

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

**Einfluss auf das Rehydrierungsprotokoll und die Angiogenese durch
Biofunktionalisierung xenogener Kollagenmembranen mit autologen
Thrombozytenkonzentraten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Saskia-Vanessa Nora Mariah Schröger

aus Passau

Mainz, 2023

Tag der Promotion: 24.04.2023

*Für meine Familie,
insbesondere meinen verstorbenen Papa*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Ziele	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Ziele der Dissertation.....	2
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Angiogenese und Vaskulogenese.....	3
2.2 Autologe Thrombozytenkonzentrate	4
2.3 Platelet rich fibrin (PRF).....	5
2.4 Zentrifugationsprotokolle.....	7
2.5 Kollagenmembranen.....	9
2.6 Rehydrierung	12
3. Material und Methoden.....	14
3.1 Material- und Geräteliste	14
3.2 Kollagenmembranen.....	16
3.3 Methoden.....	17
3.3.1 Herstellung von platelet-rich-fibrin (PRF).....	17
3.3.2 Rehydratation und Messung des pH-Wertes	17
3.3.3 Yolc sac membrane Assay zur Quantifizierung von Gefäßen und Verzweigungspunkten.....	18
3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)	20
3.3.5 Anti-alpha smooth muscle Actin antibody(1A4) (SMA-Färbung)	20
3.3.6 Immunfluoreszenz CD 105 Anti-chicken Antibody (CD-105-Färbung)	21
3.4 Auswertung histologischer Schnitte der yolk sac membrane.....	21
3.5 Fotodokumentation und Auswertung der Gefäße unter dem digitalen Mikroskop in vivo.....	23
3.6 Statistische Analyse.....	25
4. Ergebnisse.....	26
4.1 Ph-Wert Analyse.....	26

4.2 Yolk sac membrane Assay	28
4.3 Immunhistochemische Analyse	32
5. Diskussion	36
5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse und Vergleich zur Literatur	36
5.1.2 PRF als Möglichkeit der Biologisierung	36
5.1.3 Kollagenmembranen	37
5.1.4 Rehydrierung und ihr Einfluss	39
5.1.5 Chorio-allantois membrane- und yolk sac membrane- Assay	40
5.2 Limitationen der Studie	44
6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	45
7. Literaturverzeichnis.....	46
8. Anhang	53

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
3D	dreidimensional
α-SMA	anti-alpha smooth muscle Actin antibody (1A4)
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
A-PRF	advanced platelet rich fibrin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BM	Bio-Gide®-Membran
Bspw.	beispielsweise
Bzw.	beziehungsweise
CD105	Immunofluorescence anti-chicken Antikörper
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Dako	marked polymer-HRP anti mouse
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
GBR/GTR	guided bone- and tissue regeneration
Ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HE	Hematoxylin-eosin
IL-10	Interleukin 10
i-PRF	injectable platelet-rich fibrin
i.v.	intravenös
KM	Kollagenmembran
LSCC	low speed centrifugation concept (Niedriggeschwindigkeitszentrifugation)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mm ²	Quadratmillimeter
N	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	pH-Wert
PRF	Platelet rich fibrin
PRGF	platelet rich in growth factor
PRP	platelet rich plasma
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SM	Symbios [®] - Membran
S-PRF	standard platelet rich fibrin
TGF-β	transforming Growth Factor β
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factor
YSM	yolk sac membrane
z.B	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PRF als Fibrinclot zwischen azellulärem Plasma und roten Blutkörperchen [45]	6
Abbildung 2: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung, (A) α SMA, (B) HE, (C) CD 105. In 2-facher Vergrößerung nach Blatt et al. (2022) [1]	22
Abbildung 3: Beispielbilder der mikroskopischen Fotodokumentation A) Bio-Gide® Membran, B) Symbios® Membran C) PRF, zu 24, 48 and 72 h im YSM-Assay. In 50-facher Vergrößerung nach Blatt et al. (2022) [1].....	24
Abbildung 4: Beispiel zur mikroskopischen Analyse der Gefäße und Verzweigungspunkte. Nach Zentrierung der Membran wurde für jede Versuchsreihe standardmäßig die gleiche Region of Interest (ROI) von 500 x 500 μ m verwendet. Die Anzahl der Gefäße und der Verzweigungspunkte (blau hervorgehoben) pro mm ² der ROI wurden manuell gezählt. Vergrößerung: 50-fach. Nach Blatt et al. (2022) [1] ...	24
Abbildung 5: pH-Wert Veränderungen während der 20-minütigen Rehydratation der jeweiligen KM in verschiedenen Medien: (A) Kochsalzlösung, (B) pH7-Lösung, (C) Blut, (D) PRF. Blaue Säule: negative Kontrollmedien, orangefarbene Säule: Medien mit Symbios® (SM), graue Säule: Medien mit Bio-Gide® (BM). * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]	28
Abbildung 6: Analyse der Gefäße pro mm ² für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®), PRF-Negativkontrolle. (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]	30
Abbildung 7: Analyse der Verzweigungspunkte pro mm ² für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®), PRF-Negativkontrolle. (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1].	31
Abbildung 8: Analyse der immunhistochemischen α SMA-Färbung für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®, PRF, Negativkontrolle). (A) 24 h, (B) 48 h,	

(C) 72 h nach Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]	33
Abbildung 9: Analyse der immunhistochemischen CD105-Färbung für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®, PRF, Negativkontrolle). (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h nach Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]	35

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Materialien	15
Tabelle 2: Geräte	16

1. Einleitung und Ziele

1.1 Einleitung

Die gesteuerte Knochen- und Geweberegeneration (Guided bone regeneration, GBR; Guided tissue regeneration, GTR) wird seit langem erfolgreich angewandt, um u.a. begrenzte Knochendefekte zu behandeln, Alveolarknochen zu rekonstruieren und die Wundheilung zu fördern [2, 3]. Der Bedarf nach weiterentwickelten Geweberegenerationstechniken und -materialien für die orale Regeneration steigt daher kontinuierlich [4]. Neben Patienten-eigenen und – fremden Knochentransplantaten sowie aus tierischen Materialien bestehenden Transplantaten, kommen häufig auch Membrantechniken zum Einsatz. Diese können zwar keine Knochenneubildung anregen, jedoch ebenfalls das Knochenwachstum fördern [5, 6]. Dabei werden resorbierbare Kollagenmembranen (KM) meist tierischen Ursprungs, aufgrund ihrer nachgewiesenen Biokompatibilität und Fähigkeit, die Wundheilung zu fördern, eingesetzt [7]. Als dreidimensionale Strukturen haben sie die Fähigkeit, lokal und nachhaltig lebensfähige Zellpopulationen und / oder bioaktive sowie therapeutische Moleküle für Regenerationsprozesse zu liefern [8]. Sie werden als okklusive Barrieren zwischen den epithelialen Zellen sowie konnektiven Gewebefibroblasten und der Wunde im Parodontium genutzt. Sie erlauben anderen regenerativen Zellen eine Neubesiedelung des Areals und somit die Förderung der Wundheilung [9]. Die Membranen können jedoch auch als Barriere für neu einsprossende Gefäße wirken. Die mögliche fehlende oder verzögerte Blutversorgung beispielsweise nach Implantation kann zu einer unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und möglicherweise zu Nekrose führen, was nach wie vor eine erhebliche klinische Einschränkung darstellt [10]. Zentrale Herausforderung ist eine schnelle und nachhaltige Vaskularisierung der Biomaterialien, die langfristiges Überleben und Funktion garantieren [11]. Hier sind proangiogene Merkmale, als Synergie physikalisch-chemischer Reize und der lokalen Blutversorgung von besonderem Interesse, die Sauerstoff und Nährstoffe liefern [12]. Die klinische Umsetzung ist jedoch bisher begrenzt. Als Methode zur Optimierung pro-angiogener Eigenschaften des jeweiligen Biomaterials stehen autologe Thrombozytenkonzentrate im besonderen Fokus verschiedener Forschungsansätze [13]. Beispielsweise wird durch Biofunktionalisierung mittels Plättchen-reichem Fibrin (PRF) versucht, die

Eigenschaften der KM zu optimieren und körpereigene Wachstumsfaktoren zu generieren [14, 15]. Es besteht aus Thrombozyten, Zytokinen, glykämische Ketten und Glykoproteinen, vermischt mit einem langsam polymerisierenden Fibrinnetzwerk, was die Wundheilung verbessert [16, 17]. Die Kombination von PRF und KM scheint vielversprechend für die klinische Anwendung [18, 19], insbesondere bei der Augmentation der Kieferhöhle und der Restauration von Zahnimplantaten [20]. Neben den frühen pro-angiogenen Vorteilen der Kombination könnte die PRF-Inkubation auch als Methode zur angemessenen Rehydrierung der KM vor ihrer klinischen Verwendung dienen. Die Rehydratation der Membranen wird von den Herstellern empfohlen, aber sowohl das Medium als auch der Zeitraum für die Rehydratation sind oft vage und nicht ausreichend belegt. Dabei hat das Rehydrationsprotokoll großen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften der Membranen [21]. Zusätzlich kann es in Abhängigkeit vom gewählten Inkubationsmedium über Veränderungen des pH-Werts indirekt nach dem Rehydrationsprozess zu Einflüssen auf die Vaskularisation kommen [22].

1.2 Ziele der Dissertation

Die vorliegende, experimentelle Studie beschäftigt sich mit der Biofunktionalisierung xenogener Kollagenmembranen mittels autologer Thrombozytenkonzentrate und deren Einfluss auf die Angiogenese sowie das Rehydrationsprotokoll von Kollagenmembranen. Ziel des Forschungsprojektes ist ein besseres Verständnis der physiologischen Prozesse der Weichgewebsregeneration unter Verwendung von Membranen bzw. PRF. Methodisch wird in ovo die Vaskularisation der yolk sac membrane von Hühner-Embryonen nach Einlage biologisierter Membranen im Vergleich zu reiner PRF über einen Zeitraum von 72 Stunden untersucht. Es wird der Frage nachgegangen, ob mit PRF biologisierte Membranen gegenüber den nativen Membranen oder reiner PRF, Vorteile in Form einer gesteigerten Vaskularisierung für die weichgewebliche Regeneration erzielt werden können. Ein weiteres Ziel dieser Studie ist es, mögliche Veränderungen der pH-Werte bei der Rehydrierung von KM mit PRF zu analysieren und die Kombination von PRF mit bovinen und porcinen KM hinsichtlich des pro-angiogenen Potenzials zu verschiedenen Zeiten in vivo zu vergleichen. Die Arbeit soll dazu beitragen, zukünftige Behandlungskonzepte zu optimieren und die Biofunktionalisierung von Membranen sowie den Rehydrierungsprozess mit PRF im klinischen Alltag zu implementieren.

2. Literaturdiskussion

2.1 Angiogenese und Vaskulogenese

Das Gefäßsystem ist als Hauptquelle für Sauerstoff, Nährstoffe, Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, für die Regeneration und den Umbau von Knochen und Gewebe unerlässlich. Die Hämatopoese wird darüber gesteuert. Ein Netz von Arterien und Arteriolen sorgt für die adäquate Blutzufuhr. Die Gefäße werden dabei durch zwei verschiedene Mechanismen gebildet [23]. Zum einen gibt es den Mechanismus der Vaskulogenese. Durch diesen entstehen das Herz sowie das erste primitive Gefäßnetz im Inneren des Embryos, dem Dottersackkreislauf. Die Blutgefäße entwickeln sich de-novo aus Vorläuferzellen, Angioblasten oder Hämangioblasten. Neben der Vaskulogenese gibt es die Angiogenese, die für den Umbau und die Erweiterung des Gefäßnetzes verantwortlich ist. Es kommt zur endothelialen Sprossung und intussuszeptivem, mikrovaskulären Wachstum. Der Sprossungsprozess basiert dabei auf Migration, Proliferation und Röhrenbildung von Endothelzellen. Durch Bilden von interstitiellem Gewebe und Einfügen von Gewebefalten werden Gefäßlumina unterteilt und neue Lumina gebildet. Zur Intussuszeption gehört auch die Bildung neuer Gefäße durch in situ-Schlingenbildung in der Wand großer Venen. Auf molekularer Ebene wird die Intussuszeption durch den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seine Rezeptoren flk-1 (KDR) und flt-1, das Angiopoietin/tie-System und das Ephrin-B/EpH-B-System reguliert [24, 25].

Die Vaskulogenese ist entscheidend für die Entwicklung des gesamten Embryos und führt indirekt zur Bildung des primären Knochengefäßsystem [26]. Bei Störungen in diesem Prozess kann es zu skelettbezogenen oder systemischen Skelett- und Systemerkrankungen wie Osteonekrose, Osteoporose oder Atherosklerose kommen [23]. Die Angiogenese findet auch während der Knochenregeneration statt [27]. Im Rahmen der Wundheilung ist die Bildung neuer Blutgefäße erforderlich, um neben Nährstoffen auch Zellen und Wachstumsfaktoren in der ersten Heilungsphase zu transportieren [28]. Knochenzellen selbst sind eine wichtige Quelle für VEGF, dessen Sekretion entscheidend für die normale Chondrozytenproliferation und das Wachstum des Meckel-Knorpels ist [29].

Um Mechanismen der Angiogenese untersuchen zu können, wurden verschiedene Modelle, wie beispielsweise der in ovo Chorio-allantois membrane Assay (CAM-Assay) und der Yolk sac membrane Assay (YSM), etabliert. Mit diesen können Moleküle mit angiogener und antiangiogener Aktivität, Tumorzellwachstum und Metastasenbildung sowie azelluläre Gerüste und Organoide samt ihrer angiogenen Kapazität analysiert werden [30-33]. Beide Assays bestehen aus einer extraembryonalen Membran, die eine hohe Dichte an Blut- und Lymphgefäßen besitzt. In der vorliegenden Studie wurde das YSM-Modell verwendet, um die Angiogenese zu quantifizieren.

2.2 Autologe Thrombozytenkonzentrate

Thrombozyten enthalten viele pro- und antiangiogene Proteine. Werden sie aktiviert, zeigen sie regulatorische Effekte auf die Angiogenese [34]. Neben ihrer Bedeutung für die frühen Stadien der Wundheilung sind sie fähig, VEGF zu synthetisieren und freizusetzen. In einer Studie von Nami et al. konnte gezeigt werden, dass sie den gesamten Prozess der Geweberegeneration beeinflussen, indem sie die Synthese und Freisetzung von VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF) und Interleukin 10 (IL-10) durch periphere mononukleäre Blutzellen modulieren. Diese Effekte könnten den Thrombozyten eine neue Schlüsselrolle bei der Steuerung von Heilungsprozessen verleihen [35]. Im Hinblick auf die Stimulierung der Fibroblastenproliferation und -migration, der Chemotaxis und der Angiogenese im Rahmen der Wundheilung zeigten sich Thrombozytenkonzentrate dem Plasma und auch reinen Thrombozyten überlegen [36].

Erstmals publiziert wurde die Anwendung eines autologen, Thrombozyten-reichen Humanplasmas in der Chirurgie 1954 von Kingsley. Es wurde wegen seiner hämostatischen und adhäsiven Eigenschaften verwendet [37, 38]. Um 1970 wurde das Konzept des Fibrinklebers in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eingeführt [39]. Es zeigten sich hierbei jedoch einige Nachteile des Fibrinklebesystems, wie die mögliche Übertragung von Viren aufgrund der Verwendung von Spender-Kryopräzipitaten. Deshalb wurde Fibrinogen alternativ bald aus autologem Plasma gewonnen, was damals jedoch eine Blutspende des Patienten bis zu drei Wochen vor der Operation notwendig machte, sowie den Zusatz von Rinderthrombin und Kalzium, um final Fibrin zu bilden. Als Weiterentwicklung beschrieben Whitman et al. später das

Thrombozytengel als günstigere autologe Alternative mit einer hohen Konzentration von Blutplättchen. Bei dieser Form war nur die Entnahme einer Einheit Vollblut (450 ml) unmittelbar präoperativ notwendig. Dieses wurde innerhalb eines zweistufigen Zentrifugationsverfahren so präpariert, dass am Ende des Verfahrens das Thrombozyten-reiche Plasma zurückblieb. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde, wie bei der Herstellung des Fibrinklebers, ebenfalls Rinderthrombin verwendet [40]. Die daraus resultierenden weiteren Studien haben immer mehr Formen der autologen Thrombozytenkonzentrate hervorgebracht [41]. Seitdem haben sie viele Bereiche des Gesundheitswesens verändert und gelten als wesentlicher Bestandteil von Behandlungskonzepten in chirurgischen Abteilungen, insbesondere in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, der Orthopädie, der Sportmedizin und Ophthalmologie. Sie sind beliebt, da sie gut verfügbar sind, einfach in der Anwendung und kosteneffizient [41]. In der Reihe der ersten Generation autologer Thrombozytenkonzentrate folgten Marx et al. 1998 mit einem präoperativen Protokoll für die Aufbereitung von Plättchen reichem-Plasma (PRP) [42]. Danach konnte das Biotechnology Institute kommerziell Plasma, reich an Wachstumsfaktoren (PRGF), unter dem Markennamen Endoret® (BTI Biotechnology Institute, Pforzheim, Germany) herstellen. In einem vierstufigen Aufbereitungsprotokoll wurden im Vergleich zu den vorherigen Produkten Leukozyten selektiv während der Aufbereitung ausgeschlossen [41].

2.3 Platelet rich fibrin (PRF)

In der ersten Generation der Thrombozytenkonzentrate, die in Form von Fibrinkleber vor 50 Jahren erstmals zur Wundheilung eingesetzt wurde, wurde Blut mit Antikoagulanzen entnommen und durch Zentrifugation verarbeitet. Dadurch wurde es in rote Blutkörperchen, azelluläres Plasma und die dazwischen liegende Buffy-Coat-Schicht getrennt, in der sich die Blutplättchen konzentrieren. Je nach Protokoll wurde diese Phase zusammen mit Thrombin und/oder Kalziumchlorid (oder ähnlichen Faktoren) im entsprechenden Operationsgebiet aufgetragen, um die Thrombozyten-Aktivierung und Fibrinpolymerisation auszulösen [43].

2001 entstand in Frankreich durch Choukroun et al. die zweite Generation der autologen Thrombozytenkonzentrate, die Herstellung von platelet rich fibrin (PRF). Diese Technik wurde für den speziellen Gebrauch in der Oral- und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie entwickelt [44]. Es wird unter anderem verwendet, um körpereigene

Wachstumsfaktoren zu generieren [14, 15] und besteht aus Thrombozyten, Zytokinen, glykämische Ketten sowie Glykoproteinen, vermischt mit einem langsam polymerisierenden Fibrinnetzwerk, was die Wundheilung fördert. PRF kann ohne Antikoagulanzen oder biochemische Modifikation des Blutes mittels Zentrifuge hergestellt werden und erweist sich somit als rein autologes Material [16, 17]. Blut wird mittels speziellen Vacutainern entnommen und direkt zentrifugiert. Man erhält danach einen Fibrin-Clot (siehe Abbildung 1), aus dem durch Pressen resistente, autologe Fibrin-Membranen hergestellt werden können [45]. Bei diesem Prozess fungiert das dichte Fibrinnetz als Reservoir für Gewebewachstumsfaktoren [17].

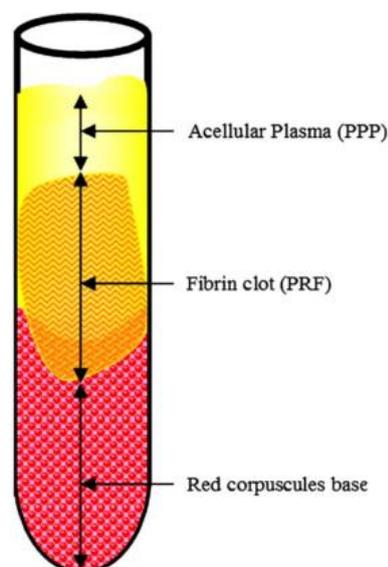


Abbildung 1: PRF als Fibrinclot zwischen azellulärem Plasma und roten Blutkörperchen [45]

Thrombozyten enthalten große Mengen an Wachstumsfaktoren wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der relevante Zelleigenschaften wie Proliferation, -differenzierung und -migration stimuliert [43]. Darüber hinaus spielen Wachstumsfaktoren eine Schlüsselrolle im intravaskulären angeborenen Immunsystem [46]. Während des natürlichen Gerinnungsprozesses werden die Wachstumsfaktoren freigesetzt und die natürlichen Wundheilungsphasen ermöglicht [47]. Außerdem scheint das Vorhandensein von Leukozyten eine wichtige Rolle bei der Wundheilung zu spielen [48], was unter anderem für die Regeneration von parodontalen, intraossären Defekten [49] und der Gingiva genutzt werden kann [50].

Die PRF-Membranen bieten viele Vorteile innerhalb der Weichgewebegeneration und sind vielseitig einsetzbar, können jedoch nicht als vollwertige Alternative zum Bindegewebestransplantat oder Kollagenmembranen bei Rezessionsdeckung bewertet werden [51, 52]. Die Kombination von PRF und KM scheint deshalb vielversprechend für die klinische Anwendung zu sein [18, 19]. Insbesondere bei der Augmentation der Kieferhöhle und der Rekonstruktion von Zahnimplantaten hat die Kombination von PRF und KM positive Ergebnisse gezeigt [20]. Es wurde festgestellt, dass der Grad der Porosität, die hydrophile Natur und die Polarität der Oberfläche wichtige Faktoren für die Absorption der flüssigen PRF zu sein scheinen [53]. Darüber hinaus wird der Transforming Growth Factor β (TGF- β) direkt an den KM adsorbiert [54]. In einer kürzlich durchgeführten Studie, die sich auf die initiale Interaktion zwischen PRF und KM konzentrierte, wurde gezeigt, dass die Kombinationen von PRF und drei verschiedenen Schweine-KM zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von Wachstumsfaktoren nach 24 Stunden in vitro im Vergleich zur nativen KM führten, auf einem ähnlich hohen Niveau wie bei reiner PRF. Darüber hinaus wurde in vivo nach 24 Stunden ein signifikant erhöhtes angiogenes Potenzial festgestellt [14].

2.4 Zentrifugationsprotokolle

Nach dem Protokoll von Choukroun et al., das auch in der aktuellen Studie verwendet wurde, besteht der nach der Zentrifugation entstandene PRF-Clot aus drei Teilen: einem roten Thrombus, der in Kontakt mit der Basis der roten Blutkörperchen steht, ein azelluläres Fibrinnetz und dem „Buffy coat“ als weißliche Linien, die der Ansammlung von Thrombozyten innerhalb der PRF-Fibrinmatrix entsprechen [16]. Da bestimmte Zelltypen in Abhängigkeit von der kumulativen Zentrifugalkraft unterschiedlich verteilt werden, wurden zahlreiche weitere PRF-Zentrifugationsprotokolle in der Vergangenheit diskutiert, die die optimale Zellverteilung innerhalb der Röhrchen und im anschließend hergestellten Clot zum Ziel haben. Dies ermöglicht es, die PRF-Membranen in unterschiedlicher Festigkeit ganz spezifisch für die jeweilige klinische Anwendung herzustellen [55].

Es gibt derzeit eine Vielzahl an Tischzentrifugen, die kommerziell zur Herstellung verschiedener PRF-Protokolle zu erwerben sind. Für jede Zentrifuge wurden jedoch verschiedene Vibrationsprotokolle festgestellt, die jeweils zur unterschiedlichen Zellgehalt und Aufbau der PRF-Membran führen [43]. In einer Studie von Ghanaati et

al. wurden Protokolle für Standard-Plättchenfibrin (S-PRF) (2700 U/min, 12 Minuten) und fortgeschrittenes, plättchenreiches Fibrin (A-PRF) (1500 U/min, 14 Minuten) nach Zentrifugation (PC-O2, Process for PRF, Nice, France) verglichen. Durch histologischen Zelnachweis und Messung der Zellverteilung wurden die Auswirkungen der Zentrifugalkraft auf die Verteilung von Zellen, die für die Wundheilung und Geweberegeneration relevant sind, untersucht. Monozyten, T- und B-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, CD34-positive Stammzellen und Blutplättchen wurden in den Fibrin-Clots immunhistochemisch untersucht. In beiden Gruppen konnten Thrombozyten nachgewiesen werden sowie T- und B-Lymphozyten, Stammzellen und Monozyten in der Umgebung des Buffy Coats. In der A-PRF-Gruppe wurden jedoch mehr Thrombozyten im distalen Teil des Clots, entfernt vom Buffy Coat, gefunden. Eine Verringerung der Drehzahl bei gleichzeitiger Erhöhung der Zentrifugationszeit führte in der A-PRF-Gruppe zu einer erhöhten Präsenz von neutrophilen Granulozyten im distalen Teil des Gerinnsels. In der S-PRF-Gruppe befanden sich die Neutrophilen hauptsächlich im Bereich der Erythrozyten-Buffy-Coat Grenzfläche. Neutrophile Granulozyten tragen zur Differenzierung von Monozyten in Makrophagen bei. Dementsprechend könnte eine höhere Präsenz dieser Zellen die Differenzierung von Makrophagen z.B nach der Implantation beeinflussen und A-PRF somit die Regeneration von Knochen und Weichgewebe mehr beeinflussen als S-PRF [55]. Miron et al. postulieren deshalb die Standardisierung der relativen Zentrifugalkräfte in PRF-Studien [56]. Außerdem konnten sie in einer Studie von 2020 belegen, dass PRF-Clots, die mit niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten (~ 200 g für 8 min) hergestellt wurden, eine höhere Konzentration gleichmäßig verteilter Blutplättchen enthielten, kleiner waren und über einen Zeitraum von 10 Tagen höhere Konzentrationen von Wachstumsfaktoren abgaben. Dies war unabhängig vom verwendeten Zentrifugationsgerät und wurde durchgängig bei allen drei Geräten beobachtet, die für die Untersuchung verwendet wurden. Interessanterweise zeigte sich außerdem, dass die verwendeten Zentrifugationsröhrchen im Vergleich zu den Zentrifugationsgeräten einen wesentlich größeren Einfluss auf die endgültige Größe der PRF hatten. Es wurde festgestellt, dass die verwendeten PRF-Röhrchen im Vergleich zu anderen handelsüblichen Röhrchen im Allgemeinen deutlich größere PRF-Clots produzierten [57]. Einen neuen Ansatz bietet das Protokoll zur Herstellung flüssiger PRF (i-PRF). Hierbei wird die relative Zentrifugalkraft nach dem Prinzip der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation reduziert (low speed centrifugation concept,

LSCC), was in autologen PRF-basierten Matrizen zu einem signifikanten und vor allem längerfristigen Anstieg der Leukozyten- und Thrombozytenzahl sowie der Wachstumsfaktorkonzentration (VEGF und TGF- β 1) führt. Die flüssigen PRF-basierten Matrizen zeigen hohes Regenerationspotential und wirken sich positiv auf die Wundheilung aus [58].

Nachdem es 2019 zu einem Mangel an handelsüblichen Glasröhrchen kam, waren die PRF-Anwender gezwungen mit Silika beschichtete Kunststoffröhrchen zu verwenden. Diese werden meist nur für diagnostische, statt therapeutischer Zwecke verwendet. Blutproben wurden untersucht, nach dem A-PRF-Protokoll zentrifugiert und danach die in der PRF-Matrix enthaltenen Siliziumdioxid-Mikropartikel quantifiziert. Unabhängig von der Röhrchenmarke und den einzelnen Spendern wurde festgestellt, dass signifikante Mengen an Siliziumdioxid-Mikropartikeln in die A-PRF-ähnliche Matrix eingebaut wurden, die folglich in die Implantationsstellen gelangten. Aufgrund der zunehmenden Daten zur Zytotoxizität von amorphem Siliziumdioxid ist nicht auszuschließen, dass solche A-PRF-ähnlichen Matrizen die Geweberegeneration durch Induktion von Entzündungen negativ beeinflussen. Als Schlussfolgerung empfehlen die Autoren nachdrücklich, für die PRF nur herkömmliche, glatte Glasröhrchen zu verwenden, wie sie auch in der vorliegenden Studie verwendet wurden [59].

2.5 Kollagenmembranen

Kollagen ist das wichtigste Strukturmaterial von Wirbeltieren und macht etwa 20-30 % der gesamten Körperproteine aus [60]. Es ist in Geweben vorhanden, die primär mechanische Funktion erfüllen. So befindet sich der Großteil des gesamten Körperkollagens in der Haut, Dermis sowie in Sehnen [61]. Kollagen gilt als eines der nützlichsten Biomaterialien und ist ein Strukturprotein mit hoher Biokompatibilität. Seine besonderen Eigenschaften, wie z. B. Zellaffinität und geringe Antigenität, haben Kollagen zum wichtigsten Rohstoff für medizinische Anwendungen gemacht. Dazu zählen die Verwendung von Kollagenschichten in der Augenheilkunde, Schwämmen für Verbrennungen und Wunden, Mini-Pellets, Gelformulierungen in Kombination mit Liposomen, Anwendung als Kontrollmaterial für die transdermale Verabreichung sowie Nanopartikel und Grundmatrizen für Zellkultursysteme. Außerdem wird es für das tissue engineering verwendet, einschließlich Hautersatz, Knochenersatzstoffe und künstliche Blutgefäße sowie -klappen. Biologisch abbaubar, wird es häufig als

Biomaterial in der regenerativen Medizin verwendet [62-65]. Hier findet es beispielsweise Anwendung bei hautverjüngenden Maßnahmen und als Wundauflage [66]. In der Zahnmedizin, vorwiegend in der Oralchirurgie, Parodontologie und Implantologie [67], wird es häufig in Form von Membranen genutzt, um verschiedene Kompartimente für die Defektheilung zu schaffen. Alle bestehen aus Fibroblasten als zellulären Bestandteil und aus einer hoch organisierten extrazellulären Matrix (ECM), die ihrerseits aus faserartigen Proteinen sowie einer amorphen Grundsubstanz mit Glykoproteinen, Wachstumsfaktoren und Wasser besteht. Kollagene sind die wichtigsten und am häufigsten vorkommenden Proteine der ECM. Das strukturelle Kennzeichen aller Kollagene ist die rechtsgängige Tripelhelix aus drei Polypeptid- α -Ketten (Homotrimere und Heterotrimere), von denen jede Kette sich wiederholende Aminosäuresequenzen mit Glycin enthält [68]. Die ECM dient als physische Stütze für Zellen, verleiht dem Gewebe seine strukturellen, mechanischen und biochemischen Eigenschaften und steuert das Zellverhalten durch Zell-Matrix-Interaktionen [69, 70].

Bis heute wurden 28 verschiedene Kollagenarten beschrieben, die aufgrund ihrer suprastrukturellen Organisation in verschiedene Klassen, eingeteilt werden [65, 71]. Die Fibrillen-bildenden Kollagene (Typen I, II, III, V, XI, XXIV und XXVII) sind dabei die am weitesten verbreitete Familie der Kollagentypen. Sie bilden das Hauptstrukturelement der ECM und verleihen dem Gewebe seine Zugfestigkeit. Die Kollagenfibrillen bestehen aus kovalent vernetzten Kollagenmolekülen mit einer Länge von ca. 300 nm Länge. Die partielle Überlappung der Kollagenmoleküle führt zur Anordnung im typischen axialen Bandenmuster, der sogenannten D-Periodizität. Parallele Fibrillen sind durch Proteoglykane miteinander verbunden, um Kollagenfasern zu bilden. Dabei sind die Fasern schnur- oder bandförmig geformt, verlaufen in einem wellenförmigen Verlauf und können einen Durchmesser von bis zu 100 μm erreichen. Die Größe und Form der Kollagenfasern hängen jedoch vom Gewebe und Organ ab [69, 71-73]. Kollagen zeichnet sich durch seine Fähigkeit aus, die Zelladhäsion, Zellproliferation und -differenzierung positiv zu beeinflussen [74, 75]. Diese Eigenschaft kann durch Zugabe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zusätzlich verstärkt werden [76].

Bei der gesteuerten Knochenregeneration (GBR) dienen Kollagenmembranen als okklusive Barriere, um das Einwachsen von gingivalem Weichgewebe in einen parodontalen oder knöchernen Defekt zu verhindern und so die Geweberegeneration

durch ungehinderte Proliferation und Differenzierung ortsspezifischer Progenitorzellen zu ermöglichen. Resorbierbare Barriere-Membranen sind so in der Lage, den regenerierenden Knochen zu schützen [68, 77, 78]. Die KM werden eingeteilt in synthetische und nicht synthetische, resorbierbare und nicht resorbierbare Membranen sowie einschichtige (Monolayer) oder mehrschichtige (Bi- / Polylayer) Membranen [79-81], wobei die Kollagene autogen, allogon oder xenogen gewonnen werden [82]. Die xenogenen, vom Tier gewonnenen meist bovinen (Rind) oder porcinen (Schwein), teils auch equinen (Pferd) KM liegen derzeit im Fokus des aktuellen Forschungsgeschehens [51].

Darüber hinaus ist Kollagen in der Lage, Blutplättchen zu binden und so die Gerinnungskaskade zu aktivieren [83]. Diese Eigenschaften sind beim Einsatz in der akuten Wundversorgung besonders von Vorteil [78]. KM erlauben außerdem anderen regenerativen Zellen eine Neubesiedelung des Areal und somit die Förderung der Wundheilung [9]. Als 3D-Strukturen z.B. in Form von Gewebetransplantaten, Biomaterialien oder zellorganisierten Gewebeäquivalenten haben sie die Fähigkeit, lokal und nachhaltig lebensfähige Zellpopulationen und / oder bioaktive sowie therapeutische Moleküle für Regenerationsprozesse zu liefern [8]. Im Allgemeinen werden Komponenten wie Stammzellen, Zytokine und Wachstumsfaktoren verwendet, die in die dreidimensionalen Strukturen eingebettet werden, um das verletzte Weich- und Hartgewebe zu replizieren und wiederherzustellen [10].

Die Membranen können jedoch auch als Barriere für neu einsprossende Gefäße wirken und somit zu einer unzureichenden Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bis hin zur Nekrose führen [10]. Um dieser klinischen Einschränkung entgegenzuwirken, konnten die proangiogenen Eigenschaften der Membranen durch autologe Thrombozytenkonzentrate optimiert werden [13]. Durch Biofunktionalisierung xenogener Kollagenmembranen mittels PRF, konnte die Angiogenese und Vaskularisierung in vivo und in vitro bereits in vorherigen Studien signifikant gesteigert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsfaktoren in einem ähnlich hohen Level wie bei reiner PRF freigesetzt werden [14, 15]. In der vorliegenden Studie sollen KM bovinen und porcinen Ursprungs und deren Biofunktionalisierung mittels PRF ebenfalls im Hinblick auf die Angiogenese untersucht werden.

2.6 Rehydrierung

Bei der Verwendung von Kollagenmembranen stellt die Wahl des geeigneten Rehydrierungsprotokolls eine weitere Herausforderung dar. Die Empfehlungen der Hersteller zum Rehydrationsmedium und deren Dauer sind oft vage und beruhen in erster Linie auf klinischer Erfahrung, nicht auf wissenschaftlicher Evidenz [21]. Bei der Herstellung der KM werden die Gewebe so verarbeitet, dass alle zellulären Bestandteile, Proteine und Desoxyribonukleinsäure (DNA) entfernt werden. Die Restmatrix besteht lediglich aus Kollagen, Elastin und Gefäßkanälen. Nach zusätzlicher Gefriertrocknung entsteht eine völlig dehydrierte, steife Gewebestruktur, die vor der klinischen Anwendung rehydriert werden muss. Dies kann Sekunden bis Minuten in Anspruch nehmen, je nach Art der Membran und der gewünschten Anwendung bzw. Flexibilität [21, 51].

Bottino et al. berichteten über deutliche Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften der KM mit zunehmender Rehydrationsdauer in warmer Kochsalzlösung. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Rehydratation mindestens 20 Minuten vor der Implantation erfolgen sollte, um die durch den Gefriertrocknungsprozess verloren gegangene Kollagenstruktur, und die biomechanischen Eigenschaften wiederherzustellen. Es scheint von großer Bedeutung zu sein, dass die Integrität der Gewebematrix nach der Rehydratation erhalten bleibt, um die physiologische Reaktion des Wirts und den Umbau der Gewebematrix zu fördern. Ein weiterer wichtiger Aspekt für die klinische Anwendung sind die optimale Handhabung und mechanischen Eigenschaften nach der Rehydrierung [84]. Daher wurde die Frage aufgeworfen, ob unterschiedliche Rehydrierungsprotokolle diese beeinflussen können. In einer Studie von Kasaj et al. wurde das mechanische Verhalten von drei verschiedenen porcinen KM nach unterschiedlichen Rehydrationszeiten in Kochsalzlösung und frischem menschlichem Blut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Membranen unter trockenen Bedingungen die höchste Zugfestigkeit und das höchste Elastizitätsmodul aufweisen, was beides nach der Rehydrierung deutlich abnahm. Hydratationszeiten von 10-20 Minuten führten zu einem optimalen mechanischen Verhalten und einer regelrecht hydratisierten Matrix [21]. Als Medien werden oft Natriumchlorid (NaCl) oder Blut verwendet. Durch den Vorgang der Rehydrierung wird neben der Veränderung der Flexibilität auch eine gewisse Anhaftung die Defektregion erzielt. Zudem können

potentielle Kontaminationen vor klinischer Anwendung durch Reinigung mit Kochsalzlösung verringert werden [51].

Im Hinblick auf die pro-angiogenen Vorteile der Kombination von PRF und KM könnte die PRF-Inkubation auch als Methode zur angemessenen Rehydrierung der jeweiligen KM vor deren klinischer Verwendung dienen. Bislang scheint jedoch nicht geklärt, ob sich der pH-Wert der KM während des Rehydrierungsprotokolls je nach gewähltem Inkubationsmedium (Kochsalzlösung, Blut oder autologe Thrombozytenkonzentrate) ändert, z. B. durch Auswaschen chemischer Rückstände [85]. Der pH-Wert ist definiert als Maß für den Grad, in dem eine Lösung sauer oder alkalisch ist (Skala von 0 bis 14). Im Blut können die pH-Werte zwischen 7,35 und 7,45 schwanken [86]. Da Säure bzw. Alkalität die Wundheilung über die Regulierung der Angiogenese, der Kollagenbildung und der zellulären Aktivität von Makrophagen beeinflussen kann [85], könnte die Kombination von KM mit PRF nicht nur direkt pro-angiogene Wirkungen haben, sondern auch indirekt die Blutgefäßbildung während des Rehydrierungsprozesses beeinflussen, wenn PRF für die KM-Inkubation verwendet wird. Der pH-Wert scheint somit direkte Auswirkungen auf die Neovaskularisierung zu haben [22].

3. Material und Methoden

3.1 Material- und Geräteliste

Material	Hersteller
Alpha rabbit 488 (1:100)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Antikörper A2547 Mouse (1:1000)	Firma Sigma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa Aqua ad iniectabilia	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Germany
Bio-Gide®-Membran	Geistlich Biomaterials Vertriebsgesellschaft mbH, Baden-Baden, Germany
CD105 Anti chicken 1.750 Antikörper	Biorbyt, Cambridge, England
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)(1:1000)	ThermoFischer, Waltham, MA, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Eukitt	Firma Sigma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluoreszenz Mount Medium	Dako S3023; Dako, Jena, Germany
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Heparin	25.000 IU /5 ml Lösung; LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Kochsalzlösung (NaCl)	B. Braun Medical AG, Sempach, Germany
Leghorn-Hühnereier	LSL Rhein-Main, Dieburg, Deutschland
Leukotape	BSN Medical, Hamburg, Germany
Objektträger	Diagonal GmbH&Co. KG, Münster

Parafilm	Bemis Company, USA
Paraffin	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Peroxidase-Block 5	Dako, Jena, Germany
Phosphatgepufferte-Salzlösung	PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS/BSA 5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS/Goat NS	Dako, Jena, Germany
Polymer-HRP anti-Mouse	Dako, Jena, Germany
pH 7-Pufferlösung	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
Roti®-Histofix 4,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Symbios® Kollagenmembran	Dentsply Sirona Deutschland GmbH, Bensheim, Germany
Triton-X-100 0,1 %	10ml PBS + 10 µl Triton-X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vacutainersysteme	A- und i-PRF+; Process for PRF, Nizza, Frankreich
weighing paper	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Xylol (ROTI®Histol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

Tabelle 1: Materialien

Geräte	Hersteller
Brutkasten	Janneschitz, Hammelburg
Duo-Zentrifuge	Process for PRF, Nizza, Frankreich
heißes Wasserbad (40 °C)	Firma Grünewald
HistoCare-Autocut	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Mikroskopie und Histologie, Germany
Keyence Biorevo BZ-9000 Mikroskop	Keyence, Neu-Isenburg, Germany
Keyence Digital Microscope VHX-1000 HDR	Keyence, Neu-Isenburg, Germany
pH-Meter CG840	Schott, Mainz, Deutschland
PRF-Box	Process for PRF, Nizza, Frankreich

Tabelle 2: Geräte

3.2 Kollagenmembranen

Die Symbios® Kollagenmembran (Dentsply Sirona Deutschland GmbH, Bensheim, Germany) ist eine langsam, biologisch resorbierbare, weiße Matrix aus Typ I Kollagenfasern, hergestellt aus der Achillessehne von Rindern. Indiziert sind diese Art von Membranen für chirurgische Dentaleingriffe. Sie werden zur Unterstützung der Wundheilung um Implantate, in Bereichen um Knochendefekte oder bei Rekonstruktion des Kieferkamms verwendet [87].

Die Kollagenmembran von Geistlich, Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials Vertriebsgesellschaft mbH, Baden-Baden, Germany) ist porcinen Ursprungs, ohne künstliche Vernetzung, die dem menschlichen Kollagen sehr ähnlich ist. Die Membran verfügt über eine natürliche Bilayer-Struktur aus Schweineperitoneum mit einer guten Flüssigkeitsaufnahme, die die Proliferation von Fibroblasten und Osteoblasten in seine poröse Struktur ermöglicht. Sie fördert eine zuverlässige Knochenregeneration und

eine optimale Gewebsintegration aufgrund einer angemessenen Barrieredauer. Das Weichgewebe heilt ohne Narbenbildung und weitgehend ohne Komplikationen [88, 89]. Jede Membran wurde unter sterilen Bedingungen mit einem sterilen Skalpell in einer Größe von 4 × 4 mm (\pm 0,1 mm) präpariert. Die Parameter wurden mit einem sterilen Messschieber kontrolliert.

3.3 Methoden

3.3.1 Herstellung von platelet-rich-fibrin (PRF)

Zur Herstellung von PRF in der vorliegenden Studie wurde venöses Blut von zwei gesunden Probanden entnommen, die schriftlich ihr Einverständnis erteilten [38]. Nach der Blutentnahme mittels speziellen Vacutainersystemen (A- und i-PRF+; Process for PRF, Nizza, Frankreich) mit einem Volumen von 10 ml, wurden diese sofort gemäß Protokoll in die Zentrifuge gestellt (1200 rpm für 8 min, relative Zentrifugalkraft 177 g bei einem festen Winkelrotor mit einem Radius von 110 mm; Duo-Zentrifuge, Process for PRF, Nizza, Frankreich). Der stabile PRF-Clot konnte danach mit der entsprechenden PRF-Box (Process for PRF, Nizza, Frankreich) 60 s lang manuell gepresst und mit einem sterilen Skalpell unter sterilen Bedingungen in 4 × 4 mm große Stücke geschnitten werden. Zur Biologisierung der Kollagenmembranen wurden Bio-Gide® und Symbios® - KM zusammen mit den PRF-Membranen gepresst. Insgesamt wurden folgende Proben analysiert: native Bio-Gide®-Membran (BM), native Symbios®-Membran (SM), Kombination aus PRF und Bio-Gide®-Membran (BBI), Kombination aus PRF und Symbios®-Membran (SBI) und reine PRF. Alle Verfahren wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Nr. 2019-14705_1).

3.3.2 Rehydratation und Messung des pH-Wertes

Um Änderungen des pH-Werts, während der Rehydrierung der Kollagenmembranen zu testen, wurden diese 20 Minuten lang mit folgenden Medien (jeweils 5 ml) inkubiert: venösem Blut, Pufferlösung mit einem festen pH-Wert von 7, Kochsalzlösung (NaCl) und PRF. Folgende Gruppen wurden dabei analysiert: native Kochsalzlösung, Kochsalzlösung mit Bio-Gide®-Membran, Kochsalzlösung mit Symbios®-Membran,

native pH-7-Lösung, pH-7-Lösung mit Bio-Gide®-Membran, pH-7-Lösung mit Symbios®-Membran, native PRF, PRF mit Bio-Gide®-Membran, PRF mit Symbios®-Membran, natives Blut, Blut mit Bio-Gide®-Membran, Blut mit Symbios®-Membran. Der pH-Wert wurde alle 5 Minuten mit einer Glas-pH-Elektrode (pH-Meter CG840; Schott, Mainz, Deutschland) gemessen. Um eine Gerinnung des venösen Blutes zu vermeiden, wurden 2 ml Heparin zugesetzt (25.000 IU /5 ml Lösung; LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland). Vor jedem Test wurde eine Kalibrierung mit Pufferlösungen des pH-Werts 4 und 7 durchgeführt. Der Versuch wurde neunmal pro natives Medium und deren Kombination mit den verschiedenen Membranen wiederholt.

3.3.3 Yolc sac membrane Assay zur Quantifizierung von Gefäßen und Verzweigungspunkten

Die Studie umfasst eine Stichprobe mit einer Fallzahl von N= 135 befruchteten Leghorn-Hühnereier (LSL Rhein-Main, Dieburg, Deutschland). Pro Gruppe (native Bio-Gide®-Membran (BM), native Symbios®-Membran (SM), Kombination aus PRF und Bio-Gide®-Membran (BBI), Kombination aus PRF und Symbios®-Membran (SBI), reine PRF und Negativkontrolle) konnten jeweils 9 Proben eingeschlossen werden.

Es wurde ein Versuchsprotokoll konzipiert, nach welchem bei jeder Versuchsreihe gleichermaßen vorgegangen wurde. Die Eier wurden zunächst mit destilliertem Wasser (Aquadest) gereinigt, am spitzen Pol markiert und durchnummeriert. Danach wurden sie in einem Brutkasten bei einer Temperatur von 37,5 °C bebrütet. Drei Tage nach Bebrütung wurden die Eier erneut gereinigt und ein durchsichtiger Klebestreifen an die markierten Pole angebracht. Der Länge nach wurden zwei weiße Fixierpflaster (Leukotape) überlappend aufgeklebt. Mit einer Einmalspritze wurden jeweils 8-10 ml Eiklar am markierten Pol entnommen und dieser wieder mit durchsichtigem Klebestreifen verschlossen, um Verunreinigungen zu vermeiden. In die mit Fixierpflaster bedeckte Oberfläche der Eier wurde mittels einer sterilen Schere eine ovale Öffnung geschnitten, die danach mit einer dehnbaren, durchsichtigen Folie (Parafilm) verschlossen wurde. Anschließend wurden die Eier zur weiteren Bebrütung in den Brutkasten zurückgelegt. Am darauffolgenden Tag wurden die zu testenden Membranen in 4 x 4 mm große Stücke geschnitten und mittels steriler Pinzette auf die yolc segment membrane, embryofern, in der Nähe von Gefäßen eingelegt. Nachdem

die Eier mit Parafilm verschlossen waren, wurden sie zurück in den Brutkasten gelegt. Über die folgenden Tage wurde die Vaskularisation um die Membranen herum mit Hilfe eines digitalen Mikroskops (Keyance VHX-1000) zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) fotodokumentiert. Dabei konnte die Bildeinstellung optimiert werden und eine 50-fache sowie 100-fache Vergrößerung aufgenommen werden. Die Membranen wurden zusammen mit der YSM mit Hilfe einer sterilen Schere und Klemme entnommen, auf weighing paper gelegt und in eine Einbettkassette gelegt. Danach wurde jede Kassette in Roti®-Histofix 4,5 % eingelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Euthanasie der Embryonen nach den Experimenten durch Durchtrennung der Hauptgefäße schnell vonstattenging.

Im histologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universitätsmedizin Mainz wurde das in Roti®-Histofix 4,5 % fixierte Gewebe nach der Standardanweisung zur Paraffineinbettung zugeschnitten, in Einbettkapseln gebracht und in den Einbettautomaten überführt. Über Nacht führt der Automat folgende Schritte durch:

1. Entwässerung:

- 1 x 4,5 % Formaldehyd Roti®- Histofix 40 min bei Raumtemperatur
- 1x Ethanol 70 % für 60 min bei Raumtemperatur
- 2x Ethanol 96 % für 2 x 60 min bei Raumtemperatur
- 1x Ethanol 100 % für 2 x 60 min bei Raumtemperatur
- 3x Ethanol 100 % für 90 min bei Raumtemperatur

2. Intermedium:

- Xylol für 2 x 60 min bei Raumtemperatur
- Xylol für 90 min bei 45 °C

3. Einbettung:

- Paraffin 3 x 60 min, 30 min bei 65 °C

Die Präparate sind danach unbegrenzt haltbar und können zur histologischen Weiterbearbeitung und/oder Archivierung in kleine Blöcke gegossen werden. Das Gewebe wird dabei in die richtige Schnittrichtung gebracht und gekühlt. Die Blöcke werden danach mittels einem HistoCare-Autocut in 5 µm dicke Scheiben geschnitten.

Die Schnitte werden zuerst in ein kaltes Wasserbad aus Aqua dest. und im Anschluss in ein 40 °C heißes Wasserbad (Firma Grünewald) eingebracht, damit sie sich entfalten. Die Schnitte werden auf einen Objektträger übertragen und sind nach dem Trocknen bereit zur Färbung. Für immunhistologische Färbungen wurden beschichtete, für alle anderen Färbungen unbeschichtete Objektträger verwendet.

3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Vor der eigentlichen Färbung der histologischen Schnitte, wurden diese entparaffiniert. 3x5 min in Xylol, 2x5 min in 100 % Alkohol, 5 min 96 % Alkohol, 5 min in 70 % Alkohol, 5 min 50 % Alkohol und ca. 20 min in Aqua dest. Für die HE-Färbung wurden die Schnitte 5 min in Hämalan (1:10 verdünnt) gelegt, danach 10 min unter fließendes Leitungswasser und 1-2 min in Eosin. Nach kurzem Einwirken von Aqua dest. wurden die Objektträger in 70 % Alkohol und anschließend in 96 % Alkohol kurz geschwenkt. Danach wurden sie mindestens 5 min in 100 % Alkohol eingelegt sowie 5-10 min in Xylol. Mit Hilfe dünner Deckgläser und Eukitt wurden die Schnitte zuletzt eingedeckt. Das Ergebnis der Färbung zeigte blaue Kerne und rotes Plasma.

3.3.5 Anti-alpha smooth muscle Actin antibody(1A4) (SMA-Färbung)

Bei der SMA-Färbung wurde der Antikörper A2547 Mouse (1:1000 der Firma Sigma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet [11]. Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und dazu 3x15 min in Xylol gelegt. Danach wurden sie je 5-10 min in einer absteigenden Alkoholreihe eingebracht: 2x100 %, 96 %, 70 % und 50 % Ethanol. Danach kamen sie 20 min in Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Zur Demaskierung kamen die Schnitte 20-40 min in den Dampftopf, der mit Na-Citratpuffer pH 6 gefüllt war. Zu Beginn der Färbung wurden alle Schnitte mit PBS 10 min lang gewaschen, bevor der Peroxidase-Block 5 (Dako, Jena, Germany) min aufgetragen wurde. Nach weiterem 10-minütigem Waschen mittels PBS konnte der Dako Protein-Block für 10 min einwirken. Danach wurde der Primär-Antikörper aufgetragen. Nach 1 h Einwirkdauer wurde 10 min mit PBS gewaschen. Markiertes Polymer-HRP anti-Mouse (Dako, Jena, Germany) wurde danach auf die Schnitte gegeben und für 30 min darauf belassen. Nach 10 min Waschen im PBS kam für bis zu 10 min ein DAB-Substrat auf die Objektträger, woraufhin wiederum 10 min lang in PBS gewaschen wurde. Nach 5 min im Hämalan wurde 5 min lang fließendes Leitungswasser darüber gegeben und die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) behandelt. Nach 5 min im Xylol

konnten die Schnitte mit Hilfe von Eukitt und dünnen Deckgläschen eingedeckt werden.

3.3.6 Immunfluoreszenz CD 105 Anti-chicken Antibody (CD-105-Färbung)

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und dazu für 3x15 min in Xylol gelegt. Danach wurden sie je 5-10 min in einer absteigenden Alkoholreihe eingebracht: 2x100 %, 96 %, 70 % und 50 % Ethanol. Danach kamen sie 20 min in Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS). Laut Protokoll wurden folgende Schritte ausgeführt [14]:

- 3x5 min Waschen im PBS
- 5 min Triton-X-100 0,1 % (10ml PBS + 10 µl Triton-X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2x5 min PBS
- 5 min PBS/BSA 5 % blockieren (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2x5 min PBS
- 10 min PBS/Goat NS blockieren (Dako, Jena, Germany)
- 5 min PBS
- CD105 Anti chicken 1.750 Antikörper (Biorbyt, Cambridge, England) 1h RT (verdünnt mit PBS/BSA 1 %)
- 3x5 min PBS
- 60 min Alpha rabbit 488 1:100 (verdünnt mit PBS/BSA 1 %; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 3x5 min PBS
- 5 min DAPI (1:1000; ThermoFischer, Waltham, MA, USA)
- 3x5 min PBS
- Eindecken mit Fluoreszenz Mount Medium (Dako S3023; Dako, Jena, Germany).

3.4 Auswertung histologischer Schnitte der yolk sac membrane

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Keyence Biorevo BZ-9000 Mikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) und dem dazugehörigen BZII-Viewer-Analyzer Programm (Brightfield HF und Phako, Mikroskopposition 2 Plan Apo Na.10; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) untersucht und fotodokumentiert (Abb. 2) [17]. Dazu wurde unter „Observation“ das Programm „Brightfield HF und Phako“ ausgewählt. Der Schnitt wurde mit dem Deckglas nach unten eingelegt anschließend in der

dazugehörigen Applikation „BZII-Analyzer“ untersucht. Die Bilder wurden mit den Programmen Hybrid-Cell-Count und Brightfield & Single extraction ausgewertet. Dabei ergab sich über die Einstellung der Toleranz und Transparenz ein Verhältnis von stark gefärbten Arealen zu weniger stark angefärbten Arealen, woraus sich die Area ratio prozentual errechnen ließ. Diese wurde in einer Excel-Tabelle dokumentiert.

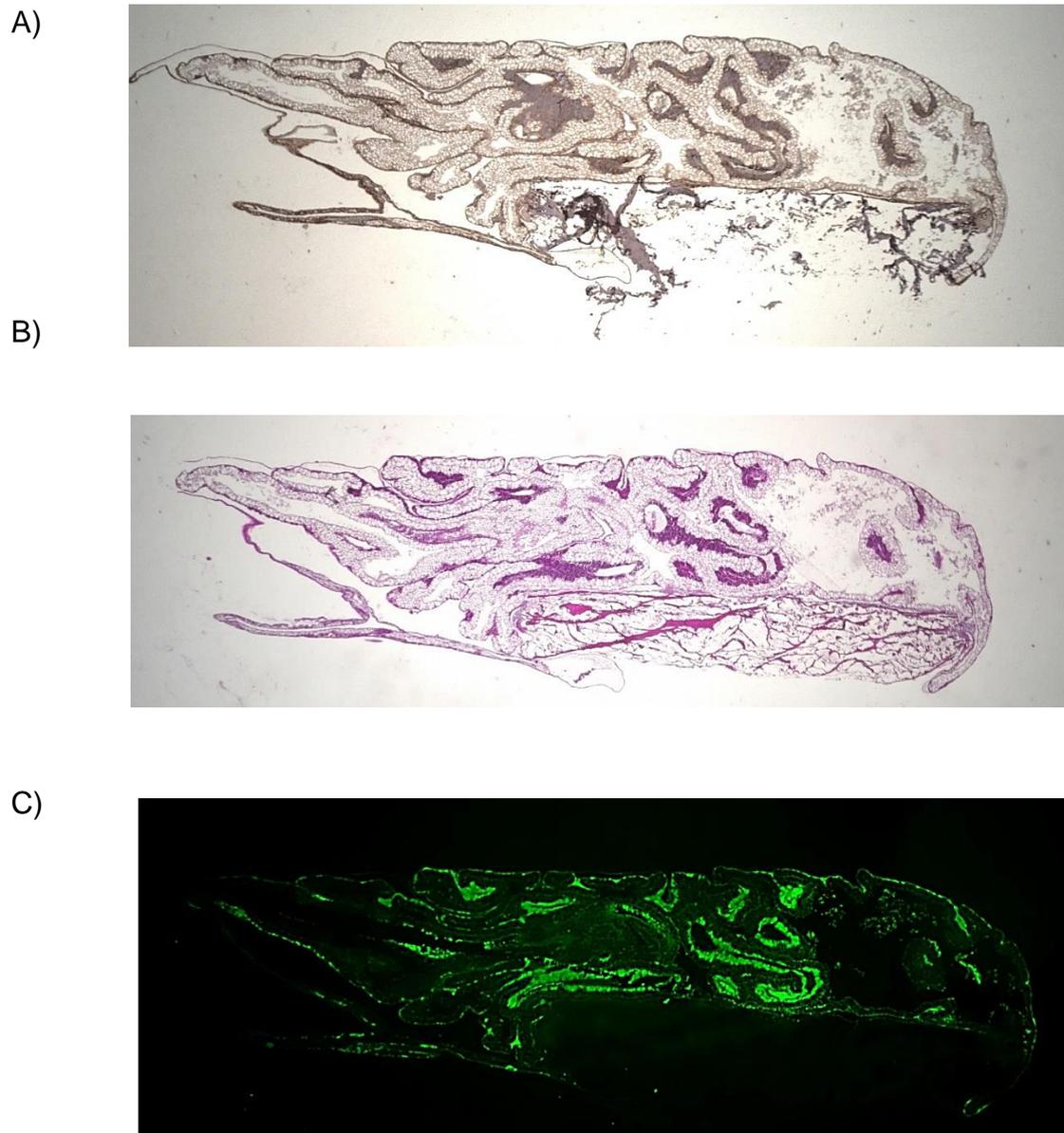


Abbildung 2: Beispiel einer immunhistochemischen Färbung, (A) α SMA, (B) HE, (C) CD 105. In 2-facher Vergrößerung nach Blatt et al. (2022) [1]

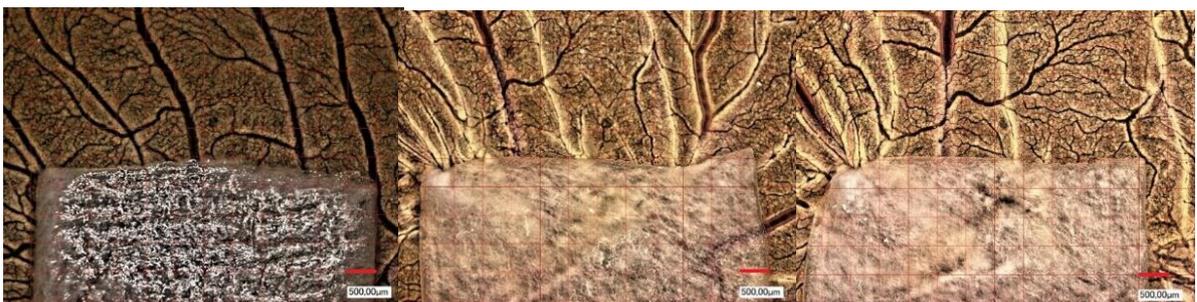
3.5 Fotodokumentation und Auswertung der Gefäße unter dem digitalen Mikroskop in vivo

Die pro-angiogenen Eigenschaften der jeweiligen KM (nativ und in Kombination mit PRF) im Vergleich zur reinen PRF und reiner YSM wurden in vivo bewertet. Für jede Versuchsreihe wurde ein standardisiertes Protokoll erstellt, wie zuvor beschrieben [22]. Die befruchteten Leghorn-Hühnereier (LSL Rhein-Main, Dieburg, Deutschland) wurden nach ihrer Reinigung, Präparation und Inkubation nach 24, 48 und 72 Stunden fotodokumentiert. Dazu wurde die Vaskularisierung in der Nähe der KM durch Zentrierung der Mitte der KM mit einem Digitalmikroskop bei 50- und 100-facher Vergrößerung (VHX-1000; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland, Abbildung 3) fotodokumentiert. Die gleiche „Region of Interest“ (ROI) von 500 × 500 µm wurde standardmäßig für jedes Experiment verwendet (N = 9 pro KM, insgesamt N = 135), die Anzahl der Gefäße und der Verzweigungspunkte pro mm² der ROI wurden mit der entsprechenden Software (CV-H1X Software; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland; Abbildung 4) analysiert. Nach 24, 48 und 72 h wurde die KM zusammen mit der YSM unter sterilen Bedingungen entfernt, um sie weiter aufzubereiten.

A)



B)



C)

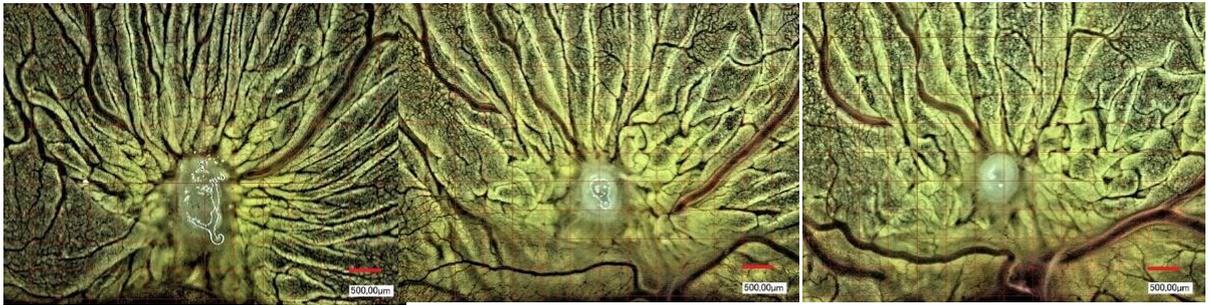


Abbildung 3: Beispielbilder der mikroskopischen Fotodokumentation A) Bio-Gide® Membran, B) Symbios® Membran C) PRF, zu 24, 48 and 72 h im YSM-Assay. In 50-facher Vergrößerung nach Blatt et al. (2022) [1]

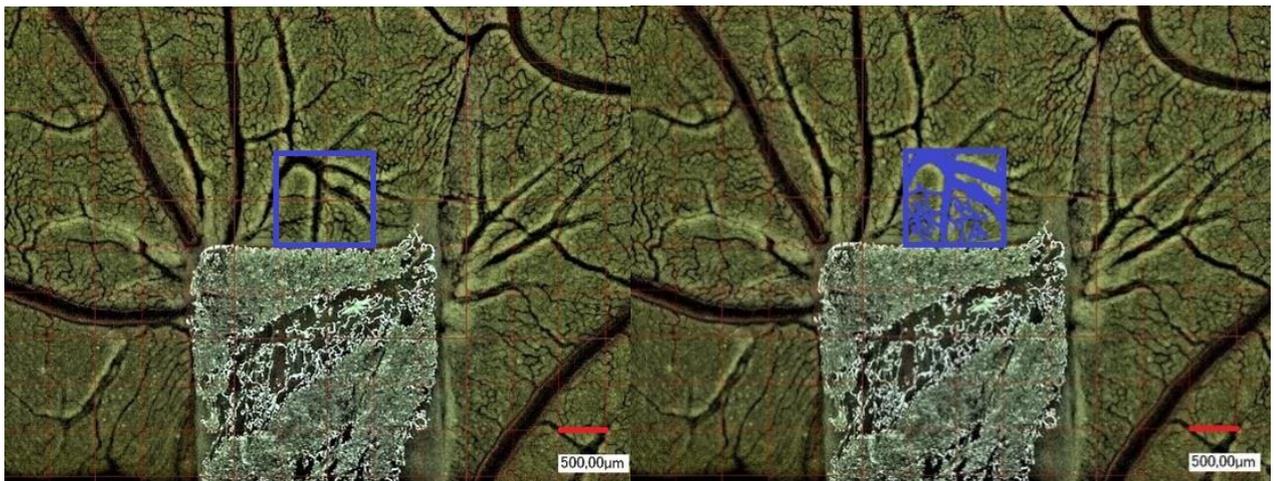


Abbildung 4: Beispiel zur mikroskopischen Analyse der Gefäße und Verzweigungspunkte. Nach Zentrierung der Membran wurde für jede Versuchsreihe standardmäßig die gleiche Region of Interest (ROI) von 500 × 500 µm verwendet. Die Anzahl der Gefäße und der Verzweigungspunkte (blau hervorgehoben) pro mm² der ROI wurden manuell gezählt. Vergrößerung: 50-fach. Nach Blatt et al. (2022) [1]

3.6 Statistische Analyse

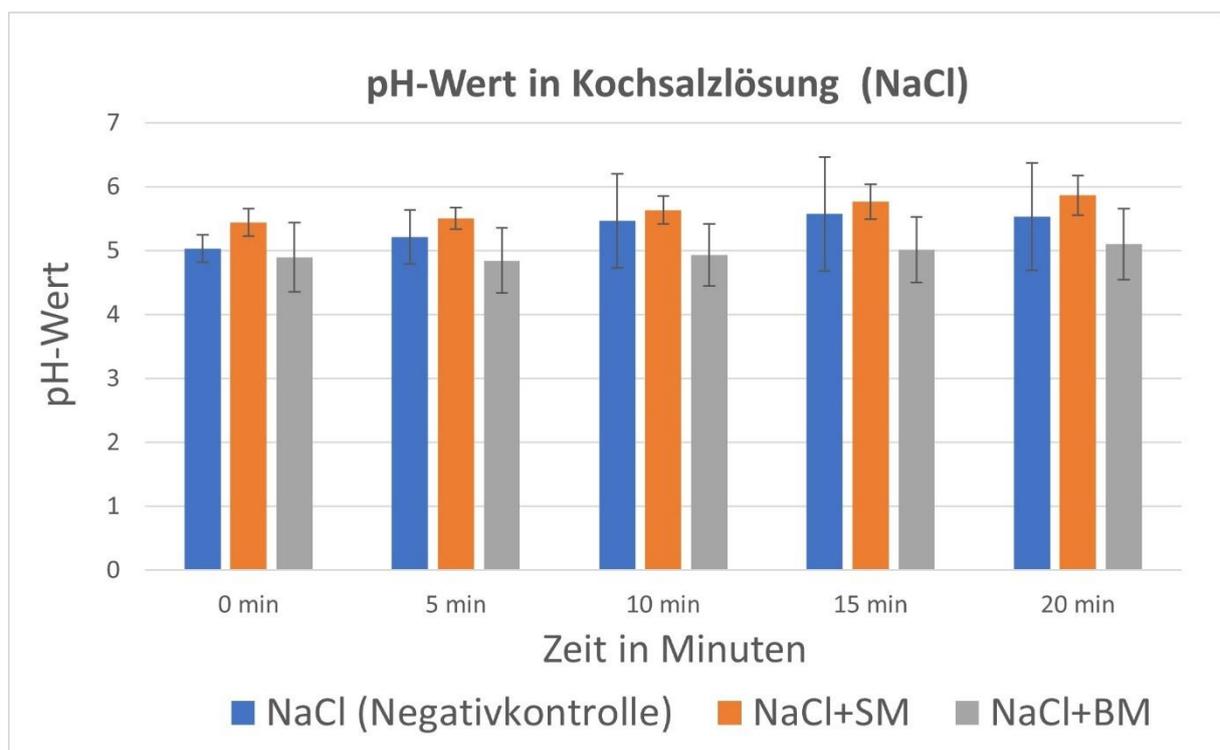
Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS (Version 27; IBM, Ehningen, Germany). Zunächst wurden ein Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um die Voraussetzungen für parametrische Tests zu prüfen. Dabei galten Werte als signifikant und normalverteilt bei $p > 0.05$. Anschließend konnten die Ergebnisse in Form von Boxplots grafisch dargestellt werden. Nachdem sich keine Normalverteilung zeigte, erfolgte die weitere Analyse mittels des Kruskal-Wallis-Test, um signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kollagenmembranen zu ermitteln. Außerdem sollten auch Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen im Zeitverlauf untersucht werden. Konnten Unterschiede nachgewiesen werden, wurden paarweise Vergleiche mittels einfaktorieller ANOVA nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Für die pH-Wert-Analyse wurde der Friedman-Test verwendet, um Unterschiede innerhalb der 20-minütigen Messungen zu ermitteln. Unterschiede zwischen den KM wurden ebenfalls mit einer einfaktoriellen ANOVA nach Kruskal-Wallis überprüft. Zur Veranschaulichung der Daten wurden Boxplots verwendet. p-Werte $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

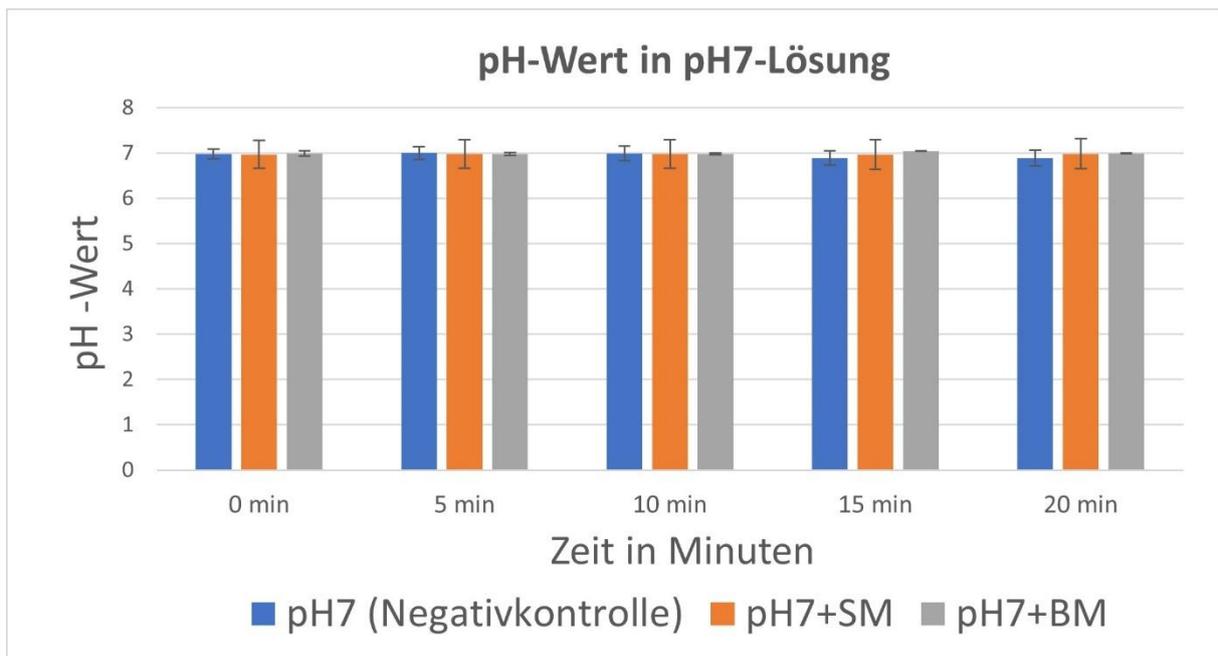
4.1 Ph-Wert Analyse

Der durchschnittliche pH-Wert betrug nach 20 Minuten in Kochsalzlösung 4,95 (\pm 0,451 SD), in pH-7-Lösung 6,98 (\pm 0,042 SD), in Blut 7,52 (\pm 0,082 SD) und in PRF 7,76 (\pm 0,115 SD). Die pH-Werte in der Kochsalzlösung und in der pH-7-Lösung blieben zu allen Zeitpunkten konstant, auch nach Zusatz der verschiedenen Membranen. Die PRF-Gruppe zeigte eine signifikante Abnahme des gemessenen pH-Wertes während der Beobachtungszeit von 20 Minuten (Symbios®: $p < 0.05$, Bio-Gide®: native PRF: $p < 0.001$). Blut in Kombination mit einer Symbios®-Membran zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied. Es wurde ein geringerer pH-Wert als in der nativen Form festgestellt ($p < 0.01$). Signifikant höhere Werte wurden zu allen Zeitpunkten in PRF und seinen kombinierten Varianten mit Bio-Gide® und Symbios® im Vergleich zur nativen Kochsalzlösung sowie zur Kochsalzlösung mit Symbios® und Bio-Gide® festgestellt (jeweils $p < 0.01$). Auch Blut zeigte im Vergleich zur Kochsalzlösung höhere pH-Werte im Zeitverlauf ($p < 0.05$). Darüber hinaus erreichte PRF im Vergleich zur pH-7-Lösung höhere pH-Werte im Verlauf ($p < 0.05$, Abbildung 5).

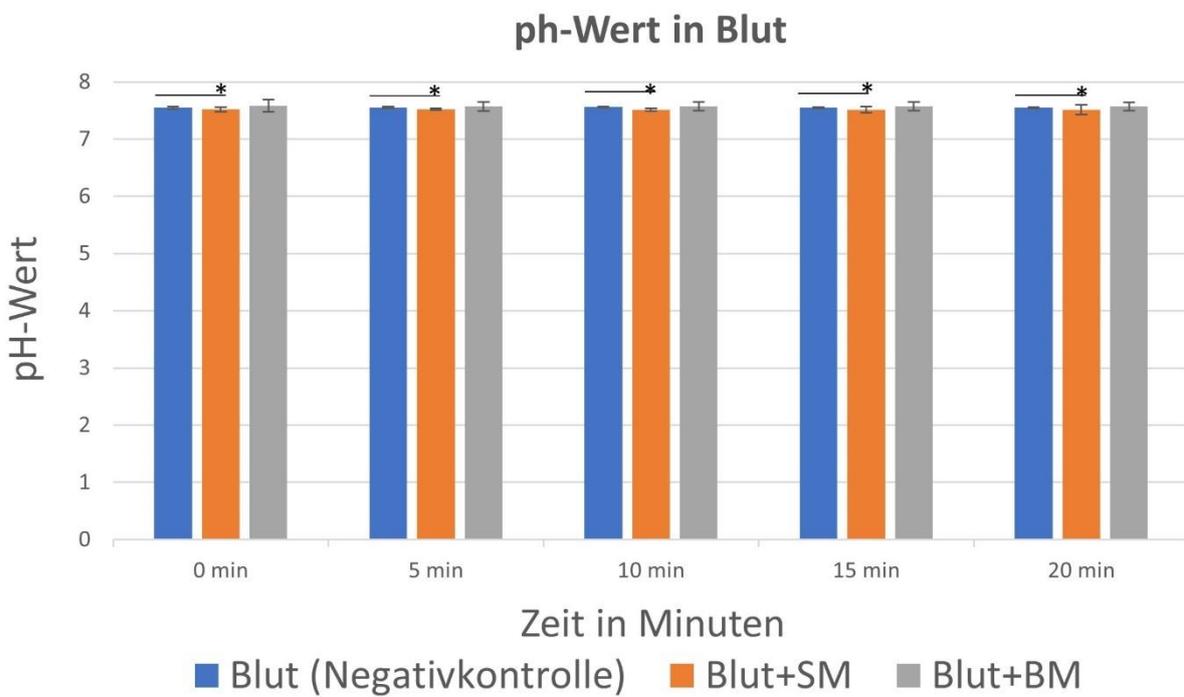
A)



B)



C)



D)

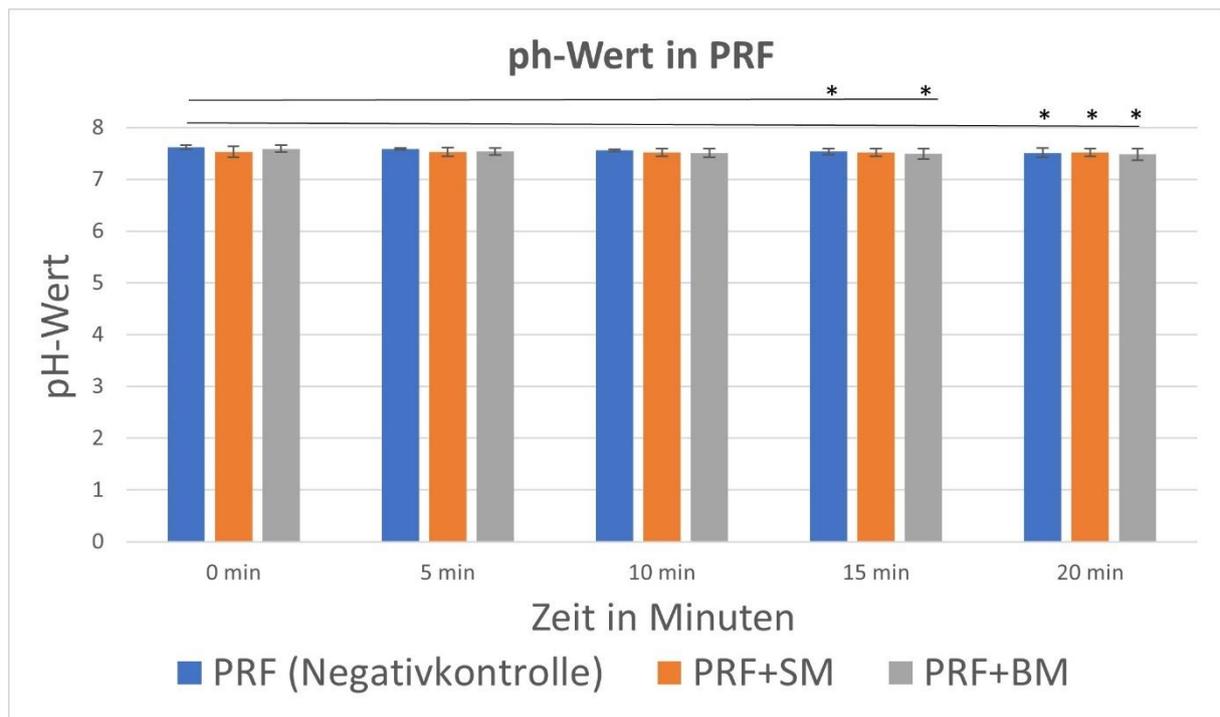
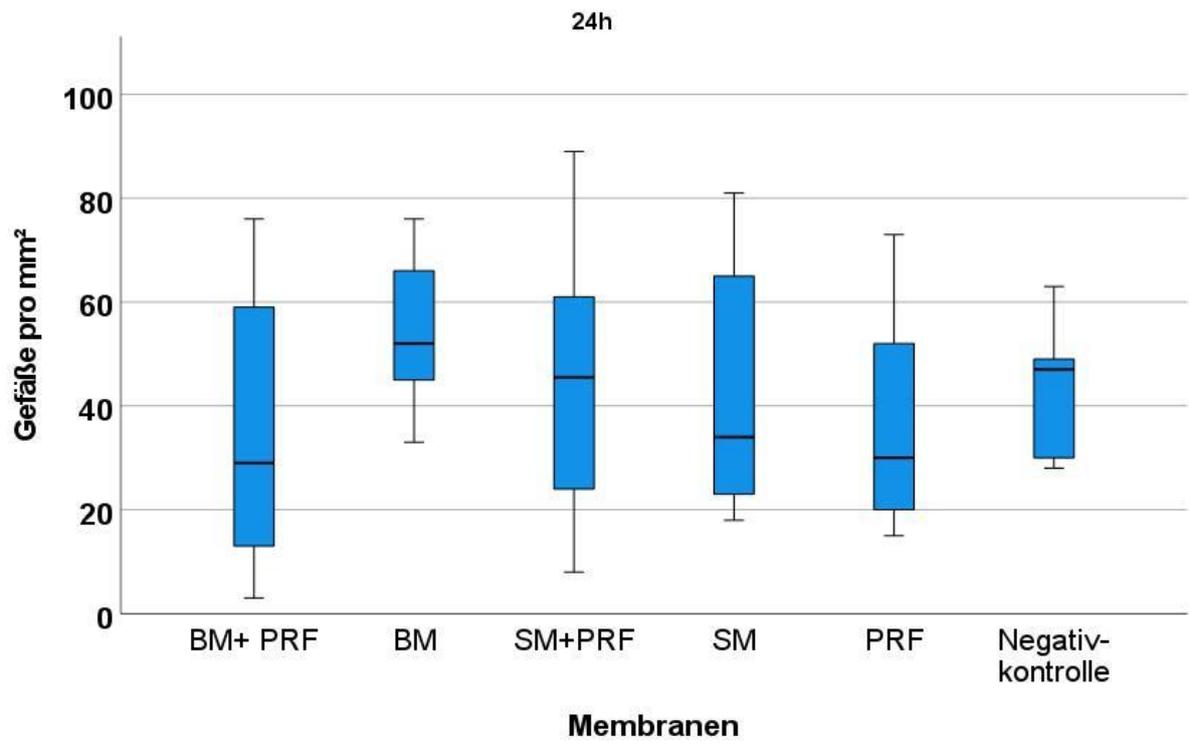


Abbildung 5: pH-Wert Veränderungen während der 20-minütigen Rehydratation der jeweiligen KM in verschiedenen Medien: (A) Kochsalzlösung, (B) pH7-Lösung, (C) Blut, (D) PRF. Blaue Säule: negative Kontrollmedien, orangefarbene Säule: Medien mit Symbios® (SM), graue Säule: Medien mit Bio-Gide® (BM). * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]

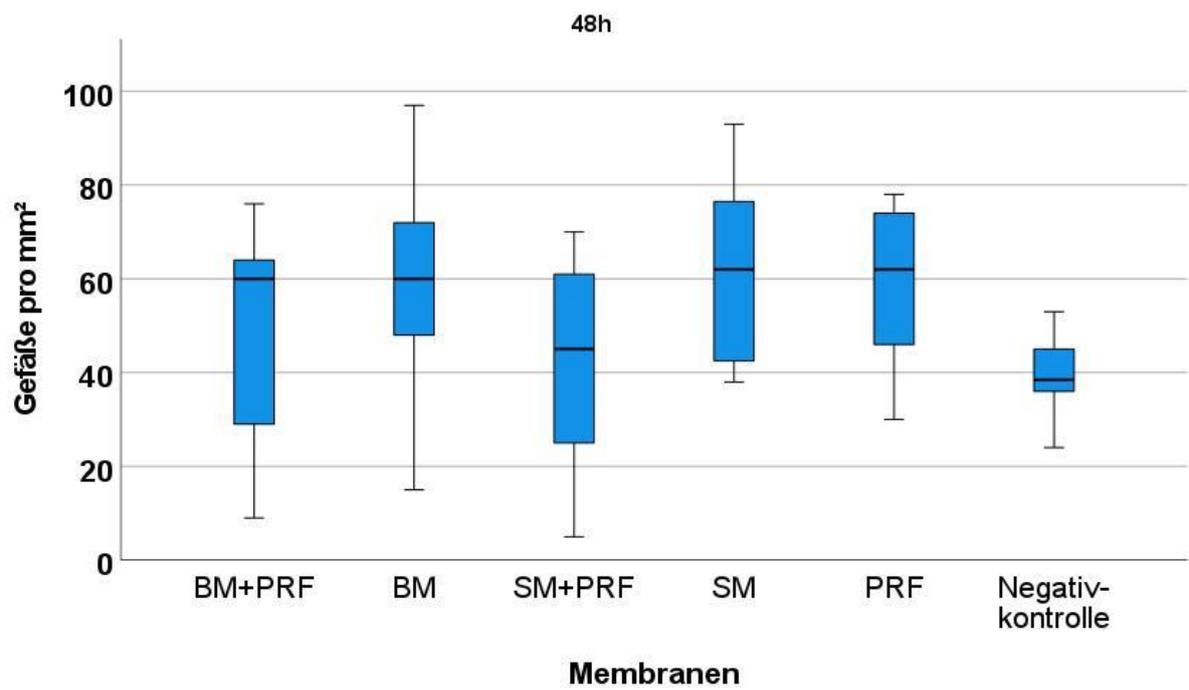
4.2 Yolk sac membrane Assay

Vergleicht man alle Gruppen (Negativkontrolle, KM in Kombination mit PRF, native PRF sowie native YSM) mikroskopisch miteinander, so zeigte die statistische Analyse der Gefäße (Abbildung 6) und Verzweigungspunkte (Abbildung 7) pro mm^2 keine signifikanten Unterschiede nach 24 und 48 Stunden Inkubation (jeweils $p > 0.05$). Nach 72 Stunden induzierte KM in Kombination mit PRF statistisch signifikant mehr Gefäße und Verzweigungspunkte pro mm^2 im Vergleich zur nativen YSM ($p < 0.01$), jedoch nicht im Vergleich zu ihren nativen Pendants ($p > 0.05$). Bei der aus Rindern gewonnenen Membran in Kombination mit PRF war jedoch ein nicht signifikanter, aber deskriptiver Anstieg der Gefäße und Verzweigungspunkte pro mm^2 im Laufe der Zeit zu verzeichnen. PRF allein konnte jedoch einen signifikanten Gefäßzuwachs und mehr Verzweigungspunkte pro mm^2 zwischen 24 und 48 h (jeweils $p < 0.05$) und zwischen 24 und 72 h (jeweils $p < 0.05$) erzielen.

A)



B)



C)

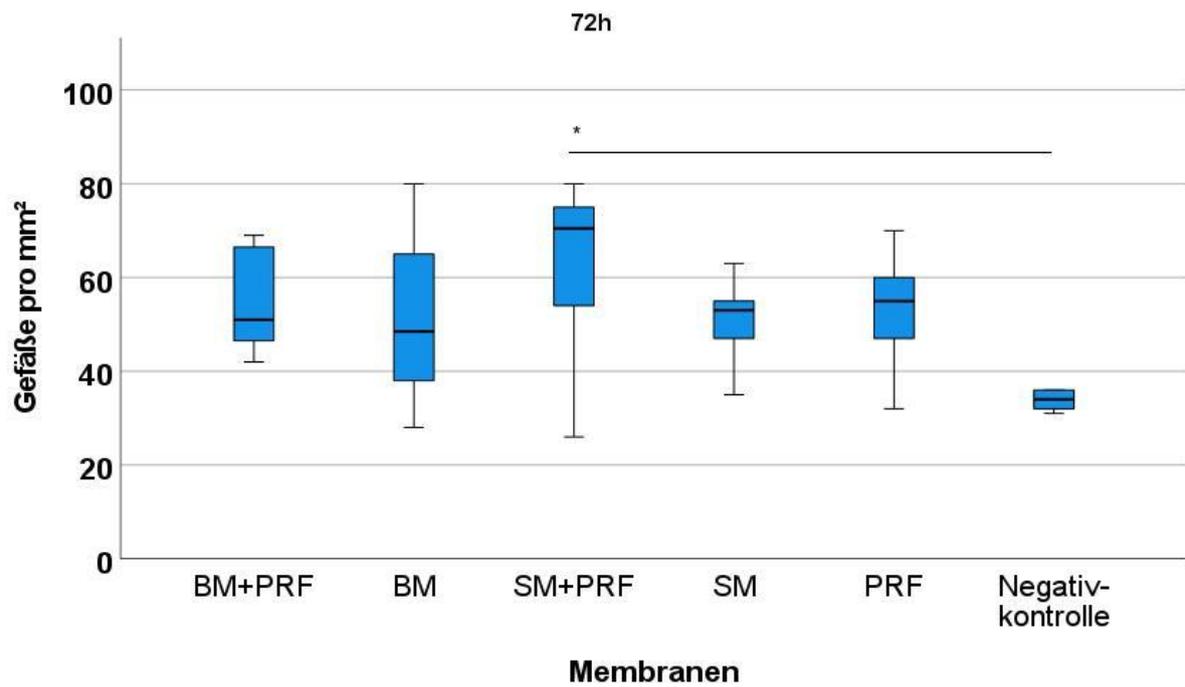
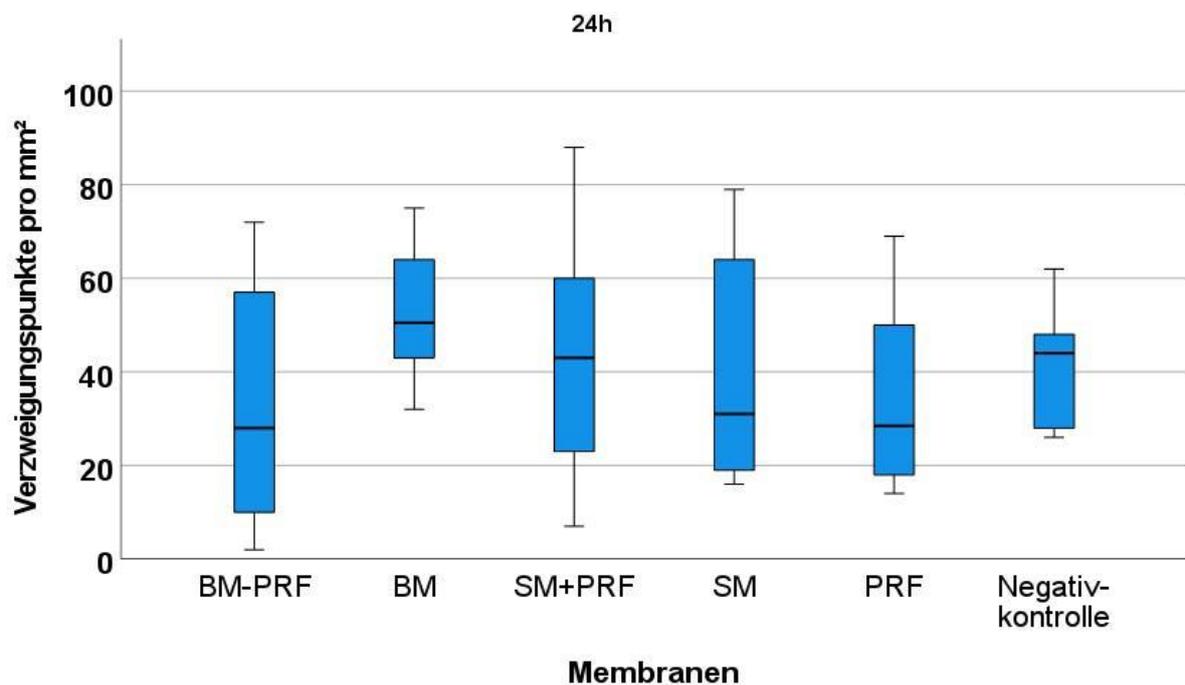
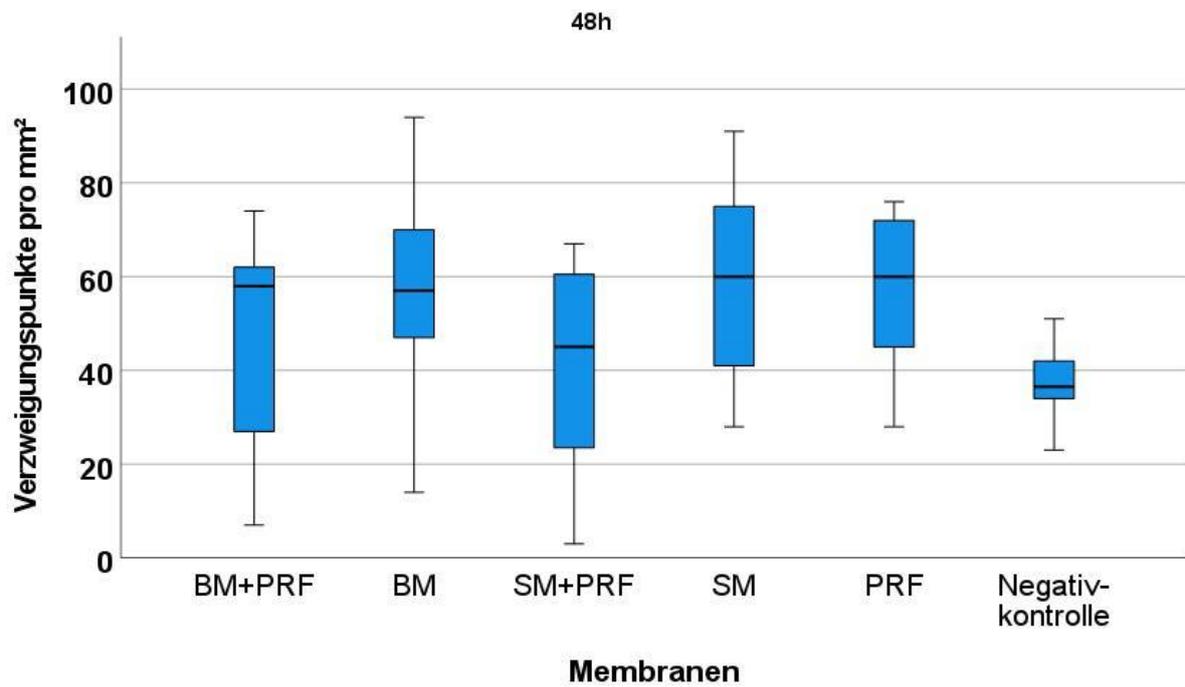


Abbildung 6: Analyse der Gefäße pro mm² für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®), PRF-Negativkontrolle. (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]

A)



B)



C)

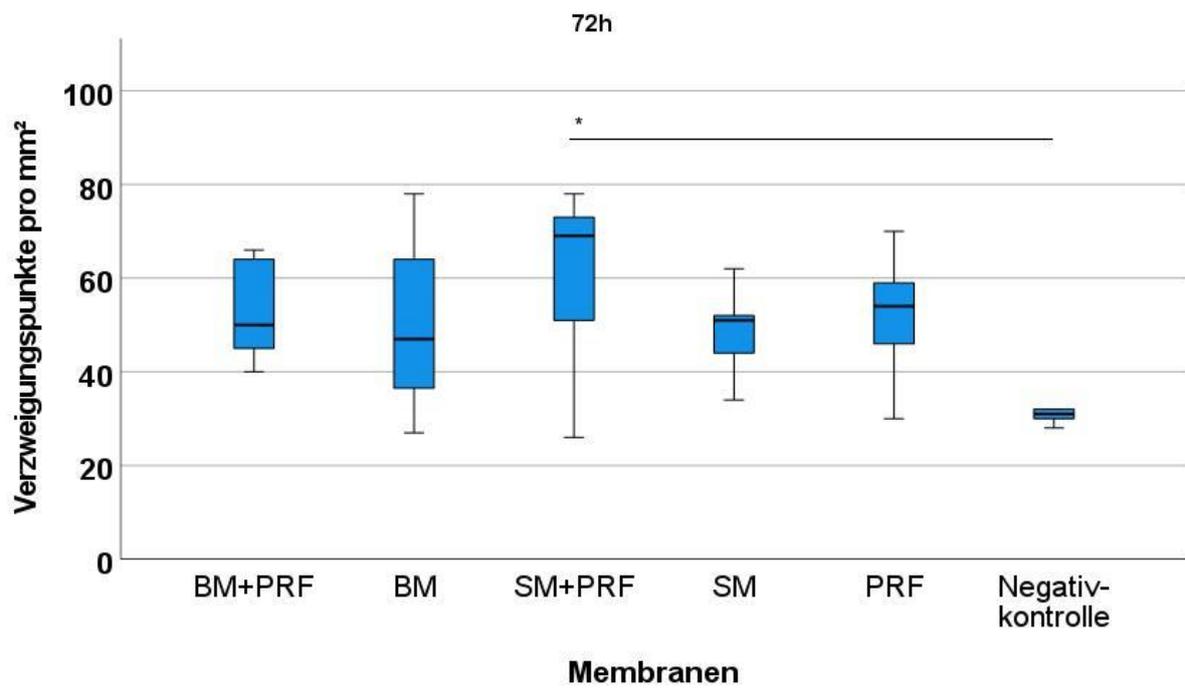
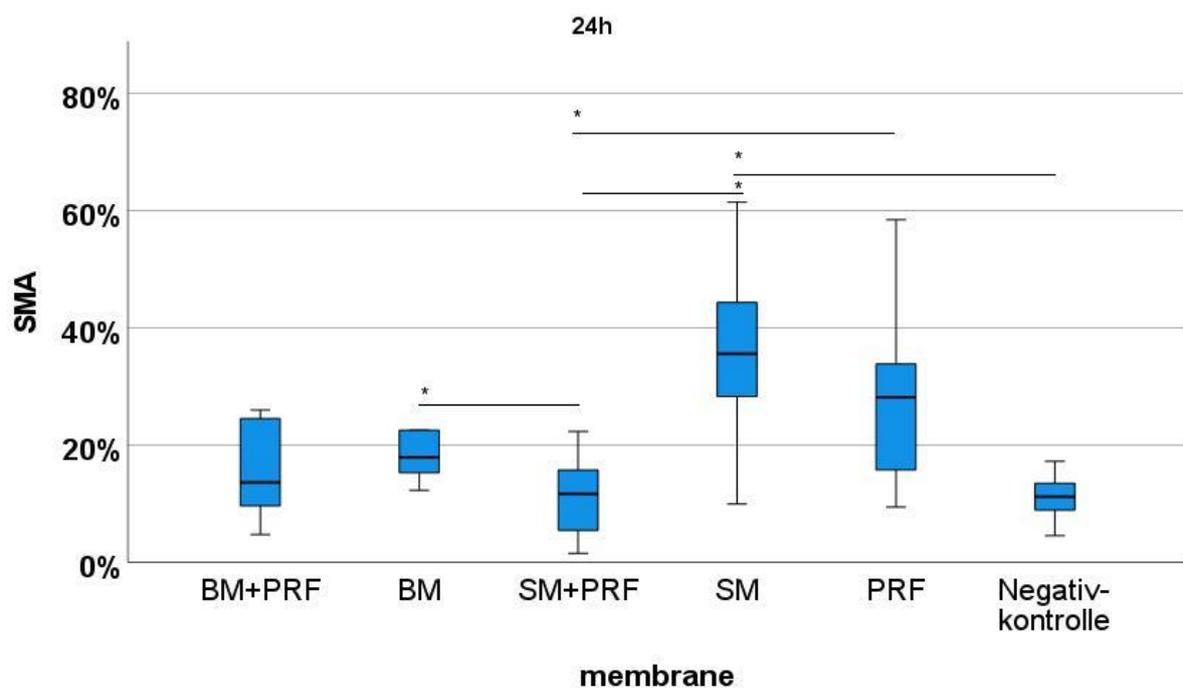


Abbildung 7: Analyse der Verzweigungspunkte pro mm² für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®), PRF-Negativkontrolle. (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1].

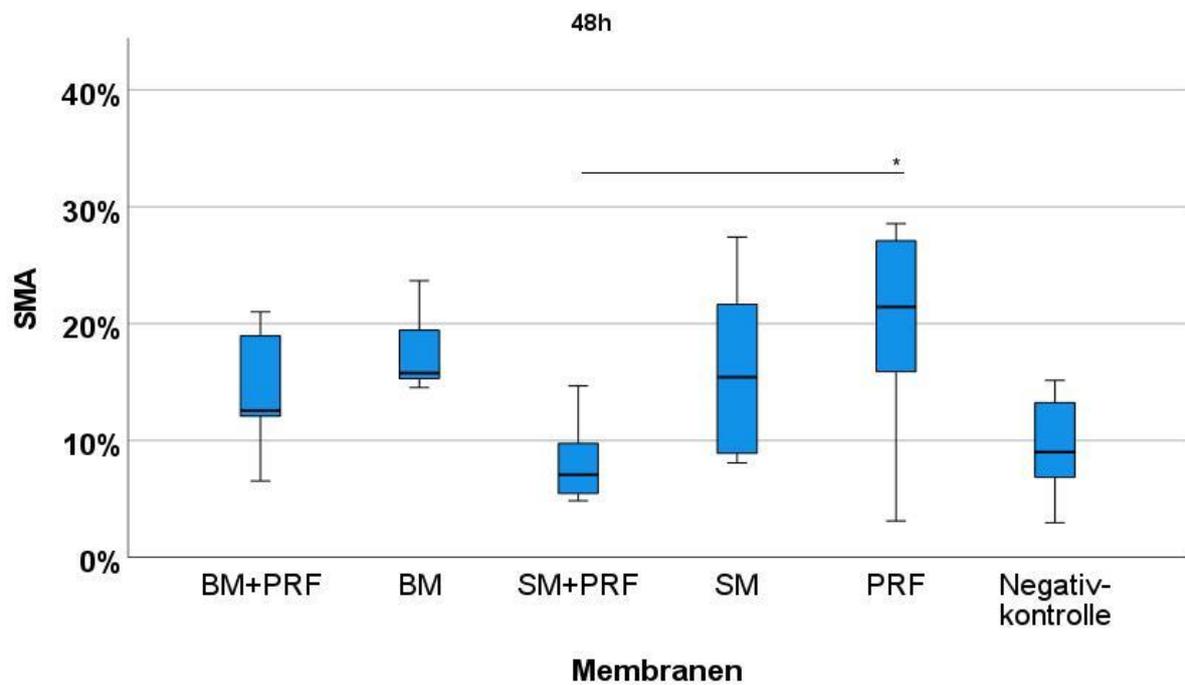
4.3 Immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemisch gefärbten Proben (Abbildungen 8 und 9) zeigten für reine PRF im Vergleich zur nativen YSM innerhalb von 24 h eine statistisch signifikante Zunahme der Gefäße in HE-, α SMA- und CD105- Färbungen (jeweils $p < 0,05$). Nach 72 h wurden für PRF allein im Vergleich zur nativer YSM statistisch mehr Gefäße in der CD105-Färbung gefunden ($p < 0,05$). Im Vergleich zur nativen YSM wurde bei nativer Rinder-KM eine signifikante Zunahme der Gefäßbildung bei CD105 ($p < 0,01$) und α SMA-Färbung ($p < 0,05$) nach 24 h festgestellt. Ebenso bei Rinder-KM in Kombination mit PRF (α SMA- und HE-Färbung zwischen 24 und 72 h, jeweils $p < 0,05$). Native Schweine-KM zeigte nach 24 h eine erhöhte Gefäßanzahl in der α SMA-Färbung im Vergleich zur biologisierten Rinder-KM ($p < 0,01$). Native Rinder-KM zeigte eine höhere Anzahl von Gefäßen in der CD105-Färbung im Vergleich zur biologisierten Schweine-KM ($p < 0,01$). Beim Vergleich zwischen reiner PRF und biologisierter Rinder-KM, konnte ein statistisch signifikanter Anstieg in der α SMA-Färbung ($p < 0,05$) und der CD105-Färbung ($p < 0,01$) nach 24 Stunden festgestellt werden, sowie CD105-Schnitten nach 48 Stunden ($p < 0,05$).

A)



B)



C)

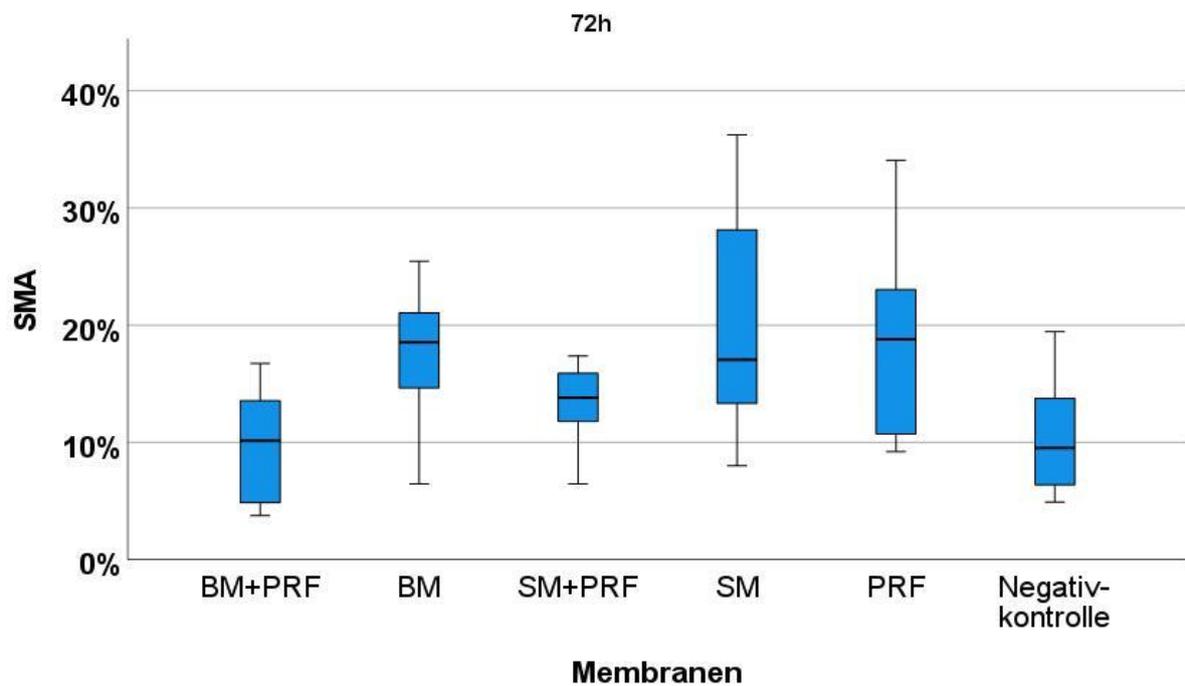
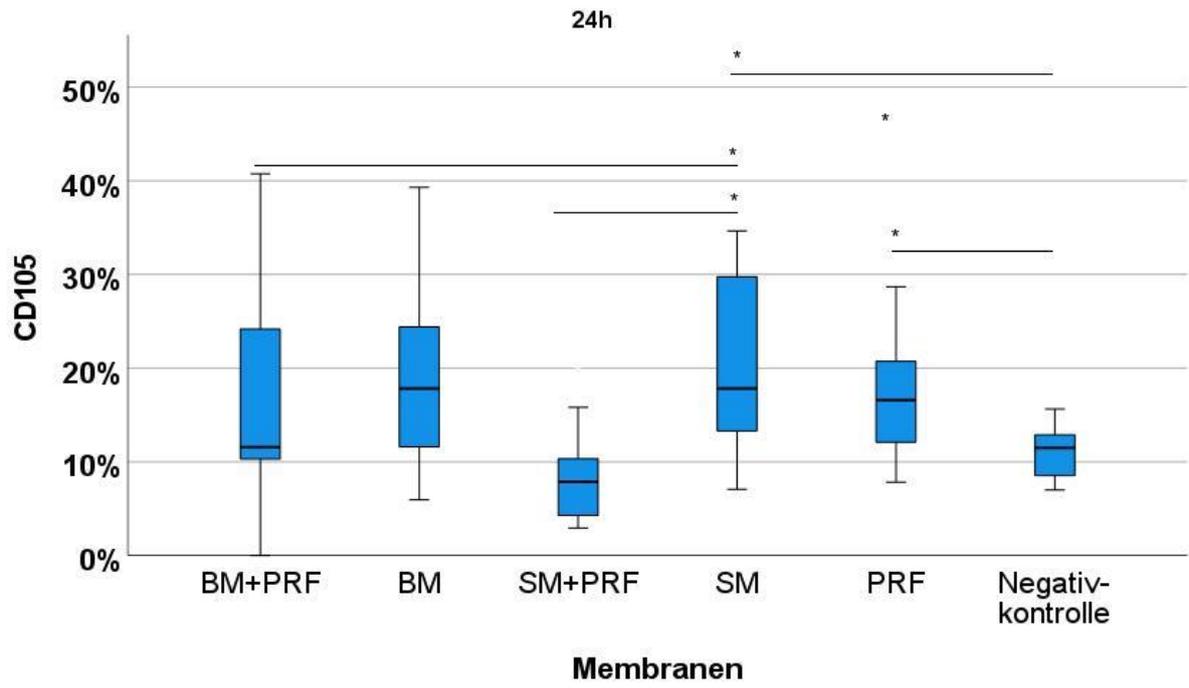
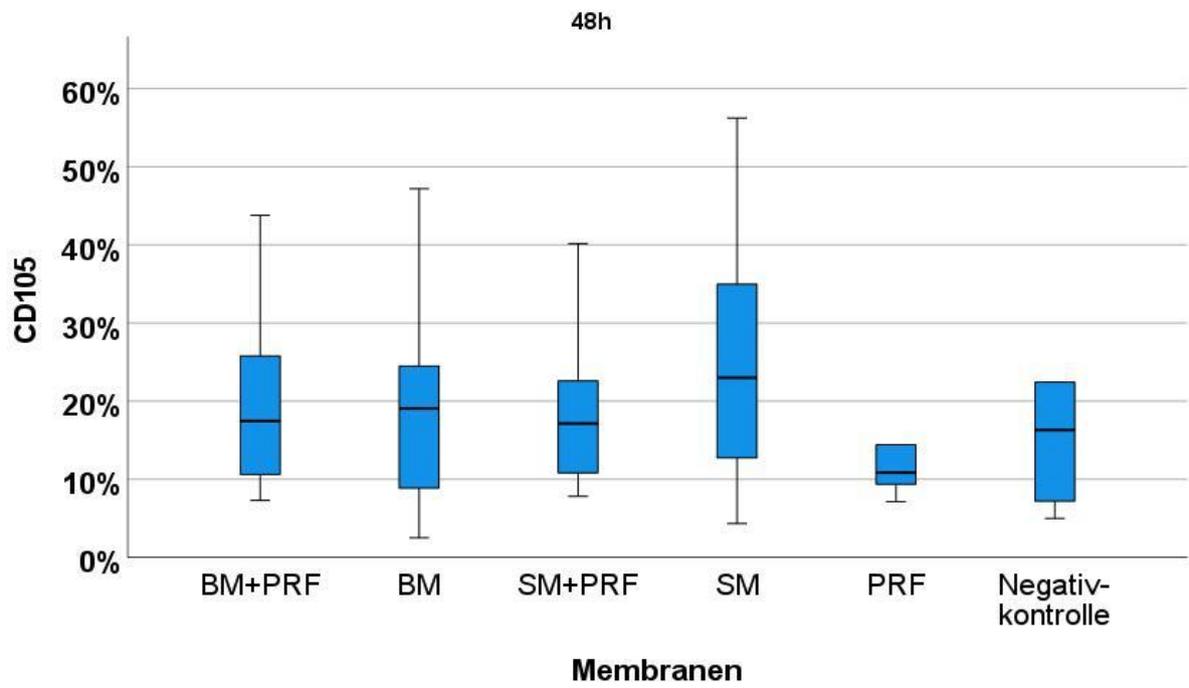


Abbildung 8: Analyse der immunhistochemischen α SMA-Färbung für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®, PRF, Negativkontrolle). (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h nach Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]

A)



B)



C)

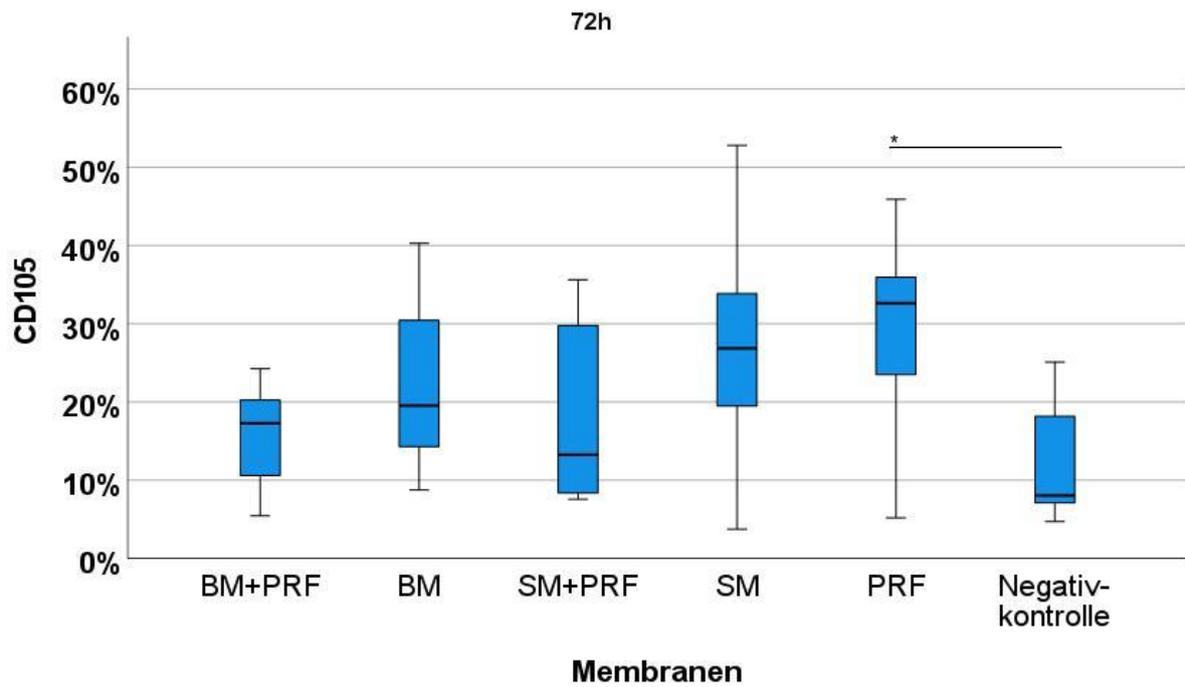


Abbildung 9: Analyse der immunhistochemischen CD105-Färbung für die jeweilige Membran (BM + PRF: Bio-Gide® mit PRF, BM: native Bio-Gide®, SM + PRF: Symbios® mit PRF, SM: native Symbios®, PRF, Negativkontrolle). (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h nach Inkubation. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Modifiziert nach Blatt et al. (2022) [1]

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse und Vergleich zur Literatur

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkung von PRF auf das Rehydrierungsprotokoll verschiedener xenogener Kollagenmembranen sowie mögliche pro-angiogene Effekte der biologisierten KM analysiert. Als Hauptergebnis konnten zu allen Zeitpunkten signifikant erhöhte pH-Werte bei reiner PRF und den kombinierten Varianten mit Bio-Gide® und Symbios® festgestellt werden, verglichen mit nativer Kochsalzlösung und pH-7-Lösung. Allerdings wurde für PRF und seine kombinierten Varianten eine signifikante Tendenz zur Azidität während der 20-minütigen Versuchsreihe beobachtet. Reine PRF steigerte signifikant die Gefäßanzahl und Verzweigungspunkte in der YSM. Mit PRF biologisierte KM konnten nach 72 Stunden statistisch signifikant mehr Gefäße und Verzweigungspunkte im Vergleich zu nativer YSM erzielen, jedoch nicht im Vergleich zu seinen nativen Pendanten. Die immunhistochemische Färbung bestätigte diese Ergebnisse, die für reine PRF im Vergleich zu nativer YSM innerhalb von 24 h eine statistisch signifikante Zunahme der Gefäße zeigte.

5.1.2 PRF als Möglichkeit der Biologisierung

Thrombozyten gelten als Regulatoren der Thrombose und Hämostase. Tritt eine Verletzung auf, interagieren sie mit der subendothelialen Matrix und es kommt zur Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation. Über die Gerinnungskaskade entsteht am Ende ein Thrombus. Mittlerweile ist bekannt, dass sie neben den frühen Stadien der Wundheilung auch Einfluss auf die gesamte Geweberegeneration und Angiogenese haben, indem sie die Synthese und Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF modulieren. Sie enthalten eine Menge an pro- und anti-angiogenen Proteinen in organisierten α -Granulat-Populationen. Daher erscheinen Thrombozyten als vielversprechende therapeutische Option, bei Erkrankungen, die eine Modulation der Angiogenese erfordern [34, 35]. Insbesondere in Kombination mit Biomaterialien stellen sie in Form von autologen Thrombozytenkonzentraten, wie die PRF-Präparate, eine gute, klinische Möglichkeit der Prävasikularisierung und Funktionalisierung dar [14, 90, 91].

Bereits in einer vorangegangenen Studie der Mainzer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass PRF zur Aktivierung von Kollagenmembranen genutzt werden kann, um

die Angiogenese und Vaskularisierung in vivo und in vitro anzuregen. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (TGF1 β und VEGF) lag innerhalb der ersten 24 h annähernd auf dem gleichen Niveau wie bei reiner PRF. Allerdings muss beachtet werden, dass in der aktuellen Studie ein längerer Zeitraum beobachtet wurde und andere Kollagenmembranen verwendet wurden [14]. Native Kollagenmembranen konnten in verschiedenen Tierstudien und auch in klinischen Studien am Menschen im Rahmen der parodontalen Regeneration bisher keine vollständige Regeneration zeigen [7]. Die entzündungshemmende Wirkung von PRF könnte somit die Wundheilung nach Insertion der Biomaterialien unterstützen [92].

In der vorliegenden Studie konnten biologisierte Varianten der Membranen eine deskriptive Zunahme von Gefäßen und Verzweigungspunkten im Zeitverlauf erreichen, jedoch konnte kein Vor- oder Nachteil der biologisierten Bio-Gide® oder Symbios®- Membran festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich in einer anderen Studie von Al-Maawi et al., bei der nur eine partielle oder oberflächliche Invasion von flüssigem PRF in die Schweine-KM gefunden wurde [93]. Die KM behielten in den vorgestellten Ergebnissen mikroskopisch ihre Form und Oberflächenstruktur für 72 Stunden, zeigten Biokompatibilität und ihren Vorteil in der Stabilität im Vergleich zu PRF, was in Übereinstimmung mit anderen Studien über das biologische Abbauprofil von KM steht [94]. Dies konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden.

Es wurden stabile PRF-Membranen hergestellt, um die KM zu biologisieren. Dabei wurde nach dem Zentrifugationsprotokoll von Choukroun et al. vorgegangen [45]. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, welches Protokoll die höchste Qualität und Quantität des Zellgehalts, der Fibrinarchitektur und der Freisetzung von Wachstumsfaktoren bewirkt [14].

5.1.3 Kollagenmembranen

In der rekonstruktiven Chirurgie werden künstliche Biomaterialien wie Knochenersatzstoffe oder Kollagenmembranen als valide Alternative zum autologen Goldstandard eingesetzt. Bei der Vielzahl der angebotenen Produkte ist es jedoch oft schwierig, das optimale Gerüstmaterial zu finden. KM, wie z. B. die porcine Bio-Gide®- und die bovine Symbios®- Membran, erweisen sich als gute Alternativen für

Regenerationstechniken. Eine Einschränkung ist jedoch die unzureichende Vaskularisierung, was die Integration in den Empfängerorganismus erschwert und mögliche Immunreaktionen hervorrufen kann [95-97]. Das angeborene und erworbene Immunsystem spielt dabei eine entscheidende Rolle [98]. In einer Studie von Al-Maawi et al. wurde Symbios® subkutan in Wistar-Ratten implantiert, um die Gewebewundheilung zu untersuchen. Nach 30 Tagen wurden in der Testgruppe mehrkernige Riesenzellen auf der Oberfläche der Matrix gefunden, während im zentralen Bereich der Membranen nur mononukleäre Zellen und keine Gefäße zu finden waren. In der Kontrollgruppe wurden keine mehrkernigen Riesenzellen gefunden, so dass in der Testgruppe von einer Fremdkörperreaktion ausgegangen werden konnte. Die Wirkung von flüssigem PRF auf KM wurde auch ex vivo untersucht. Es war in der Lage, die Membranen nach 15 Minuten zu durchdringen. In der Studie wurde kritisch hinterfragt, welche Rolle Biomaterialien spielen und ob die Zellen im Rahmen der Vaskularisierung erwünscht sind oder als pathologisch betrachtet werden sollten [99].

Bovine und porcine KM sind aufgrund des mehrstufigen Herstellungsprozesses azellulär und avaskulär im Vergleich zu autologen Scaffolds. Die Biofunktionalisierung durch pro-angiogene Faktoren könnte daher geeignet sein, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und FGF zu verbessern [100, 101]. VEGF induziert die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie die Differenzierung von Vorläufer- zu reifen Endothelzellen. Nach Stimulierung der Vorläuferzellen kommt es zu einer Neovaskularisierung der KM. Auch eine Stimulierung bereits bestehender Gefäße des umliegenden Gewebes könnte möglich sein, was zu einer verstärkten Sprossung und intussuszeptiven Angiogenese und damit zu einer verbesserten KM-Vaskularisierung führen könnte. Andererseits kann eine verbesserte Vaskularisierung der KM und Freisetzung von VEGF mit einem verbesserten Knochenumbau in Verbindung gebracht werden, da VEGF die Aktivität der Endothelzellen erhöht und indirekt die Osteogenese stimulieren kann [102].

Im Vergleich zu anderen KM [94], werden die in der vorliegenden Studie getesteten Membranen nicht als Alternative zu oralen Weichgewebetransplantaten aus dem Gaumen für die Weichgeweberegeneration, wie z. B. die Abdeckung parodontaler Rezessionen, verwendet. Sie wurden im Rahmen der GBR entwickelt, um

Knochentransplantate zu bedecken und zu stabilisieren. Jedoch könnten sie auch als Barrieren wirken und die Knochentransplantate von den umgebenden Geweben trennen. Das Einwachsen von Weichgewebe in die Knochentransplantate könnte verzögert werden. Dieser Barriereeffekt könnte durch eine beschleunigte Vaskularisierung und damit eine beschleunigte Bio-Degeneration reduziert werden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der porcinen und der bovinen Membran in nativer Form.

5.1.4 Rehydrierung und ihr Einfluss

Im Zusammenhang mit der Wundheilung spielt auch der pH-Wert der Haut eine zentrale Rolle, je nach Testlokalisation und Alter reichen die pH-Werte von 4 bis 6 [103]. Der pH-Wert ist definiert als ein Maß für den Grad, in dem eine Lösung sauer oder alkalisch ist (Skala von 0 bis 14). Im Blut kann der pH-Wert zwischen 7,35 und 7,45 liegen [86]. In einer Studie von Nagaraja et al. wurde die Auswirkung von pH-Wert-Änderungen auf die Wundheilung bei Anwendung von flüssigem PRF untersucht. Der ursprünglich alkalische pH-Wert änderte sich an Tag 5 in einen sauren Wert. PRF kann also zur Epithelialisierung und Angiogenese beitragen und die Wundheilung fördern [104]. Als gepresste Membran zeigte PRF jedoch ein alkalisches Verhalten, was sich über fünf Tage Beobachtung sogar verstärkte. Daraus kann man hypothesieren, dass es eher für eitrige Wunden geeignet sein könnte, bei denen der pH-Wert deutlich sauer ist. PRF-Membranen können hier den pH-Wert erhöhen und Normalwerte erzeugen [96]. In einer Übersichtsarbeit wurde in 58 % der untersuchten Studien eine positive Wundheilung im Zusammenhang mit dem Einsatz von PRF festgestellt [52]. Dies steht im Einklang mit Studien, die eine antimikrobielle Wirkung von PRF gegen Bakterien in anaeroben Milieus wie dem Zahnwurzelkanal [105] oder einer lokalen Pyoderma gangrenosum [106] belegen. Es unterstreicht die Fähigkeit von PRF, den pH-Wert auch unter anaeroben Bedingungen zu verändern [104]. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls die Veränderungen des pH-Werts untersucht, die durch die Rehydrierung von KM in verschiedenen Rehydrationsmedien entstehen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben genannten Untersuchungen, wurde in der vorliegenden Studie festgestellt, dass der durchschnittliche pH-Wert der PRF-Membranen zu Beginn alkalisch ist, jedoch mit der Zeit sauer wird. Durch die Zugabe von Bio-Gide® oder Symbios® KM wurde dieser Effekt verstärkt. In Anbetracht

der unterschiedlichen Ausgangswerte der Medien in der vorliegenden Studie ist es jedoch nicht überraschend, dass es bei den Vergleichen zwischen allen Gruppen signifikante Unterschiede gibt. Hervorzuheben ist, dass die Kochsalzlösung insbesondere in Kombination mit der jeweiligen KM signifikant niedrigere pH-Werte aufwies als PRF mit und ohne Kombination mit KM. Da Kochsalzlösung in der klinischen Praxis regelmäßig für Rehydrationsprotokolle verwendet wird, ist dies von unmittelbarem klinischem Interesse. Gemäß der oben erwähnten Hypothese des Einflusses von PRF auf die Optimierung der pH-Werte an Wunden, scheint PRF für Rehydrationsprotokolle der getesteten KM besser geeignet zu sein. Hier scheint eine Rehydratation von 5 Minuten optimal, um ein anschließendes Absinken der pH-Werte zu vermeiden.

5.1.5 Chorio-allantois membrane- und yolk sac membrane- Assay

Der Bedarf nach Weiterentwicklung von Geweberegenerationstechniken und -materialien stieg in den letzten Jahren kontinuierlich [4]. Die Entwicklung erfordert jedoch vor der klinischen Anwendung Wirksamkeits- und Sicherheitsprüfungen. Die derzeitigen in-vitro- und in-vivo-Modelle weisen eine Reihe von Limitationen auf, wie beispielsweise hohe Kosten, die fehlende Korrelation zwischen Tiermodellen und Ergebnissen bei Menschen sowie die Notwendigkeit, invasive Verfahren an Tieren durchführen zu müssen [107]. Der Chorio-Allantois-Membran-Assay (CAM-Assay) wird seit über 40 Jahren im sog. Tissue-engineering als gute Alternative zwischen In-vitro- und In-vivo-Modellen verwendet [108].

Die Chorio-Allantois-Membran (CAM) des Hühnerembryos ist eine einfache, stark vaskularisierte extraembryonale Membran, die während der Embryonalentwicklung mehrere Funktionen erfüllt, darunter auch den Gasaustausch [109]. Sie besteht aus einem mehrschichtigen Epithel, bestehend aus Ektoderm, Mesoderm (oder Stroma) und Endoderm [110]. Außerdem enthält die CAM extrazelluläre Matrixproteine (ECM) wie Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I und Integrin $\alpha\beta 3$ [111]. Sie ist die äußerste extraembryonale Membran, die die nichtzelluläre Eischalenmembran auskleidet. Die CAM wird durch Verschmelzung des splanchnischen Mesoderms der Allantois und des somatischen Mesoderms des Chorions gebildet. Die fusionierte CAM entwickelt sich und bedeckt bis zum 12. Tag der Bebrütung die gesamte Oberfläche der inneren Schalenmembran des Kükens. Das Küken schlüpft dann in der Regel an Tag 21. Die

CAM dient als Träger für die extraembryonalen respiratorischen Kapillaren, transportiert aktiv Natrium und Chlorid aus dem Allantois-Sack und Kalzium aus der Eischale in das embryonale Gefäßsystem und bildet einen Teil der Wand des Allantois-Sacks, in dem die Ausscheidungsprodukte gesammelt werden. Aufgrund der geringen Kosten, der Einfachheit des Verfahrens und der Möglichkeit, die Teststelle kontinuierlich zu beobachten, ohne sie zu zerstören, ist die CAM eine gängige Methode zur Untersuchung biologischer Prozesse wie Transport [112], Gasaustausch, Tumortransplantationsexperimente, Toxizität und der Angiogenese [110, 113, 114]. In der Regel wird eine Öffnung in die Schale eingebracht, damit die CAM leicht zugänglich und einsehbar ist. Nachdem Medikamente, Faktoren oder ein Implantat aufgebracht wurden, wird das Fenster mit einem durchsichtigen Klebeband oder einem Glasobjektträger verschlossen, so dass die Prüfstelle leicht zu sehen ist [115].

In den letzten zwei Jahrzehnten rückte die CAM als robuste experimentelle Versuchsoberfläche zur Untersuchung von Blutgefäßen immer mehr in den Fokus von Spezialisten aus den Bereichen Bioengineering, Entwicklung, Morphologie, Biochemie, Transplantationsbiologie, Krebsforschung und Arzneimittelentwicklung. Die Gewebezusammensetzung und die Zugänglichkeit der CAM für experimentelle Manipulationen machen sie zu einem attraktiven präklinischen in-vivo-Modell für das Screening von Medikamenten und/oder für Studien zum Gefäßwachstum [109]. Neben der Untersuchung der Angiogenese wird das Modell auch genutzt, um Molekülen mit angiogener und antiangiogener Aktivität, Tumorzellwachstum und Metastasenbildung sowie azelluläre Gerüste und Organoide samt ihrer angiogenen Kapazität zu analysieren [30-33].

Zusätzlich zur hoch vaskularisierten Oberfläche bietet das CAM-Modell weitere Vorteile, wie z. B. eine gute Reproduzierbarkeit, Einfachheit und Kosteneffizienz. Da der CAM-Assay ein geschlossenes System bietet, ist die Halbwertszeit vieler experimenteller Moleküle oder Peptide im Vergleich zu Tiermodellen tendenziell länger, was die experimentelle Untersuchung potenzieller anti-metastatischer Wirkstoffe ermöglicht, die nur in kleinen Mengen verfügbar sind [32, 116]. Im Gegensatz zu anderen in-vivo-Modellen, wie z. B. Mausversuche, ist der CAM-Assay mit seiner nicht innervierten Gefäßoberfläche für den Kükenembryo minimal invasiv und stellt daher ein optimales Modell innerhalb der Tierforschung dar [107]. In einer Reihe von Studien wurden Materialien an der CAM nicht nur zur Untersuchung der

Angiogenese, sondern auch zur Prüfung der Biokompatibilität zwischen Material und Gewebe untersucht. Neben Kollagen und Seide wurden eine Vielzahl an Biomaterialien untersucht, darunter auch Alginat [110, 117-119]. In neueren Studien zeigte sich der Cam-Assay auch als klinisch relevantes Modell, um die Knochenregeneration in Experimenten mit menschlichem Gewebe zu testen [107]. Es wird auch für immunologische Studien verwendet, da es konsekutiv ein embryonales Immunsystem entwickelt, das funktionell dem des Menschen ähnlich ist [120]. Auch Ratajczak et al. führten Studien mittels CAM-Assay durch und konnten die Zunahme der Gefäße durch die Auflage von PRF erzielen [121]. Ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte PRF allein die Anzahl der Gefäße und Verzweigungspunkte signifikant erhöhen. Es muss jedoch eingeräumt werden, dass aufgrund der unterschiedlichen PRF-Präparationsprotokolle in den verschiedenen Studien ein eindeutiger Vergleich schwierig ist [24].

Trotz der vielen Vorteile gegenüber anderen Tierversuchen, weist auch das CAM-Modell einige Einschränkungen auf. Es kann nur ein lokaler Gefäßbereich festgelegt und beobachtet werden, der sich nicht immer homogen wahrnehmen lässt. Es werden adsorbierende Träger (Papier oder Gelschwämme) verwendet, die dazu neigen, an der CAM zu haften und diese zu reizen. Nach neun Tagen Bebrütung haftet die CAM aufgrund des Dotterquelldrucks eng an der Schalenmembran, so dass es beim Öffnen und Freilegen der Schalenmembran zu Rissen und Blutungen kommen kann. Weiterhin kann das Testgebiet aufgrund des wachsenden Embryos und dessen Bewegungen nie gänzlich ruhig und eben beobachtet werden. Ein geringer Kontrast zwischen CAM und Blutgefäß erschwert zudem die direkte Beobachtung. Insgesamt dauert die Entwicklung der CAM und somit der CAM-Assay etwa 11-15 Tage, was durchaus zeitintensiv ist. Auf der Grundlage des CAM-Assays wurde deshalb ein weiteres Angiogenesemodell entwickelt, um das präklinische Screening potenzieller angiogener und antiangiogener Wirkstoffe mit weniger Zeit- und Kostenaufwand reproduzierbar durchführen zu können [122-124].

Der neuere Assay macht sich die yolk sac membrane zu Nutze. Die Dottersackmembran (Yolk sac membrane, YSM) ist eine komplexe extraembryonale Struktur, die für den Transfer von Nährstoffen vom Inneren des Dottersackes zum Kükenembryo zuständig ist [125]. Die YSM entwickelt sich aus dem Hinterdarm des Embryos und beginnt in der ersten Entwicklungsphase, den Dotter zu umhüllen. Am

fünften Tag der Inkubation ist der Dotter vollständig von der YSM umgeben, die ausgeprägte Falten und eine Mikrovillusstruktur entwickelt hat [126].

Das YSM-Modell hat viele Vorteile. Die Embryonalscheibe dreht sich automatisch in der Mitte des Dotters infolge der Schwerkraft und wächst aufgrund der Flüssigkeitsspannung an der Oberfläche in einer Ebene, was besser zu beobachten ist. Dies ist von Vorteil für die Lokalisierung des Testbereichs, die Beobachtung und Fotodokumentation, da das gesamte Blutgefäßnetz vollständig freigelegt ist. Auch der Kontrast ist besser wahrnehmbar, da das gesamte YSM-Blutgefäßnetz sich gut von dem gelben Dotter darunter abhebt. Bei normaler Bebrütung ersetzt die CAM nach fünf Tagen allmählich die Atmungsaktivität des YSM-Blutgefäßnetzes. Bis dahin wächst das YSM-Blutgefäßnetz mit hoher Geschwindigkeit und bedeckt bereits am vierten Tag der Inkubation zwei Drittel des Dotters und am sechsten Tag fast die gesamte Dottersackfläche. Im Vergleich zum CAM-Assay sind die Gefäße besser zu beurteilen, die Bewegung des Embryos noch nicht so ausgeprägt und die Testfläche übersichtlicher. Insgesamt sind die Versuche kosteneffizienter und zeitsparender [123]. Von einigen Autoren wird der Test als möglicher Bioreaktor zur Kultivierung und Untersuchung der Regeneration von lebendem menschlichem Knochen angesehen [107]. Aufgrund der hohen Gefäßdichte ist das Modell gut für die Untersuchung der Angiogenese geeignet, was sich einige aktuelle Studien zunutze machen. Insbesondere die Wirkung von PRF scheint sehr interessant zu sein. Wie in einer früheren Studie unserer Forschungsgruppe, wurde eine positive Wirkung von PRF auf die Angiogenese nachgewiesen [14, 90].

Auch in der vorliegenden Studie wurde das YSM-Modell verwendet, die befruchteten und bebrüteten Eier wurden 3 Tage inkubiert, bevor die Testmembranen aufgelegt wurden. Dies bot eine erhebliche Zeitersparnis für die Studie, zumal mehrere Brutkästen gleichzeitig bestückt werden konnten. Für die Fotodokumentation ließ sich die YSM gut beobachten, sodass das YSM-Assay gegenüber dem CAM-Assay in dieser Studie bevorzugt wurde.

5.2 Limitationen der Studie

Die Studie weist einige wesentliche Limitationen auf. Die Fallzahl erscheint im Hinblick auf die Komplexität des Modells zu gering gewählt, weshalb die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden sollen. Die Rehydrierungsversuche hätten zusätzlich mit einem Bikarbonatpuffer mit der genauen Spezifikation des Blutpuffers durchgeführt werden müssen, um die Aktivität des im Blutserum vorhandenen Bikarbonatpuffers zu bestimmen und zu analysieren. Darüber hinaus weist das yolc sac membrane Assay einige Fehlerquellen auf, obwohl ein anerkanntes in-vivo-Modell angewandt wurde. Zu nennen sind dabei u.a. unkontrollierbare äußere Faktoren, wie der Transport und die Lagerung sowie Bebrütung der Eier, die Außentemperaturen und unterschiedliche Größen der Eier. Diese Faktoren könnten die Ergebnisse der Studie beeinflusst haben. Aufgrund der individuellen Eigenschaften der Eier (Größe, Form, Bildung der Gefäße und Bewegung des Embryos) konnte die Entnahme der Membranen nicht vollständig standardisiert werden. Daher waren einige der Membranproben nicht gleich groß. Darüber hinaus stellt die Färbetechnik eine Einschränkung dar.

Schließlich wurde die Auswertung der Verzweigungspunkte und der Anzahl der Gefäße manuell vorgenommen. Es konnte das Gefäßwachstum mit der angewandten Methode nur oberflächlich und nicht in der Tiefe bzw. unterhalb der Matrix in einer Ebene und einer Dimension und nicht in ihrer dreidimensionalen Form beurteilt werden. Insgesamt liefert die vorliegende Studie mit den genannten Einschränkungen durchaus positive Belege für den Einsatz von autologen Thrombozytenkonzentraten in Geweberegenerationsverfahren. Dabei wird kein Anspruch erhoben, die Gesamtheit der angiogenen Prozesse vollständig abzubilden.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurde ein bereits etabliertes Modell, das YSM-Assay verwendet, um die Biofunktionalisierung xenogener Kollagenmembranen mittels autologer Thrombozytenkonzentrate und deren Einfluss auf die Angiogenese sowie das Rehydrationsprotokoll von Kollagenmembranen zu untersuchen.

Eine Besonderheit der aktuellen Arbeit im Vergleich zu anderen ist, dass auch spätere Zeitpunkte beobachtet werden konnten, die in früheren Studien nicht untersucht wurden [14]. Außerdem wurde die Wirkung von PRF auf den Rehydrierungsprozess zum ersten Mal wissenschaftlich bewertet. Zusammenfassend könnte diese Studie dazu beitragen, zukünftige Behandlungskonzepte zu optimieren und die Biofunktionalisierung von Kollagenmembranen mit PRF umzusetzen. Außerdem könnten die Ergebnisse dazu beitragen, den Rehydrierungsprozess mit PRF im klinischen Alltag zu implementieren. Die oben genannten Einschränkungen dieser Studie (vor allem geringe Anzahl von Experimenten, externe/interne Faktoren der YSM, oberflächliche manuelle Gefäßzählung, Färbetechnik) müssen jedoch berücksichtigt werden.

Darüber hinaus sind die dargestellten in vivo-Effekte nur ein kleiner Aspekt der tatsächlichen Effekte bei der Wundheilung und Geweberegeneration beim Menschen. Weitere standardisierte klinische Studien müssen durchgeführt werden, z.B. hinsichtlich der Einwanderung und Aktivierung von Granulozyten und welche Rolle PRF genau bei der Vaskularisierung und Wundheilung spielt [127]. Daher muss auch die Rolle des pH-Wertes im Zusammenhang mit der Wundheilung und der Anwendung verschiedener Formen von PRF bei akuten oder chronischen Wunden näher beleuchtet werden. In diesem Zusammenhang könnte die zukünftige Forschung auch die additive Herstellung von biokompatiblen Gerüsten in Kombination mit PRF umfassen, um die biotechnologischen Eigenschaften in der kranio-maxillo-fazialen Chirurgie weiter zu verbessern.

7. Literaturverzeichnis

1. Blatt, S., et al., *Biofunctionalization of Xenogeneic Collagen Membranes with Autologous Platelet Concentrate—Influence on Rehydration Protocol and Angiogenesis*. *Biomedicines*, 2022. **10**(3): p. 706.
2. Elgali, I., et al., *Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited*. *Eur J Oral Sci*, 2017. **125**(5): p. 315-337.
3. Hämmerle, C.H. and R.E. Jung, *Bone augmentation by means of barrier membranes*. *Periodontol 2000*, 2003. **33**: p. 36-53.
4. Bartold, P.M., et al., *Tissue engineered periodontal products*. *J Periodontal Res*, 2016. **51**(1): p. 1-15.
5. Reynolds, M.A., M.E. Aichelmann-Reidy, and G.L. Branch-Mays, *Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts*. *Dent Clin North Am*, 2010. **54**(1): p. 55-71.
6. *Zahnärztliche Chirurgie 2017*: Jochen Jackowski, Hajo Peters, Frank Hölzle, Copyright.
7. Bunyaratavej, P. and H.-L. Wang, *Collagen Membranes: A Review*. *Journal of Periodontology*, 2001. **72**(2): p. 215-229.
8. Soroushanova, A., et al., *The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development*. *Adv Mater*, 2019. **31**(1): p. e1801651.
9. Villar, C.C. and D.L. Cochran, *Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration*. *Dent Clin North Am*, 2010. **54**(1): p. 73-92.
10. Masson-Meyers, D.S. and L. Tayebi, *Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2021. **15**(9): p. 747-762.
11. Laschke, M.W. and M.D. Menger, *Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation*. *Eur Surg Res*, 2012. **48**(2): p. 85-92.
12. Rather, H.A., D. Jhala, and R. Vasita, *Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019. **103**: p. 109761.
13. Zumarán, C.C., et al., *The 3 R's for Platelet-Rich Fibrin: A "Super" Tri-Dimensional Biomaterial for Contemporary Naturally-Guided Oro-Maxillo-Facial Soft and Hard Tissue Repair, Reconstruction and Regeneration*. *Materials (Basel)*, 2018. **11**(8).
14. Blatt, S., et al., *Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo*. *Clin Oral Investig*, 2020.
15. Kämmerer, P.W., et al., *Influence of a collagen membrane and recombinant platelet-derived growth factor on vertical bone augmentation in implant-fixed deproteinized bovine bone – animal pilot study*. *Clinical Oral Implants Research*, 2013. **24**(11): p. 1222-1230.
16. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006. **101**(3): p. e45-50.
17. Miron, R.J., et al., *Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review*. *Clin Oral Investig*, 2017. **21**(6): p. 1913-1927.
18. Egle, K., I. Salma, and A. Dubnika, *From Blood to Regenerative Tissue: How Autologous Platelet-Rich Fibrin Can Be Combined with Other Materials to Ensure Controlled Drug and Growth Factor Release*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(21).
19. Pietruszka, P., et al., *PRP and PRF-Subgroups and Divisions When Used in Dentistry*. *J Pers Med*, 2021. **11**(10).

20. Damsaz, M., et al., *Evidence-Based Clinical Efficacy of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Floor Lift, Graft and Surgical Augmentation Procedures*. *Front Surg*, 2020. **7**: p. 537138.
21. Kasaj, A., et al., *The influence of various rehydration protocols on biomechanical properties of different acellular tissue matrices*. *Clin Oral Investig*, 2016. **20**(6): p. 1303-15.
22. Saghiri, M.A., et al., *Moderately Acidic pH Promotes Angiogenesis: An In Vitro and In Vivo Study*. *J Endod*, 2020. **46**(8): p. 1113-1119.
23. Filipowska, J., et al., *The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning*. *Angiogenesis*, 2017. **20**(3): p. 291-302.
24. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis*. *Cancer Treat Res*, 2004. **117**: p. 3-32.
25. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling*. *J Neurooncol*, 2000. **50**(1-2): p. 1-15.
26. Kanczler, J.M. and R.O. Oreffo, *Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone*. *Eur Cell Mater*, 2008. **15**: p. 100-14.
27. Portal-Núñez, S., D. Lozano, and P. Esbrit, *Role of angiogenesis on bone formation*. *Histol Histopathol*, 2012. **27**(5): p. 559-66.
28. Saghiri, M.A., et al., *The role of angiogenesis in implant dentistry part II: The effect of bone-grafting and barrier membrane materials on angiogenesis*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2016. **21**(4): p. e526-37.
29. Wiszniak, S., et al., *Neural crest cell-derived VEGF promotes embryonic jaw extension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(19): p. 6086-91.
30. Richardson, M. and G. Singh, *Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis*. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2003. **3**(2): p. 155-85.
31. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(6): p. 1119-30.
32. Tufan, A.C. and N.L. Satiroglu-Tufan, *The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005. **5**(4): p. 249-66.
33. Ribatti, D., *Two new applications in the study of angiogenesis the CAM assay: Acellular scaffolds and organoids*. *Microvasc Res*, 2022. **140**: p. 104304.
34. Walsh, T.G., P. Metharom, and M.C. Berndt, *The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis*. *Platelets*, 2015. **26**(3): p. 199-211.
35. Nami, N., et al., *Crosstalk between platelets and PBMC: New evidence in wound healing*. *Platelets*, 2016. **27**(2): p. 143-148.
36. van der Bijl, I., et al., *Allogeneic platelet-rich plasma (PRP) is superior to platelets or plasma alone in stimulating fibroblast proliferation and migration, angiogenesis, and chemotaxis as relevant processes for wound healing*. *Transfusion*, 2019. **59**(11): p. 3492-3500.
37. Kingsley, C.S., *Blood Coagulation: Evidence of an Antagonist to Factor VI in Platelet-Rich Human Plasma*. *Nature*, 1954. **173**(4407): p. 723-724.
38. Mozzati, M., et al., *The impact of plasma rich in growth factors on clinical and biological factors involved in healing processes after third molar extraction*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010. **95A**(3): p. 741-746.
39. Matras, H., *The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery*. *J Oral Maxillofac Surg*, 1982. **40**(10): p. 617-22.

40. Whitman, D.H., R.L. Berry, and D.M. Green, *Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery*. J Oral Maxillofac Surg, 1997. **55**(11): p. 1294-9.
41. O'Sullivan, L. and N.R. R, *Autologous platelet concentrates in oral surgery: protocols, properties, and clinical applications*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2022. **133**(2): p. 156-164.
42. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. **85**(6): p. 638-46.
43. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 158-67.
44. Choukroun, J., et al. *Une opportunit  en paro-implantologie: Le PRF*. 2001.
45. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(3): p. e37-44.
46. Eriksson, O., et al., *The Human Platelet as an Innate Immune Cell: Interactions Between Activated Platelets and the Complement System*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1590.
47. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Curr Pharm Biotechnol, 2012. **13**(7): p. 1145-52.
48. Brancaccio, Y., et al., *Evaluation of local hemostatic efficacy after dental extractions in patients taking antiplatelet drugs: a randomized clinical trial*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(3): p. 1159-1167.
49. Miron, R.J., et al., *Use of platelet-rich fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(5): p. 2461-2478.
50. Liu, Y.H., et al., *Advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) has an impact on the initial healing of gingival regeneration after tooth extraction*. J Oral Biosci, 2021.
51. Pabst, A. and P.W. K mmerer, *Membranwendungen in der ZMK-Heilkunde*. Zahnmedizin up2date, 2020. **14**(03): p. 199-210.
52. Miron, R.J., et al., *Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review*. Tissue Eng Part B Rev, 2017. **23**(1): p. 83-99.
53. Udeabor, S.E., et al., *Characterization of the Cellular Reaction to a Collagen-Based Matrix: An In Vivo Histological and Histomorphometrical Analysis*. Materials (Basel), 2020. **13**(12).
54. Di Summa, F., et al., *TGF  activity released from platelet-rich fibrin adsorbs to titanium surface and collagen membranes*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10203.
55. Ghanaati, S., et al., *Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells*. Journal of Oral Implantology, 2014. **40**(6): p. 679-689.
56. Miron, R.J., et al., *Standardization of relative centrifugal forces in studies related to platelet-rich fibrin*. J Periodontol, 2019. **90**(8): p. 817-820.
57. Miron, R.J., et al., *Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces*. Clinical Oral Investigations, 2020. **24**(3): p. 1171-1182.
58. Choukroun, J. and S. Ghanaati, *Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own*

- inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept.* Eur J Trauma Emerg Surg, 2018. **44**(1): p. 87-95.
59. Tsujino, T., et al., *Evidence for Contamination of Silica Microparticles in Advanced Platelet-Rich Fibrin Matrices Prepared Using Silica-Coated Plastic Tubes.* Biomedicines, 2019. **7**(2): p. 45.
 60. Harkness, R.D., *Biological functions of collagen.* Biol Rev Camb Philos Soc, 1961. **36**: p. 399-463.
 61. Bergeon, M.T., *Collagen: a review.* The Journal of the Oklahoma State Medical Association, 1967. **60**(6): p. 330-332.
 62. Lee, C.H., A. Singla, and Y. Lee, *Biomedical applications of collagen.* Int J Pharm, 2001. **221**(1-2): p. 1-22.
 63. Pachence, J.M., *Collagen-based devices for soft tissue repair.* J Biomed Mater Res, 1996. **33**(1): p. 35-40.
 64. Bottino, M.C., et al., *Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective.* Dent Mater, 2012. **28**(7): p. 703-21.
 65. Maurer, T., et al., *Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications.* PLoS One, 2018. **13**(10): p. e0205027.
 66. Mbese, Z., S. Alven, and B.A. Aderibigbe, *Collagen-Based Nanofibers for Skin Regeneration and Wound Dressing Applications.* Polymers (Basel), 2021. **13**(24).
 67. Bottino, M.C. and V. Thomas, *Membranes for Periodontal Regeneration--A Materials Perspective.* Front Oral Biol, 2015. **17**: p. 90-100.
 68. Mouw, J.K., G. Ou, and V.M. Weaver, *Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 771-85.
 69. Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner, *Collagens--structure, function, and biosynthesis.* Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(12): p. 1531-46.
 70. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure.* Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
 71. Mienaltowski, M.J. and D.E. Birk, *Structure, physiology, and biochemistry of collagens.* Adv Exp Med Biol, 2014. **802**: p. 5-29.
 72. Ottani, V., M. Raspanti, and A. Ruggeri, *Collagen structure and functional implications.* Micron, 2001. **32**(3): p. 251-60.
 73. Ushiki, T., *Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint.* Arch Histol Cytol, 2002. **65**(2): p. 109-26.
 74. Wang, X., et al., *The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 39322.
 75. Mousavi, S., et al., *Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cell behavior.* Biochem Biophys Res Commun, 2019. **518**(4): p. 625-631.
 76. McPherson, J.M., *The utility of collagen-based vehicles in delivery of growth factors for hard and soft tissue wound repair.* Clin Mater, 1992. **9**(3-4): p. 225-34.
 77. Barbeck, M., et al., *Degradation, Bone Regeneration and Tissue Response of an Innovative Volume Stable Magnesium-Supported GBR/GTR Barrier Membrane.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
 78. Jung, O., et al., *In Vitro and Ex Vivo Analysis of Collagen Foams for Soft and Hard Tissue Regeneration.* In vivo (Athens, Greece), 2021. **35**(5): p. 2541-2549.

79. Lee, J.T., et al., *Lateral onlay grafting using different combinations of soft-type synthetic block grafts and resorbable collagen membranes: An experimental in vivo study*. Clin Oral Implants Res, 2020. **31**(4): p. 303-314.
80. El-Jawhari, J.J., et al., *A crosslinked collagen membrane versus a non-crosslinked bilayer collagen membrane for supporting osteogenic functions of human bone marrow-multipotent stromal cells*. Eur Cell Mater, 2019. **37**: p. 292-309.
81. Pinotti, F.E., et al., *Use of a Non-Crosslinked Collagen Membrane During Guided Bone Regeneration Does Not Interfere With the Bone Regenerative Capacity of the Periosteum*. J Oral Maxillofac Surg, 2018. **76**(11): p. 2331.e1-2331.e10.
82. Chattopadhyay, S. and R.T. Raines, *Review collagen-based biomaterials for wound healing*. Biopolymers, 2014. **101**(8): p. 821-33.
83. Farndale, R.W., et al., *The role of collagen in thrombosis and hemostasis*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(4): p. 561-73.
84. Bottino, M.C., et al., *Freeze-dried acellular dermal matrix graft: effects of rehydration on physical, chemical, and mechanical properties*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2009. **25** **9**: p. 1109-15.
85. Percival, S.L., et al., *The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy*. Wound Repair Regen, 2014. **22**(2): p. 174-86.
86. Steinegger, A., O.S. Wolfbeis, and S.M. Borisov, *Optical Sensing and Imaging of pH Values: Spectroscopies, Materials, and Applications*. Chem Rev, 2020. **120**(22): p. 12357-12489.
87. Sirona, D. *Symbios® – Recreating nature Product catalog Bone graft materials, membranes and instruments*. 06.09.2020]; Available from: <https://www.dentsplysirona.com/en/explore/implantology/symbios.html>.
88. Biomaterials, G. *Geistlich Bio-Gide® in the Sausage Technique™*. Available from: <https://www.geistlich-pharma.com/de/dental/membranen/geistlich-bio-gide/anwendung/>.
89. geistlich-pharma. *Product_information*. 20.12.20]; Available from: https://www.geistlich-pharma.com/fileadmin/content/Geistlich_Pharma/Pdf/pdf_Dental_deutsch/600_331_BRO_Product_information_EN_2004_Original_71581_01.pdf.
90. Blatt, S., et al., *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).
91. Park, J.S., et al., *Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrix using enamel matrix derivative and platelet-rich fibrin: influence on mature endothelial cell characteristics in vitro*. Clin Oral Investig, 2018. **22**(2): p. 909-917.
92. Kargarpour, Z., et al., *Liquid PRF Reduces the Inflammatory Response and Osteoclastogenesis in Murine Macrophages*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 636427.
93. Al-Maawi, S., et al., *Biologization of Collagen-Based Biomaterials Using Liquid-Platelet-Rich Fibrin: New Insights into Clinically Applicable Tissue Engineering*. Materials (Basel), 2019. **12**(23).
94. Vallecillo, C., et al., *In Vitro Biodegradation Pattern of Collagen Matrices for Soft Tissue Augmentation*. Polymers (Basel), 2021. **13**(16).
95. Priya, S.G., H. Jungvid, and A. Kumar, *Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(1): p. 105-18.
96. Schenck, T.L., et al., *A full skin defect model to evaluate vascularization of biomaterials in vivo*. J Vis Exp, 2014(90).

97. Al-Himdani, S., et al., *Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice*. Front Surg, 2017. **4**: p. 4.
98. Julier, Z., et al., *Promoting tissue regeneration by modulating the immune system*. Acta Biomater, 2017. **53**: p. 13-28.
99. Al-Maawi, S., et al., *In vivo Implantation of a Bovine-Derived Collagen Membrane Leads to Changes in the Physiological Cellular Pattern of Wound Healing by the Induction of Multinucleated Giant Cells: An Adverse Reaction?* Front Bioeng Biotechnol, 2018. **6**: p. 104.
100. Kobayashi, E., et al., *Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF*. Clin Oral Investig, 2016. **20**(9): p. 2353-2360.
101. Shashank, B. and M. Bhushan, *Injectable Platelet-Rich Fibrin (PRF): The newest biomaterial and its use in various dermatological conditions in our practice: A case series*. J Cosmet Dermatol, 2021. **20**(5): p. 1421-1426.
102. Diomedede, F., et al., *Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
103. Dissemond. *Die Bedeutung des pH-Wertes für die Wundheilung*. 2006; Available from: http://www.wundheilung.net/News/2006/Dissemond_2.pdf.
104. Nagaraja, S., et al., *Evaluation of Histological and pH Changes in Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Fibrin Matrix: A In vitro Study*. Contemp Clin Dent, 2019. **10**(4): p. 652-657.
105. Singh, P., et al., *Antibacterial and Antifungal Efficacy of Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Fibrin Matrix against Root Canal Microflora*. J Pharm Bioallied Sci, 2021. **13**(Suppl 1): p. S124-s127.
106. Fortunato, L., et al., *Management of Facial Pyoderma Gangrenosum Using Platelet-Rich Fibrin: A Technical Report*. J Oral Maxillofac Surg, 2018. **76**(7): p. 1460-1463.
107. Moreno-Jiménez, I., et al., *The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32168.
108. Lafferty, K.J. and M.A. Jones, *Reactions of the graft versus host (GVH) type*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1969. **47**(1): p. 17-54.
109. Nowak-Sliwinska, P., T. Segura, and M.L. Iruela-Arispe, *The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering*. Angiogenesis, 2014. **17**(4): p. 779-804.
110. Valdes, T.I., D. Kreutzer, and F. Moussy, *The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials*. J Biomed Mater Res, 2002. **62**(2): p. 273-82.
111. Giannopoulou, E., et al., *X-rays modulate extracellular matrix in vivo*. Int J Cancer, 2001. **94**(5): p. 690-8.
112. Abriel, H., U. Katz, and P. Kucera, *Ion transport across the early chick embryo: II. Characterization and pH sensitivity of the transembryonic short-circuit current*. J Membr Biol, 1994. **141**(2): p. 159-66.
113. Jakob, W., et al., *The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials*. Exp Pathol (Jena), 1978. **15**(5): p. 241-9.
114. Wilting, J., et al., *In vivo effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane*. Cell Tissue Res, 1993. **274**(1): p. 163-72.
115. Spanel-Borowski, K., *The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials*. Research in Experimental Medicine, 1989. **189**(1): p. 69-75.

116. Cimpean, A.M., D. Ribatti, and M. Raica, *The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis*. *Angiogenesis*, 2008. **11**(4): p. 311-9.
117. Valdes, T.I., et al., *Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for testing biosensors*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003. **67A**(1): p. 215-223.
118. Keshaw, H., et al., *Microporous collagen spheres produced via thermally induced phase separation for tissue regeneration*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(3): p. 1158-66.
119. DeVolder, R.J., et al., *Microfabrication of proangiogenic cell-laden alginate-g-pyrrole hydrogels*. *Biomaterials*, 2012. **33**(31): p. 7718-26.
120. Garcia, P., et al., *The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies*. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
121. Ratajczak, J., et al., *Angiogenic Properties of 'Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin'*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 14632.
122. AS, M.N., et al., *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): p. 1474-1483.
123. Wang, H.-M., et al., *Chick yolk sac membrane assay: a novel angiogenesis model*. *Journal of Biological Research*, 2007. **7**: p. 93-97.
124. Auerbach, R., et al., *Angiogenesis assays: problems and pitfalls*. *Cancer Metastasis Rev*, 2000. **19**(1-2): p. 167-72.
125. Noble, R.C. and M. Cocchi, *Lipid metabolism and the neonatal chicken*. *Prog Lipid Res*, 1990. **29**(2): p. 107-40.
126. Speake, B.K., A.M. Murray, and R.C. Noble, *Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo*. *Prog Lipid Res*, 1998. **37**(1): p. 1-32.
127. Strauss, F.J., et al., *Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies*. *Clin Oral Investig*, 2020. **24**(2): p. 569-584.

8. Anhang

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater für die Möglichkeit einer experimentellen Doktorarbeit im Labor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie – Plastische Operationen der Universitätsmedizin Mainz bedanken. Außerdem danke ich meinem Betreuer, der mich für die Forschung begeisterte und jederzeit mit Rat zur Seite stand. Ich möchte dem Laborteam ein großes Lob aussprechen, allen voran den MTA, ohne deren tatkräftige Unterstützung und Betreuung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sämtliche Mitarbeiter des Laborteams standen mir jederzeit zur Seite.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung und den Zuspruch in meiner Entscheidung für ein Zweitstudium und einer weiteren Doktorarbeit.

