodontology.* 1993;64(3):162-8.
50. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaíno C, Orłowska A, Willershausen I, Sader R, Miron RJ, et al. Biologization of Collagen-Based Biomaterials Using Liquid-Platelet-Rich Fibrin: New Insights into Clinically Applicable Tissue Engineering. *Materials (Basel, Switzerland).* 2019;12(23).
51. Blatt S, Burkhardt V, Kämmerer PW, Pabst AM, Sagheb K, Heller M, et al. Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Clinical oral investigations.* 2020;24(10):3425-36.
52. Atieh MA, Alsabeeha N, Tawse-Smith A, Payne AGT. Xenogeneic collagen matrix for periodontal plastic surgery procedures: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontal research.* 2016;51(4):438-52.
53. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *Journal of periodontology.* 2001;72(2):215-29.

54. Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *The International journal of oral & maxillofacial implants.* 1996;11(5):667-78.
55. Kohal RJ, Mellas P, Hürzeler MB, Trejo PM, Morrison E, Caffesse RG. The Effects of Guided Bone Regeneration and Grafting on Implants Placed Into Immediate Extraction Sockets. An Experimental Study in Dogs. *Journal of periodontology.* 1998;69(8):927-37.
56. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2016;14(3):438-48.
57. Petit F, Minns AB, Dubernard J-M, Hettiaratchy S, Lee WPA. Composite tissue allotransplantation and reconstructive surgery: first clinical applications. *Annals of surgery.* 2003;237(1):19-25.
58. Organisation WH. Transplantation.
59. Moussa NT, Dym H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. *Dental clinics of North America.* 2020;64(2):473-90.
60. Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreiseidler T, Ritter L, et al. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *The International journal of oral & maxillofacial implants.* 2012;27(1):146-54.
61. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomedical engineering online.* 2019;18(1):24.
62. Tavelli L, McGuire MK, Zucchelli G, Rasperini G, Feinberg SE, Wang H-L, et al. Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration. *Journal of periodontology.* 2020;91(1):17-25.
63. Pabst AM, Happe A, Callaway A, Ziebart T, Stratul SI, Ackermann M, et al. In vitro and in vivo characterization of porcine acellular dermal matrix for gingival augmentation procedures. *Journal of periodontal research.* 2014;49(3):371-81.
64. Pabst AM, Lehmann K-M, Walter C, Krüger M, Stratul S-I, Kasaj A. Influence of porcine-derived collagen matrix on endothelial progenitor cells: an in vitro study. *Odontology.* 2016;104(1):19-26.
65. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1978;75(2):871-5.
66. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials.* 1997;18(7):535-8.
67. Cooperman L, Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1984;10(4):638-46.
68. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell and tissue research.* 2010;339(1):247-57.
69. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science.* 2007;120(12):1955-8.
70. Bella J. Collagen structure: new tricks from a very old dog. *The Biochemical journal.* 2016;473(8):1001-25.
71. Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene.* 2019;707:151-71.
72. Miranda-Nieves D, Chaikof EL. Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues. *ACS Biomaterials Science & Engineering.* 2017;3(5):694-711.
73. Browne S, Zeugolis DI, Pandit A. Collagen: Finding a Solution for the Source. *Tissue Engineering Part A.* 2012;19(13-14):1491-4.

74. Koide T, Daito M. Effects of various collagen crosslinking techniques on mechanical properties of collagen film. *Dental materials journal*. 1997;16(1):1-9.
75. Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, Van Luyn MJA, Van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995;6(7):429-34.
76. Wess TJ, Orgel JP. Changes in collagen structure: drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration. *Thermochimica Acta*. 2000;365(1):119-28.
77. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(6):1077-86.
78. Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials*. 2003;24(8):1487-97.
79. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol*. 2016;8(4):355-69.
80. Damink LHHO, Dijkstra PJ, Van Luyn MJA, Van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Influence of ethylene oxide gas treatment on the in vitro degradation behavior of dermal sheep collagen. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1995;29(2):149-55.
81. Gorham SD, Srivastava S, French DA, Scott R. The effect of gamma-ray and ethylene oxide sterilization on collagen-based wound-repair materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1993;4(1):40-9.
82. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, et al. Biodegradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide®) applied in a double-layer technique in rats. *Clinical oral implants research*. 2009;20(10):1116-23.
83. Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clinical oral implants research*. 2006;17(4):359-66.
84. von Arx T, Broggini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2005;20(6):843-53.
85. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clinical oral implants research*. 2004;15(4):443-9.
86. KT B, JC K, BA R, DG W, CM M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Implant Dentistry*. 1993;2(2):131.
87. Liu X, Lim JY, Donahue HJ, Dhurjati R, Mastro AM, Vogler EA. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials*. 2007;28(31):4535-50.
88. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. *Frontiers in physiology*. 2019;10:270.
89. García AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res*. 2005;84(5):407-13.
90. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head & face medicine*. 2008;4:22.

91. Speer D, Chvapil M, Eskelson C, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *Journal of biomedical materials research*. 1980;14 6:753-64.
92. Huang-Lee LLH, Cheung DT, Nimni ME. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived crosslinks. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1990;24(9):1185-201.
93. van Luyn MJA, van Wachem PB, Damink LHHO, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P. Secondary cytotoxicity of cross-linked dermal sheep collagens during repeated exposure to human fibroblasts. *Biomaterials*. 1992;13(14):1017-24.
94. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6):653-60.
95. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
96. Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circulation research*. 2009;104(5):576-88.
97. Vogeli KM, Jin S-W, Martin GR, Stainier DYR. A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature*. 2006;443(7109):337-9.
98. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5302):964-7.
99. Mund JA, Ingram DA, Yoder MC, Case J. Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies. *Cytotherapy*. 2009;11(2):103-13.
100. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature medicine*. 2002;8(4):403-9.
101. Liu Z-J, Tian R, An W, Zhuge Y, Li Y, Shao H, et al. Identification of E-selectin as a novel target for the regulation of postnatal neovascularization: implications for diabetic wound healing. *Annals of surgery*. 2010;252(4):625-34.
102. Laschke MW, Giebels C, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Human reproduction update*. 2011;17(5):628-36.
103. Peters BA, Diaz Jr LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nature medicine*. 2005;11:261.
104. Ding YT, Kumar S, Yu DC. The role of endothelial progenitor cells in tumour vasculogenesis. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2008;75(5):265-73.
105. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(6):464-78.
106. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-6.
107. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*. 2003;9(6):685-93.
108. Adair TH. Angiogenesis. In: Montani J-P, editor. [San Rafael, Calif.] :: Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.
109. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6.
110. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular research*. 1977;14(1):53-65.

111. Mazurek R, Dave JM, Chandran RR, Misra A, Sheikh AQ, Greif DM. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Adv Pharmacol.* 2017;78:323-50.
112. Betz C, Lenard A, Belting HG, Affolter M. Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development (Cambridge, England).* 2016;143(13):2249-60.
113. Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical record.* 1986;216(2):154-64.
114. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *The Anatomical record.* 1990;228(1):35-45.
115. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiological reviews.* 2018;98(1):3-58.
116. Shiva Shankar TV, Willems L. Epigenetic modulators mitigate angiogenesis through a complex transcriptomic network. *Vascular pharmacology.* 2014;60(2):57-66.
117. Buysschaert I, Schmidt T, Roncal C, Carmeliet P, Lambrechts D. Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2008;12(6b):2533-51.
118. Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology.* 2012;372(2):157-65.
119. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology.* 2003;161(6):1163-77.
120. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
121. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Current pharmaceutical design.* 2009;15(12):1385-400.
122. Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell adhesion & migration.* 2012;6(6):535-615.
123. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell research.* 1998;8(3):179-86.
124. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids.* 2011;41(2):271-90.
125. Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood.* 2004;103(3):955-62.
126. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nature medicine.* 1999;5(10):1135-42.
127. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 1994;368(6470):419-24.
128. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 1996;85(5):683-93.
129. Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresch DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha v beta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(1):119-24.
130. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013;3(1):a006569.

131. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology*. 2010;12(10):943-53.
132. Tanaka K, Yamaguchi S, Sawano A, Shibuya M. Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1997;88(9):867-76.
133. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376(6535):66-70.
134. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
135. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell*. 2009;16(2):196-208.
136. Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Developmental cell*. 2009;16(2):222-31.
137. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(2):522-7.
138. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008;454:656.
139. Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K. VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(3):761.
140. Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 2007;445:776.
141. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(5):617-25.
142. Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, et al. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Developmental cell*. 2009;16(1):70-82.
143. Sato Y, Watanabe T, Saito D, Takahashi T, Yoshida S, Kohyama J, et al. Notch mediates the segmental specification of angioblasts in somites and their directed migration toward the dorsal aorta in avian embryos. *Developmental cell*. 2008;14(6):890-901.
144. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim C-H, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development (Cambridge, England)*. 2001;128(19):3675-83.
145. Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, Antoine T, Berkenfeld F, Ferrante F, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nature cell biology*. 2017;19(8):915-27.
146. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 2007;445(7129):781-4.
147. Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, et al. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development (Cambridge, England)*. 2011;138(21):4763-76.
148. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(5):639-49.

149. Phng L-K, Stanchi F, Gerhardt H. Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development (Cambridge, England)*. 2013;140(19):4031-40.
150. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(6):446-54.
151. Davis GE, Camarillo CW. An  $\alpha\beta 1$  Integrin-Dependent Pinocytic Mechanism Involving Intracellular Vacuole Formation and Coalescence Regulates Capillary Lumen and Tube Formation in Three-Dimensional Collagen Matrix. *Experimental cell research*. 1996;224(1):39-51.
152. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature*. 1980;288(5791):551-6.
153. Strilić B, Kučera T, Eglinger J, Hughes MR, McNagny KM, Tsukita S, et al. The Molecular Basis of Vascular Lumen Formation in the Developing Mouse Aorta. *Developmental cell*. 2009;17(4):505-15.
154. Blum Y, Belting H-G, Ellertsdottir E, Herwig L, Lüders F, Affolter M. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Developmental biology*. 2008;316(2):312-22.
155. Gebala V, Collins R, Geudens I, Phng L-K, Gerhardt H. Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nature cell biology*. 2016;18:443.
156. Lenard A, Ellertsdottir E, Herwig L, Krudewig A, Sauter L, Belting HG, et al. In vivo analysis reveals a highly stereotypic morphogenetic pathway of vascular anastomosis. *Developmental cell*. 2013;25(5):492-506.
157. Herwig L, Blum Y, Krudewig A, Ellertsdottir E, Lenard A, Belting HG, et al. Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo. *Current biology : CB*. 2011;21(22):1942-8.
158. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*. 2010;116(5):829-40.
159. Nesmith JE, Chappell JC, Cluceru JG, Bautch VL. Blood vessel anastomosis is spatially regulated by Flt1 during angiogenesis. *Development (Cambridge, England)*. 2017;144(5):889-96.
160. Canedo-Dorantes L, Canedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International journal of inflammation*. 2019;2019:3706315.
161. Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN. Tissue Regeneration and Its Link with AngioBoon and Bane of Inflammation in Bone genesis. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(4):354-64.
162. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, Schulz N, Hoff P, Pfaff M, et al. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;8(2):120-30.
163. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res*. 2017;58(1-2):81-94.
164. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res*. 2003;82(8):621-6.
165. DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of leukocyte biology*. 2016;100(5):979-84.
166. Häkkinen L, Uitto V-J, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*. 2000;24(1):127-52.
167. Torres P, Castro M, Reyes M, Torres VA. Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral diseases*. 2018;24(7):1150-60.

168. Gaber T, Haupl T, Sandig G, Tykwinska K, Fangradt M, Tschirschmann M, et al. Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(12):2655-69.
169. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiological reviews*. 2006;86(4):1309-79.
170. Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1993;151(6):3274-82.
171. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci*. 2012;15(8):1063-7.
172. Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, McCulloch J, Uddman R. Calcitonin Gene-Related Peptide and Cerebral Blood Vessels: Distribution and Vasomotor Effects. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1987;7(6):720-8.
173. Saria A. Substance P in sensory nerve fibres contributes to the development of oedema in the rat hind paw after thermal injury. *British journal of pharmacology*. 1984;82(1):217-22.
174. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9060143-.
175. Ruggeri ZM. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation*. 2009;16(1):58-83.
176. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:3532-48.
177. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgereit F, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell and tissue research*. 2012;347(3):567-73.
178. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(9):1133-40.
179. Lee HG, Eun HC. Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: implication to wound healing. *J Dermatol Sci*. 1999;21(3):176-82.
180. Nikoloudaki G, Creber K, Hamilton DW. Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020;318(6):C1065-C77.
181. Engeland CG, Bosch JA, Cacioppo JT, Marucha PT. Mucosal wound healing: the roles of age and sex. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2006;141(12):1193-7; discussion 8.
182. Keswani SG, Balaji S, Le LD, Leung A, Parvadia JK, Frischer J, et al. Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013;21(4):554-62.
183. Azuma N, Katada Y, Kitano S, Sekiguchi M, Kitano M, Nishioka A, et al. Correlation between salivary epidermal growth factor levels and refractory intraoral manifestations in patients with Sjögren's syndrome. *Modern rheumatology*. 2014;24(4):626-32.
184. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science*. 2013;72(3):206-17.
185. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450-62.

186. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37.
187. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(12):4167-71.
188. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T. In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor  $\beta$ 1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *Journal of Molecular Histology*. 2008;39(1):37-47.
189. Igotz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(9):4337-45.
190. Raheja LF, Genetos DC, Wong A, Yellowley CE. Hypoxic regulation of mesenchymal stem cell migration: the role of RhoA and HIF-1 $\alpha$ . *Cell biology international*. 2011;35(10):981-9.
191. Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. *Journal of Cell Science*. 1995;108(3):1251-61.
192. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585-601.
193. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor  $\beta$  inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 2000;1490(3):259-68.
194. Colwell AS, Phan TT, Kong W, Longaker MT, Lorenz PH. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2005;116(5):1387-90; discussion 91-2.
195. Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathologica*. 2015;130(5):605-18.
196. Thakral KK, Goodson WH, Hunt TK. Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. *Journal of Surgical Research*. 1979;26(4):430-6.
197. Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012;120(3):613-25.
198. Boniakowski AE, Kimball AS, Joshi A, Schaller M, Davis FM, denDekker A, et al. Murine macrophage chemokine receptor CCR2 plays a crucial role in macrophage recruitment and regulated inflammation in wound healing. *European journal of immunology*. 2018;48(9):1445-55.
199. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*. 1992;176(5):1375-9.
200. Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, et al. Hypoxia Regulates the Expression of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) and its Receptors in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997;108(3):263-8.

201. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*. 1981;90(2):262-70.
202. Sano H, Ichioka S, Sekiya N. Influence of oxygen on wound healing dynamics: assessment in a novel wound mouse model under a variable oxygen environment. *PLoS One*. 2012;7(11):e50212-e.
203. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(5):630-8.
204. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Biomed Res Int*. 2014;2014:756078-.
205. Cobianchi S, de Cruz J, Navarro X. Assessment of sensory thresholds and nociceptive fiber growth after sciatic nerve injury reveals the differential contribution of collateral reinnervation and nerve regeneration to neuropathic pain. *Experimental Neurology*. 2014;255:1-11.
206. Namikawa K, Okamoto T, Suzuki A, Konishi H, Kiyama H. Pancreatitis-Associated Protein-III Is a Novel Macrophage Chemoattractant Implicated in Nerve Regeneration. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(28):7460-7.
207. Sánchez M, Garate A, Delgado D, Padilla S. Platelet-rich plasma, an adjuvant biological therapy to assist peripheral nerve repair. *Neural Regeneration Research*. 2017;12(1):47-52.
208. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23(1):83-99.
209. Xu P-C, Xuan M, Cheng B. Effects and mechanism of platelet-rich plasma on military drill injury: a review. *Mil Med Res*. 2020;7(1):56-.
210. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une Opportunité en Paro-implantologie Le PRF:(Platelet Rich Fibrin).
211. Dohan DM, Del Corso M, Charrier J-B. Cytotoxicity analyses of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) on a wide range of human cells: The answer to a commercial controversy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;103(5):587-93.
212. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e51-e5.
213. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e37-e44.
214. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e45-e50.
215. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *The Journal of oral implantology*. 2014;40(6):679-89.
216. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low

- speed centrifugation concept). *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society*. 2019;45(3):467-79.
217. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clinical oral investigations*. 2017;21(8):2619-27.
218. Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen*. 2011;19(6):753-66.
219. Chen Y, Niu Z, Xue Y, Yuan F, Fu Y, Bai N. Improvement in the repair of defects in maxillofacial soft tissue in irradiated minipigs by a mixture of adipose-derived stem cells and platelet-rich fibrin. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;52(8):740-5.
220. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e56-e60.
221. Hoaglin DR, Lines GK. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. *International journal of dentistry*. 2013;2013:875380.
222. He Y, Chen J, Huang Y, Pan Q, Nie M. Local Application of Platelet-Rich Fibrin During Lower Third Molar Extraction Improves Treatment Outcomes. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75(12):2497-506.
223. Pan J, Xu Q, Hou J, Wu Y, Liu Y, Li R, et al. Effect of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation: A systematic review. *The Journal of the American Dental Association*. 2019;150(9):766-78.
224. Ozcan M, Ucak O, Alkaya B, Keceli S, Seydaoglu G, Haytac MC. Effects of Platelet-Rich Fibrin on Palatal Wound Healing After Free Gingival Graft Harvesting: A Comparative Randomized Controlled Clinical Trial. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2017;37(5):e270-e8.
225. Jain V, Triveni M, Tarun Kumar A, Mehta D. Role of platelet-rich-fibrin in enhancing palatal wound healing after free graft. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2012;3(6):240-3.
226. Shah M, Patel J, Dave D, Shah S. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin with demineralized freeze-dried bone allograft in periodontal infrabony defects: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2015;19(1):56-60.
227. Sclafani AP. Safety, efficacy, and utility of platelet-rich fibrin matrix in facial plastic surgery. *Arch Facial Plast Surg*. 2011;13(4):247-51.
228. Hassan H, Quinlan DJ, Ghanem A. Injectable platelet-rich fibrin for facial rejuvenation: A prospective, single-center study. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2020;19(12):3213-21.
229. Yu P, Zhai Z, Jin X, Yang X, Qi Z. Clinical Application of Platelet-Rich Fibrin in Plastic and Reconstructive Surgery: A Systematic Review. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2018;42(2):511-9.
230. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets*. 2018;29(5):468-75.
231. O'Connell SM, Impeduglia T, Hessler K, Wang X-J, Carroll RJ, Dardik H. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(6):749-56.

232. Soyer T, Çakmak M, Aslan MK, Şenyücel MF, Kisa Ü. Use of autologous platelet rich fibrin in urethracutaneous fistula repair: preliminary report. *International wound journal*. 2013;10(3):345-7.
233. Guinot A, Arnaud A, Azzis O, Habonimana E, Jasienski S, Frémond B. Preliminary experience with the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane for urethroplasty coverage in distal hypospadias surgery. *Journal of Pediatric Urology*. 2014;10(2):300-5.
234. Kumar RD. Application of Platelet Rich Fibrin Matrix to Repair Traumatic Tympanic Membrane Perforations: A Pilot Study. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;71(Suppl 2):1126-34.
235. Gode S, Ozturk A, Kısmalı E, Berber V, Turhal G. The Effect of Platelet-Rich Fibrin on Nasal Skin Thickness in Rhinoplasty. *Facial plastic surgery : FPS*. 2019;35(4):400-3.
236. Eid AM, Ebada HA, El-Fattah AMA, Tawfik A. Platelet-rich fibrin: an autologous biomaterial for healing assistance of pharyngeal repair in total laryngectomy. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2020.
237. Lind M. Growth factors: Possible new clinical tools: A review. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1996;67(4):407-17.
238. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1991;9(5):641-50.
239. Fiedler J, Etzel N, Brenner RE. To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *Journal of cellular biochemistry*. 2004;93(5):990-8.
240. Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, Laufer D, Livne E. Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF- $\beta$  and IGF-1. *Experimental Gerontology*. 2002;37(4):553-65.
241. Zimmermann G, Henle P, Küsswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Richter W, et al. TGF- $\beta$ 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone*. 2005;36(5):779-85.
242. Hara Y, Ghazizadeh M, Shimizu H, Matsumoto H, Saito N, Yagi T, et al. Delayed Expression of Circulating TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 Levels in Human Nonunion Long Bone Fracture Healing. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*. 2017;84(1):12-8.
243. Lepisto J, Peltonen J, Vahakreula M, Niinikoski J, Laato M. Platelet-Derived Growth Factor Isoforms PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB Exert Specific Effects on Collagen Gene Expression and Mitotic Activity of Cultured Human Wound Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;209(2):393-9.
244. Hammacher A, Hellman U, Johnsson A, Ostman A, Gunnarsson K, Westermark B, et al. A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(31):16493-8.
245. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(15):9656-61.
246. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Günther KP, Dehio C, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*. 2002;30(3):472-7.
247. Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin

- preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *International journal of implant dentistry*. 2015;1(1):31-.
248. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1995;1(12):1623-34.
249. AG S. Staumann Biomaterialien 2020 [Available from: [https://www.staumann.com/content/dam/media-center/staumann/de-de/documents/catalog/product-catalog/straumann\\_de490561\\_biomaterials\\_produktkatalog.pdf](https://www.staumann.com/content/dam/media-center/staumann/de-de/documents/catalog/product-catalog/straumann_de490561_biomaterials_produktkatalog.pdf)].
250. Stähli A, Miron RJ, Bosshardt DD, Sculean A, Gruber R. Collagen Membranes Adsorb the Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor I Kinase-Dependent Activity of Enamel Matrix Derivative. *Journal of periodontology*. 2016;87(5):583-90.
251. Taylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*. 1982;297(5864):307-12.
252. Rosenbruch M. Granulation tissue in the chick embryo yolk sac blood vessel system. *Journal of Comparative Pathology*. 1989;101(4):363-73.
253. Bentley JP, Hunt TK, Weiss JB, Taylor CM, Hanson AN, Davies GH, et al. Peptides from live yeast cell derivative stimulate wound healing. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1990;125(5):641-6.
254. Peifer C, Dannhardt G. A novel quantitative chick embryo assay as an angiogenesis model using digital image analysis. *Anticancer research*. 2004;24(3a):1545-51.
255. Yadgary L, Wong EA, Uni Z. Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. *BMC genomics*. 2014;15(1):690.
256. Mobbs IG, McMillan DB. Transport across endodermal cells of the chick yolk sac during early stages of development. *American Journal of Anatomy*. 1981;160(3):285-308.
257. Bauer R, Plieschnig JA, Finkes T, Riegler B, Hermann M, Schneider WJ. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(2):1088-98.
258. Sheng G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(6-7):1033-43.
259. JC M. Angiogenesis protocols. *Methods in molecular medicine*. . New Jersey: Humana Press. 2001:107-29.
260. Noble RC, Cocchi M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Progress in Lipid Research*. 1990;29(2):107-40.
261. Sheng G, Foley AC. Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1271(1):97-103.
262. Li D, Xie S, Ren Y, Huo L, Gao J, Cui D, et al. Microtubule-associated deacetylase HDAC6 promotes angiogenesis by regulating cell migration in an EB1-dependent manner. *Protein & cell*. 2011;2(2):150-60.
263. Liu M, Xie S, Zhou J. Use of animal models for the imaging and quantification of angiogenesis. *Experimental animals*. 2018;67(1):1-6.
264. Rous PMDaM, James B. TUMOR IMPLANTATIONS IN THE DEVELOPING EMBRYO. *Journal of the American Medical Association*. 1911;LVI(10):741-2.
265. Murphy JB. TRANSPLANTABILITY OF TISSUES TO THE EMBRYO OF FOREIGN SPECIES : ITS BEARING ON QUESTIONS OF TISSUE SPECIFICITY AND TUMOR IMMUNITY. *J Exp Med*. 1913;17(4):482-93.

266. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2018;21(3):425-532.
267. Ribatti D. The first evidence of the tumor-induced angiogenesis in vivo by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia*. 2004;18(8):1350-1.
268. Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Developmental biology*. 1974;41(2):391-4.
269. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. *Developmental biology*. 1974;38(2):237-48.
270. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(3):588-612.
271. Yuan W, Su C, Yang X, Li Y, Cao Y, Liang X, et al. Biological and anti-vascular activity evaluation of ethoxy-erianin phosphate as a vascular disrupting agent. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(10):16978-89.
272. Zhou Q, Qi CL, Li Y, He XD, Li JC, Zhang QQ, et al. A novel four-step system for screening angiogenesis inhibitors. *Molecular medicine reports*. 2013;8(6):1734-40.
273. Bansode PA, Patil PV, Birajdar AR, Somasundaram I, Bachute MT, Rashinkar GS. Anticancer, Antioxidant and Antiangiogenic Activities of Nanoparticles of Bioactive Dietary Nutraceuticals. *ChemistrySelect*. 2019;4(47):13792-6.
274. DeFouw DO, Rizzo VJ, Steinfeld R, Feinberg RN. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvascular research*. 1989;38(2):136-47.
275. Rahn H, Paganelli CV, Ar A. The avian egg: air-cell gas tension, metabolism and incubation time. *Respiration Physiology*. 1974;22(3):297-309.
276. Huang W, Arai F, Kawahara T. Egg-in-cube: design and fabrication of a novel artificial eggshell with functionalized surface. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118624.
277. Huang W, Itayama M, Arai F, Furukawa KS, Ushida T, Kawahara T. An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175595.
278. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*. 2014;17(4):779-804.
279. Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *Journal of biochemistry*. 2014;156(1):1-10.
280. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2018;59(2):455-67.
281. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- $\beta$  signalling. *Nature*. 2013;499(7458):306-11.
282. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma*. 2012;2(1):18-28.
283. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clinical orthopaedics and related research*. 2015;473(5):1635-43.
284. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-

- PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International journal of implant dentistry*. 2016;2(1):19-.
285. Zhang L, Ai H. Concentrated growth factor promotes proliferation, osteogenic differentiation, and angiogenic potential of rabbit periosteum-derived cells in vitro. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):146-.
286. Yu B, Wang Z. Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro. *Molecular medicine reports*. 2014;9(1):235-42.
287. Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, Buffoli B, Labanca M, Scari G, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microscopy Research and Technique*. 2011;74(8):772-7.
288. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018;29(2):171-84.
289. Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. 2012;40(5):323-9.
290. Clark RAF. Fibrin Is a Many Splendored Thing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;121(5):xxi-xxii.
291. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27(1):63-9.
292. Kim T-H, Kim S-H, Sándor GK, Kim Y-D. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of Oral Biology*. 2014;59(5):550-8.
293. Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *Journal of periodontology*. 2009;80(12):2056-64.
294. Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent*. 2011;20(1):2-12.
295. Varghese MP, Manuel S, Kumar L. K S. Potential for Osseous Regeneration of Platelet-Rich Fibrin—A Comparative Study in Mandibular Third Molar Impaction Sockets. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75(7):1322-9.
296. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2002;30(2):97-102.
297. Evanson JR, Guyton MK, Oliver DL, Hire JM, Topolski RL, Zumbun SD, et al. Gender and age differences in growth factor concentrations from platelet-rich plasma in adults. *Military medicine*. 2014;179(7):799-805.
298. Miron RJ, Dham A, Dham U, Zhang Y, Pikos MA, Sculean A. The effect of age, gender, and time between blood draw and start of centrifugation on the size outcomes of platelet-rich fibrin (PRF) membranes. *Clinical oral investigations*. 2019;23(5):2179-85.
299. Systems RD. Human VEGF DuoSet ELISA [02.03.2021]. Available from: [https://www.rndsystems.com/products/human-vegf-duoset-elisa\\_dy293b](https://www.rndsystems.com/products/human-vegf-duoset-elisa_dy293b).
300. Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO. Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation*. 2009;16(7):572-92.

301. Ratajczak J, Vangansewinkel T, Gervois P, Merckx G, Hilkens P, Quirynen M, et al. Angiogenic Properties of 'Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin'. *Scientific reports*. 2018;8(1):14632-.
302. Liang ZJ, Lu X, Li DQ, Liang YD, Zhu DD, Wu FX, et al. Precise Intradermal Injection of Nanofat-Derived Stromal Cells Combined with Platelet-Rich Fibrin Improves the Efficacy of Facial Skin Rejuvenation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;47(1):316-29.
303. Wang Z, Han L, Sun T, Wang W, Li X, Wu B. Preparation and effect of lyophilized platelet-rich fibrin on the osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Heliyon*. 2019;5(10):e02739.
304. Taniguchi Y, Yoshioka T, Sugaya H, Gosho M, Aoto K, Kanamori A, et al. Growth factor levels in leukocyte-poor platelet-rich plasma and correlations with donor age, gender, and platelets in the Japanese population. *Journal of experimental orthopaedics*. 2019;6(1):4.
305. Kleinheinz J, Jung S, Wermker K, Fischer C, Joos U. Release kinetics of VEGF165 from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model. *Head & face medicine*. 2010;6:17-.
306. Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood*. 2000;96(12):3772-8.
307. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):4563-8.
308. Systems RD. Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA [Available from: [https://www.rndsystems.com/products/human-tgf-beta-1-duoset-elisa\\_dy240](https://www.rndsystems.com/products/human-tgf-beta-1-duoset-elisa_dy240).
309. Caballé-Serrano J, Sawada K, Miron RJ, Bosshardt DD, Buser D, Gruber R. Collagen barrier membranes adsorb growth factors liberated from autogenous bone chips. *Clinical oral implants research*. 2017;28(2):236-41.
310. Di Summa F, Kargarpour Z, Nasirzade J, Stähli A, Mitulović G, Panić-Janković T, et al. TGFβ activity released from platelet-rich fibrin adsorbs to titanium surface and collagen membranes. *Scientific reports*. 2020;10(1):10203.
311. Rosenbruch M, Holst A. The chick embryo yolk-sac blood vessel system as an experimental model for irritation and inflammation. *Toxicology in Vitro*. 1990;4(4):327-31.
312. Freeman BM, Vince MA. The Development of Sensory Systems. *Development of the Avian Embryo: A Behavioural and Physiological Study*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1974. p. 84-103.
313. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*: Methuen; 1959.
314. Jin YM, Zhao SZ, Zhang ZL, Chen Y, Cheng X, Chuai M, et al. High glucose level induces cardiovascular dysplasia during early embryo development. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2013;121(8):448-54.
315. Ma Z-l, Wang G, Lu W-h, Cheng X, Chuai M, Lee KKH, et al. Investigating the effect of excess caffeine exposure on placental angiogenesis using chicken 'functional' placental blood vessel network. *Journal of Applied Toxicology*. 2016;36(2):285-95.
316. Wang G, Zhong S, Zhang S-y, Ma Z-l, Chen J-l, Lu W-h, et al. Angiogenesis is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *Journal of Applied Toxicology*. 2016;36(5):692-701.

317. As MN, Deshpande R, Kale VP, Bhonde RR, Datar SP. Establishment of an in ovo chick embryo yolk sac membrane (YSM) assay for pilot screening of potential angiogenic and anti-angiogenic agents. *Cell biology international*. 2018;42(11):1474-83.
318. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of development*. 2016;141:70-7.
319. Strano S. *Cancer Chemoprevention: Methods and Protocols*: Springer; 2016.
320. Nguyen M, Shing Y, Folkman J. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *Microvascular research*. 1994;47(1):31-40.
321. AS MN, Deshpande R, Kale VP, Bhonde RR, Datar SP. Establishment of an in ovo chick embryo yolk sac membrane (YSM) assay for pilot screening of potential angiogenic and anti-angiogenic agents. *Cell biology international*. 2018;42(11):1474-83.
322. Jiao Y-h, Dou M, Wang G, Li H-y, Liu J-s, Yang X, et al. Exposure of okadaic acid alters the angiogenesis in developing chick embryos. *Toxicol*. 2017;133:74-81.
323. Wang H-MaL, Cheng-Yu and Wang, Xiu-Hong and Bao, Yong and Meng, Xiang-Ying and Wu, Yin and Li, Yu-Xin. Chick yolk sac membrane assay: a novel angiogenesis model. *Journal of Biological Research*. 2007;7:93-7.
324. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer*. 1994;73(3):678-87.
325. Wang G, Zhang N, Wei YF, Jin YM, Zhang SY, Cheng X, et al. The impact of high-salt exposure on cardiovascular development in the early chick embryo. *The Journal of experimental biology*. 2015;218(Pt 21):3468-77.
326. Whitesell TR, Kennedy RM, Carter AD, Rollins E-L, Georgijevic S, Santoro MM, et al. An  $\alpha$ -smooth muscle actin (*acta2/asma*) zebrafish transgenic line marking vascular mural cells and visceral smooth muscle cells. *PLoS One*. 2014;9(3):e90590-e.
327. Hashimoto N, Kiyono T, Saitow F, Asada M, Yoshida M. Reversible differentiation of immortalized human bladder smooth muscle cells accompanied by actin bundle reorganization. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186584-e.
328. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)*. 1998;125(9):1591-8.
329. Lin C, Yuan Y, Courtman DW. Differentiation of Murine Bone Marrow-Derived Smooth Muscle Progenitor Cells Is Regulated by PDGF-BB and Collagen. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156935-e.
330. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(27):19027-30.
331. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. EDITORIAL. CD105 AND ANGIOGENESIS. *The Journal of Pathology*. 1996;178(4):363-6.
332. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF- $\beta$  binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genetics*. 1994;8(4):345-51.
333. Raab U, Lastres P, Arévalo MA, López-Novoa JM, Cabañas C, de la Rosa EJ, et al. Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Letters*. 1999;459(2):249-54.

334. Rossi E, Langa C, Gilsanz A, Blanco FJ, Ayllón J, Villar E, et al. Characterization of chicken endoglin, a member of the zona pellucida family of proteins, and its tissue expression. *Gene*. 2012;491(1):31-9.
335. Ferician O, Cimpean AM, Avram S, Raica M. Endostatin Effects on Tumor Cells and Vascular Network of Human Renal Cell Carcinoma Implanted on Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *Anticancer research*. 2015;35(12):6521-8.
336. Maier JA, Delia D, Thorpe PE, Gasparini G. In vitro inhibition of endothelial cell growth by the antiangiogenic drug AGM-1470 (TNP-470) and the anti-endoglin antibody TEC-11. *Anti-cancer drugs*. 1997;8(3):238-44.
337. Takahashi N, Haba A, Matsuno F, Seon BK. Antiangiogenic Therapy of Established Tumors in Human Skin/Severe Combined Immunodeficiency Mouse Chimeras by Anti-Endoglin (CD105) Monoclonal Antibodies, and Synergy between Anti-Endoglin Antibody and Cyclophosphamide. *Cancer Research*. 2001;61(21):7846-54.
338. Barnett JM, Suarez S, McCollum GW, Penn JS. Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal-based models of retinal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(10):6490-8.
339. Folkman J. Tumor Angiogenesis. In: Klein G, Weinhouse S, editors. *Advances in Cancer Research*. 43: Academic Press; 1985. p. 175-203.
340. Schlatter P, König MF, Karlsson LM, Burri PH. Quantitative Study of Intussusceptive Capillary Growth in the Chorioallantoic Membrane (CAM) of the Chicken Embryo. *Microvascular research*. 1997;54(1):65-73.
341. Wilting J, Christ B, Bokeloh M. A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. *Anatomy and Embryology*. 1991;183(3):259-71.
342. Marga Janse E, Jeurissen SHM. Ontogeny and Function of Two Non-Lymphoid Cell Populations in the Chicken Embryo. *Immunobiology*. 1991;182(5):472-81.
343. Murphy JB. STUDIES IN TISSUE SPECIFICITY : II. THE ULTIMATE FATE OF MAMMALIAN TISSUE IMPLANTED IN THE CHICK EMBRYO. *Journal of Experimental Medicine*. 1914;19(2):181-6.
344. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2017;70:97-101.
345. Célérier J, Cruz A, Lamandé N, Gasc J-M, Corvol P. Angiotensinogen and Its Cleaved Derivatives Inhibit Angiogenesis. *Hypertension*. 2002;39(2):224-8.
346. Nowak-Sliwinska P, van Beijnum JR, van Berkel M, van den Bergh H, Griffioen AW. Vascular regrowth following photodynamic therapy in the chicken embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis*. 2010;13(4):281-92.
347. Leong HS, Steinmetz NF, Ablack A, Destito G, Zijlstra A, Stuhlmann H, et al. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles. *Nat Protoc*. 2010;5(8):1406-17.
348. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *The International journal of developmental biology*. 1996;40(6):1189-97.
349. Ribatti D. Reorganization of blood vessels after their partial section in the chick embryo chorioallantoic membrane. *The International journal of developmental biology*. 1994;38(1):117-20.
350. Strick DM, Waycaster RL, Montani JP, Gay WJ, Adair TH. Morphometric measurements of chorioallantoic membrane vascularity: effects of hypoxia and hyperoxia. *The American journal of physiology*. 1991;260(4 Pt 2):H1385-9.
351. Suzuki S, Morimoto N, Ikada Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *Journal of Biomaterials Applications*. 2013;28(4):595-606.

352. Miller WJ, Kayton ML, Patton A, O'Connor S, He M, Vu H, et al. A novel technique for quantifying changes in vascular density, endothelial cell proliferation and protein expression in response to modulators of angiogenesis using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Journal of translational medicine*. 2004;2(1):4.
353. Du X, Todorov P, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P, Meng Y, et al. Increasing of malignancy of breast cancer cells after cryopreservation: molecular detection and activation of angiogenesis after CAM-xenotransplantation. *BMC cancer*. 2020;20(1):753.
354. Nica O, Popa DG, Grecu AF, Ciucă EM, Ciurea ME. Histological aspects of full-thickness skin grafts augmented with platelet-rich fibrin in rat model. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2019;60(2):581-8.
355. Yang J, Yuan M, Wang E, Chen Y. Comparison of the Repeatability of Macular Vascular Density Measurements Using Four Optical Coherence Tomography Angiography Systems. *Journal of ophthalmology*. 2019;2019:4372580.
356. Simkiene J, Pranskuniene Z, Patasius M, Trumpaitis J, Boerma EC, Pranskunas A. Alterations of retinal vessels in patients with sepsis. *Journal of clinical monitoring and computing*. 2020;34(5):937-42.
357. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clinical oral implants research*. 2006;17(4):403-9.
358. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *Journal of biochemistry*. 1997;121(2):317-24.
359. Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, et al. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2004;68(1):10-8.
360. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(4):433-41.
361. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Müller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng*. 2001;7(5):557-72.
362. Magnaudeix A, Usseglio J, Lasgorceix M, Lalloue F, Damia C, Brie J, et al. Quantitative analysis of vascular colonisation and angio-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model. *Acta Biomaterialia*. 2016;38:179-89.
363. Dogan A, Coskun Z, Töre C, Gultekin A, Cinar C, Saglanmak A, et al. Effects of collagen membranes with different properties in peri-implant dehiscence defects. *Clinical oral implants research*. 2020;31(S20):132-.
364. Naenni N, Walter P, Hämmerle CHF, Jung RE, Thoma DS. Augmentation of soft tissue volume at pontic sites: a comparison between a cross-linked and a non-cross-linked collagen matrix. *Clinical oral investigations*. 2021;25(3):1535-45.
365. Al-Maawi S, Orłowska A, Sader R, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. In vivo cellular reactions to different biomaterials-Physiological and pathological aspects and their consequences. *Seminars in immunology*. 2017;29:49-61.
366. Di Raimondo R, Sanz-Esporrín J, Sanz-Martin I, Plá R, Luengo F, Vignoletti F, et al. Hard and soft tissue changes after guided bone regeneration using two different barrier membranes: an experimental in vivo investigation. *Clinical oral investigations*. 2021;25(4):2213-27.

367. Cha J-K, Pla R, Vignoletti F, Jung U-W, Sanz-Esporrin J, Sanz M. Immunohistochemical characteristics of lateral bone augmentation using different biomaterials around chronic peri-implant dehiscence defects: An experimental in vivo study. *Clinical oral implants research*. 2021;n/a(n/a).
368. França-Grohmann IL, Sangiorgio JPM, Bueno MR, Casarin RCV, Silvério Ruiz KG, Nociti FH, Jr., et al. Treatment of dehiscence-type defects with collagen matrix and/or enamel matrix derivative: Histomorphometric study in minipigs. *Journal of periodontology*. 2020;91(7):967-74.
369. Shirakata Y, Sculean A, Shinohara Y, Sena K, Takeuchi N, Bosshardt DD, et al. Healing of localized gingival recessions treated with a coronally advanced flap alone or combined with an enamel matrix derivative and a porcine acellular dermal matrix: a preclinical study. *Clinical oral investigations*. 2016;20(7):1791-800.
370. Ahmed N, Gopalakrishna V, Shetty A, Nagraj V, Imran M, Kumar P. Efficacy of PRF vs PRF + Biodegradable Collagen Plug in Post-extraction Preservation of Socket. *The journal of contemporary dental practice*. 2019;20(11):1323-8.
371. Thakkar DJ, Deshpande NC, Dave DH, Narayankar SD. A comparative evaluation of extraction socket preservation with demineralized freeze-dried bone allograft alone and along with platelet-rich fibrin: A clinical and radiographic study. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(3):371-6.
372. Wessing B, Lettner S, Zechner W. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2018;33(1):87-100.
373. Sanz-Sánchez I, Ortiz-Vigón A, Sanz-Martín I, Figuero E, Sanz M. Effectiveness of Lateral Bone Augmentation on the Alveolar Crest Dimension: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*. 2015;94(9 Suppl):128s-42s.
374. Schmitt CM, Schlegel KA, Gammel L, Moest T. Gingiva thickening with a porcine collagen matrix in a preclinical dog model: Histological outcomes. *Journal of clinical periodontology*. 2019;46(12):1273-81.
375. Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, Lekovi V, Dimitrijevic B, Kenney E, et al. Use of platelet-rich fibrin membrane following treatment of gingival recession: a randomized clinical trial. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2012;32 2:e41-50.
376. Sharma V, Kumar A, Puri K, Bansal M, Khatri M. Application of platelet-rich fibrin membrane and collagen dressing as palatal bandage for wound healing: A randomized clinical control trial. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2019;30(6):881-8.
377. Kulkarni MR, Thomas BS, Varghese JM, Bhat GS. Platelet-rich fibrin as an adjunct to palatal wound healing after harvesting a free gingival graft: A case series. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2014;18(3):399-402.
378. Blatt S, Thiem DGE, Pabst A, Al-Nawas B, Kämmerer PW. Does Platelet-Rich Fibrin Enhance the Early Angiogenetic Potential of Different Bone Substitute Materials? An In Vitro and In Vivo Analysis. *Biomedicines*. 2021;9(1).
379. Jankovic S, Aleksic Z, Milinkovic I, Dimitrijevic B. The coronally advanced flap in combination with platelet-rich fibrin (PRF) and enamel matrix derivative in the treatment of gingival recession: a comparative study. *The European journal of esthetic dentistry : official journal of the European Academy of Esthetic Dentistry*. 2010;5(3):260-73.
380. Miron RJ, Moraschini V, Del Fabbro M, Piattelli A, Fujioka-Kobayashi M, Zhang Y, et al. Use of platelet-rich fibrin for the treatment of gingival recessions: a

- systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*. 2020;24(8):2543-57.
381. L Heijl GH, G Svärdröm, A Ostgren. Enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of intrabony periodontal defects. *Journal of clinical periodontology*. 1997;24(9):705-14.
382. Zhou S, Sun C, Huang S, Wu X, Zhao Y, Pan C, et al. Efficacy of Adjunctive Bioactive Materials in the Treatment of Periodontal Intrabony Defects: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2018;2018:8670832-.
383. Kaarthikeyan G, Jayakumar ND, Sivakumar D. Comparative Evaluation of Bone Formation between PRF and Blood Clot Alone as the Sole Sinus-Filling Material in Maxillary Sinus Augmentation with the Implant as a Tent Pole: A Randomized Split-Mouth Study. *Journal of long-term effects of medical implants*. 2019;29(2):105-11.
384. Boora P, Rathee M, Bhorla M. Effect of Platelet Rich Fibrin (PRF) on Peri-implant Soft Tissue and Crestal Bone in One-Stage Implant Placement: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):ZC18-ZC21.
385. Tabrizi R, Arabion H, Karagah T. Does platelet-rich fibrin increase the stability of implants in the posterior of the maxilla? A split-mouth randomized clinical trial. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2018;47(5):672-5.
386. Strauss FJ, Stähli A, Gruber R. The use of platelet-rich fibrin to enhance the outcomes of implant therapy: A systematic review. *Clinical oral implants research*. 2018;29 Suppl 18(Suppl 18):6-19.
387. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(1):67-82.
388. Tsujino T, Takahashi A, Yamaguchi S, Watanabe T, Isobe K, Kitamura Y, et al. Evidence for contamination of silica microparticles in advanced platelet-rich fibrin matrices prepared using silica-coated plastic tubes. *Biomedicines*. 2019;7(2):45.
389. Masuki H, Isobe K, Kawabata H, Tsujino T, Yamaguchi S, Watanabe T, et al. Acute cytotoxic effects of silica microparticles used for coating of plastic blood-collection tubes on human periosteal cells. *Odontology*. 2020;108(4):545-52.
390. Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, et al. Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence? *The Journal of oral implantology*. 2018;44(6):471-92.

## Anhang

### Erklärung

Ich, Valentin Burkhardt, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Ein Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde bereits von Blatt et al. (Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo. Clinical oral investigations. 2020;24(10):3425-36.) 2020 veröffentlicht. Eine Erklärung hierrüber liegt der medizinischen Fakultät Mainz bereits vor.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades.

Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

Freiburg, den 15.01.2022

Ort, Datum

  
Unterschrift

## **Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – plastische Operationen - der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für das Überlassen des Themas bedanken.

Großer Dank gilt meinem Betreuer für die gute und freundschaftliche Betreuung, die Geduld mit mir und meinen Fragen zum Thema und den persönlichen Einsatz im Hinblick auf das gemeinsame Projekt.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Forschungsgruppenleiter Molekulare Tumorbologie der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Unterstützung in Form der intravital Mikroskopie sowie die Möglichkeit der Teilnahme an den wöchentlichen Treffen in der Forschungsgruppe bedanken.

Für die Einführung in die Handhabung mit dem CAM-Modell möchte ich speziell bei einem Kommilitonen danken, da er mich vor vielen Anfängerfehlern im Umgang mit dieser Methode bewahrt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Team des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – plastische Operationen - der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz für die Einführung in die technische Handhabung der Geräte und die Mithilfe bei der Durchführung zahlloser Experimente.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie, an meine Mitbewohner und an meine Freunde, die mich allzeit unterstützt haben und die Arbeit in ihrer nun vorliegenden Form erst möglich gemacht haben.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Valentin Burkhardt  
Geburtsdatum: 25.12.1994  
Geburtsort: Heidelberg

### **Ausbildung**

04/2014-11/2020 Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; Abschluss: Staatsexamen, Note 2,0  
09/2005-06/2013 Hohenstaufen-Gymnasium Eberbach; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife; Note: 1,2

### **Praxiserfahrung**

09/2013-02/2014 Bundesfreiwilligendienst auf der kardiologischen ICU und IMC der Universitätsklinik Heidelberg  
09/2016 Famulatur in der HNO Praxis Dr. Björn Göpel in Kaiserslautern  
03/2017 Famulatur Allgemein Chirurgie Yenepoya Medical College in Mangalore, Indien  
02/2018 Famulatur Allgemeinmedizin Dr. Michel Abdollahnia in Mainz  
08/2018 Famulatur Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Universitätsklinik Mainz  
10/2017-09/2019 Tätigkeit als Pflegehelfer in der Notaufnahme der HNO und Augenheilkunde der Universitätsklinik Mainz  
11/2019-03/2020 PJ Chirurgie an der Universitätsklinik Mainz  
03/2020-06/2020 PJ Innere Medizin an der Universitätsklinik Mainz  
06/2020-10/2020 PJ Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde an der Universitätsklinik Köln  
Seit 04/2021 Assistenzarzt in Weiterbildung in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Freiburg

### **Außercurriculare Tätigkeiten**

10/2015-04-2017 Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter der Anatomie des Instituts für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie der Universitätsklinik Mainz

10/2016-10/2019 Aktives Mitglied bei Medinetz Mainz e.V.  
12/2017-12/2018 Präsident von Medinetz Mainz e.V.

### Forschung

Seit 10/2017 Doktorand in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Mainz

Publikation Blatt S, **Burkhardt V**, Kämmerer PW, Pabst AM, Sagheb K, Heller M, et al. Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo. Clinical oral investigations. 2020;24(10):3425-36.

### Kenntnisse

Sprachen Deutsch (Muttersprache)  
Englisch (fließend)  
Spanisch (Grundkenntnisse)  
Französisch (Grundkenntnisse)  
Latein (Großes Latinum)

### Interessen

Literatur und Kunst  
Musik Saxophon  
Sport Tennis, Schwimmen, Joggen

Freiburg, den 15.01.2022

Ort, Datum



Unterschrift