

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

Biofunktionalisierung dreidimensional gedruckter Seidenfibroin-Matrices zur oralen
Weichgeweberegeneration

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

Vorgelegt von

Timpe Heidebrecht
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 17.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	III
1 Einleitung und Ziele der Dissertation	4
2 Literaturdiskussion	6
2.1 Weichgewebsregeneration in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie	6
2.1.1 Definition	6
2.1.2 Indikationen für Weichgewebsaugmentationen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Oralchirurgie	6
2.1.3 Einteilung der herkömmlichen Weichgewebsersatzmaterialien	9
2.1.4 Seidenfibroin als Gewebersatzmaterial	13
2.2 Tissue Engineering und Biofunktionalisierung von Matrices	16
2.2.1 Biofunktionalisierung mit PRF	16
2.2.2 Biofunktionalisierung mit Schmelz-Matrix-Proteinen	18
2.3 Untersuchung der Neovaskularisation im Chorion-Allantois-Membran-Assay	19
3 Material und Methoden	21
3.1.1 <i>Chorion-Allantois-Membrane-Assay</i>	24
3.1.2 Matrices	28
3.1.3 Materialien zur Biofunktionalisierung	29
3.1.3.1 i-PRF	29
3.1.3.2 Schmelz Matrix Derivate	29
3.1.3.3 Natriumchlorid	30
3.1.4 <i>In-vivo</i> Fluoreszenzmikroskopie	30
3.1.5 <i>RT-qPCR</i>	32
3.1.5.1 Allgemeines	32
3.1.5.2 Vorbereitung der RNA und photometrische Konzentrationsbestimmung	33
3.1.5.3 Umschreibung der RNA in cDNA	34
3.1.5.4 Durchführung der RT-qPCR	35
3.1.5.5 Auswertung der qPCR	36
3.1.6 Histologie	39
3.1.6.1 Matrixentnahme	39
3.1.6.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung	39
3.1.6.3 Auswertung der histologischen Färbung	39
3.1.7 Statistische Auswertung	40
4 Ergebnisse	42
4.1 Fluoreszenzmikroskopie	42
4.1.1 Prozentualer Anteil vaskularisierter Matrices	42
4.1.2 Bestimmung der vaskularisierten Matrixfläche	44
4.1.3 Bestimmung der Gefäßdichte	46

4.1.4	Bestimmung der Gefäßverzweigungspunkte	48
4.2	qPCR	51
4.2.1	Relative Expression VEGF	51
4.2.2	Relative Expression HIF-1 α	52
4.2.3	Relative Expression MMP-13	53
4.2.4	Relative Expression NOS2	55
4.3	Histologie	56
5	Diskussion	58
5.1	Das CAM-Assay und seine Limitationen	58
5.2	Seidenfibroinmatrices als Alternative in der Weichgewebschirurgie	61
5.2.1	Diskussion der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie	62
5.2.2	Diskussion der Ergebnisse der Histologie	64
5.2.3	Diskussion der Ergebnisse der qPCR	65
5.3	Diskussion der Biofunktionalisierung von Matrices	69
5.3.1	Einfluss von i-PRF auf die Neovaskularisation und Inflammation	69
5.3.2	Einfluss von Schmelz-Matrix-Proteinen auf die Neovaskularisation und Inflammation	73
5.4	Ausblick auf mögliche therapeutische Anwendungen	75
6	Zusammenfassung	77
	Literaturverzeichnis	79
	Hilfsmittelverzeichnis	95
	Anhang	96
	Danksagung	98
	Tabellarischer Lebenslauf	99

Abkürzungsverzeichnis

18S	18S-ribosomale RNA
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Aqua dest	destilliertes Wasser
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CM	Kollagenmatrix
Ct-Wert	<i>cycle-threshold</i> -Wert
DGI	Deutsche Gesellschaft für Implantologie
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDD	<i>egg development day</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ePTFE	expandierte Polytetrafluorethylen
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBR	<i>guided bone regeneration</i>
GTR	<i>guided tissue regeneration</i>
H6PD	Hexose-6-Phosphat Dehydrogenase
HE-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
iNOS	<i>induced nitric oxide synthase</i>
i-PRF	<i>injectable platelet rich fibrin</i>
JPEG	<i>joint photographic experts group</i>
KEM	Knochenersatzmaterial
M	Mittelwert
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
MMP-13	Matrix-Metalloproteinase 13
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase 2
n	Stichprobenanzahl
NOS2	<i>nitric oxide synthase 2</i>
Nr.	Nummer
PCL	Polycaprolacton
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Polylactidsäure
PRF	<i>platelet rich fibrin</i>

PTFE	Polytetrafluorethylen
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>region of interest</i>
RPL4	Ribosomales Protein L4
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
SD	Standardabweichung
SFM	Seidenfibroinmatrix
SMP	Schmelz-Matrix-Protein
TIF	<i>tagged image file</i>
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VSI-Format	<i>visual studio content installer format</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Kits und Primer.....	21
Tabelle 2: Lösungen und Puffer.....	21
Tabelle 3: Geräte.....	22
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.	23
Tabelle 5: Software.	24
Tabelle 6: Versuchstiere und Matrices.....	24
Tabelle 7: Übersicht über die Versuchsgruppen.	28
Tabelle 8: Protokoll zur HE-Färbung.....	40
Tabelle 9: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 10	43
Tabelle 10: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 12	43
Tabelle 11: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 14	43
Tabelle 12: Messwerte Vaskularisierte Matrixfläche	46
Tabelle 13: Messwerte Gesamtgefäßdichte.....	48
Tabelle 14: Messwerte Gefäßverzweigungspunkte.	50
Tabelle 15: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen VEGF.	52
Tabelle 16: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen HIF-1 α	53
Tabelle 17: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen MMP-13.	54
Tabelle 18: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen NOS2.	56
Tabelle 19: Protokoll Umschreibung in cDNA.	96
Tabelle 20: Sequenzen der Primer.	96
Tabelle 21: Protokoll qPCR für RPL4 und VEGF	96
Tabelle 22: Protokoll qPCR für HIF-1 α , MMP-13, NOS2.....	97
Tabelle 23: Zusammensetzung PCR-Bestandteile-Mix.....	97
Tabelle 24: Protokoll Einbettautomat Histologie.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung von Matrices aus Seidenfibroin.	14
Abbildung 2: Ablauf CAM-Assay.....	25
Abbildung 3: Auflage einer Seidenfibroin- (links) und einer Kollagenmatrix (rechts)	26
Abbildung 4: Versuchsablauf in schematischer Übersicht.....	27
Abbildung 5: Versuchsaufbau der Biofunktionalisierung mit i-PRF und SMP.	29
Abbildung 6: Exemplarische Bilder der Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie.	31
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Amplifikationskurve.....	37
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Schmelzkurve und deren Änderungsrate.	37
Abbildung 9: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 10, EDD 12 und EDD 14.....	42
Abbildung 10: Vaskularisierte Matrixfläche an EDD 12.	44
Abbildung 11 Vaskularisierte Matrixfläche an EDD 14.	45
Abbildung 12: Gesamtgefäßdichte an EDD 12.	47
Abbildung 13: Gesamtgefäßdichte an EDD 14.	47
Abbildung 14: Gefäßverzweigungspunkte an EDD 12.	49
Abbildung 15: Gefäßverzweigungspunkte an EDD 14.	50
Abbildung 16: Übersicht relative Expression der qPCR für das Gen VEGF	51
Abbildung 17: Übersicht relative Expression für das Gen HIF-1 α	53
Abbildung 18: Übersicht relative Expression für das Gen MMP-13.	54
Abbildung 19: Übersicht relative Expression der qPCR für das Gen NOS2.	55
Abbildung 20: HE-Färbung der in die CAM integrierten Matrices.	57

1 Einleitung und Ziele der Dissertation

In den letzten Jahren hat der Forschungszweig des *Tissue Engineerings* eine besonders ausgeprägte Dynamik entwickelt. Trotz einer Vielzahl an Ersatzmaterialien, die Gewebe regenerieren oder rekonstruieren können, ist es bisher weder mit biologischen noch mit synthetischen Materialien gelungen, den heutigen Anforderungen vollumfänglich gerecht zu werden. Die Alterung der Bevölkerung und die steigenden ästhetischen Ansprüche führen zu einer wachsenden Nachfrage nach Produkten, mit denen sich geschädigtes oder verloren gegangenes Gewebe wiederherstellen lässt. Während autologes Material auch heute häufig noch als Goldstandard für die Regeneration von Hart- und Weichgewebe angesehen wird, darf die damit verbundene Morbidität nicht außer Acht gelassen werden. Daher besteht ein großes Interesse an fortschrittlichen Gewebeersatzmaterialien, um adäquate Alternativen zu körpereigenen Transplantaten zu schaffen. Dennoch weisen die bislang erhältlichen Produkte aufgrund immunologischer Fremdkörperreaktionen oder mechanischer Schwächen Nachteile auf, die den Wunsch nach innovativen Ansätzen auch weiterhin bestärken.

Eines dieser vielversprechenden Materialien für das *Tissue Engineering* ist Seide. Das aus dem Kokon des Seidenspinners gewonnene Material besteht hauptsächlich aus dem Protein Seidenfibroin und kann durch verschiedene Herstellungsverfahren zu unterschiedlichen Formen wie Matrices, Schwämmen oder Hydrogelen verarbeitet werden. Moderne 3D-Druckverfahren ermöglichen auch die Anfertigung patientenindividueller Implantate aus diesem Material. Die vorteilhaften biologischen Eigenschaften und die gute mechanische Festigkeit machen Seide in diesem Zusammenhang zu einem vielversprechenden Material.

Für die erfolgreiche Integration von Transplantaten sind die immunologische Toleranz und die Vaskularisation des Materials von besonderer Bedeutung. Um das Einwachsen von Gefäßen in den Gewbeersatz zu stimulieren, werden Matrices mit unterschiedlichen Substanzen biofunktionalisiert. Das Thrombozytenkonzentrat PRF (*platelet rich fibrin*) stellt eine vielversprechende Methode zur Beschleunigung der Neovaskularisation von Gewbeersatzmaterialien dar. Aufgrund seiner proangiogenen und wundheilungsfördernden Eigenschaften wird es in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bereits vielfältig eingesetzt. In seiner flüssigen Form als i-PRF (*injectable platelet rich fibrin*) enthält es eine besonders hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren, was seine proliferationsfördernde Wirkung erklärt.

Vor allem in der Parodontologie verwendete Schmelz-Matrix-Protein-Derivate (SMP-Derivate) fördern die Regeneration oraler Weichgewebe durch ihren positiven Einfluss auf die Proliferation und Angiogenese mikrovaskulärer Zellen. Das aus porcinen Zahnkeimen gewonnene kommerziell erhältliche Präparat Emdogain® (Straumann®, Basel, Schweiz) kann

die Expression von Wachstumsfaktoren modulieren und auf diese Weise die Wundheilung beschleunigen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Neovaskularisation und Immunantwort auf biofunktionalisierte Seidenfibroinmatrices (SFM) *in ovo* zu untersuchen, um die klinische Anwendbarkeit für die orale Weichgeweberegeneration im Vergleich zu herkömmlichen Kollagenmatrices (CM) festzustellen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Weichgewebsregeneration in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

2.1.1 Definition

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, der Oralchirurgie und der Zahnheilkunde werden Transplantate unterschiedlicher Herkunft verwendet, um defizitäre oder defekte Gewebe zu ersetzen. Dabei wird zwischen Hart- und Weichgewebsaugmentaten unterschieden. Während Hartgewebsaugmentate meist dem Aufbau des Alveolarkamms dienen, haben letztere die Bildung und Wiederherstellung der oralen Weichgewebe zum Ziel (1, 2). Hierbei werden die Gewebeersatzmaterialien in Präparate autologen, allogenen, xenogenen und alloplastischen Ursprungs eingeteilt (3). Präparate, die aus einem Individuum gewonnen und in demselben verwendet werden, gelten als autolog. Allogene Materialien stammen aus derselben Spezies, aber nicht demselben Individuum. Gewebeersatzprodukte, die aus einer anderen Spezies gewonnen werden, werden als xenogen bezeichnet, wohingegen alloplastische Ersatzmaterialien einen synthetischen Ursprung haben (4).

2.1.2 Indikationen für Weichgewebsaugmentationen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Oralchirurgie

Je nach Indikation werden für den Aufbau und Ersatz von Weichgewebe unterschiedliche autologe Transplantate oder Fremdmaterialien genutzt.

In Zusammenhang mit Implantaten sind Weichgewebsaugmentationen in jüngster Zeit besonders in den Fokus der Wissenschaft gerückt und dienen häufig der Verbreiterung der keratinisierten Gingiva mittels Vestibulumplastik (5, 6). Dabei wird der Einfluss der Breite der keratinisierten Mukosa auf die periimplantäre Gesundheit kontrovers diskutiert (7). Ein Mangel wird mit einer erhöhten Inzidenz von Periimplantitis, Plaqueakkumulation, Gewebeentzündung, Rezession und einem Verlust des klinischen Attachments assoziiert (8-10). Um die Langzeitprognose von Implantaten zu verbessern, scheint daher die Breite der keratinisierten Mukosa von maßgeblicher Bedeutung zu sein (11, 12). Korrekturen des periimplantären Gewebes können präimplantologisch, zeitgleich mit der Implantatinserterion, bei der Freilegung oder erst nach der Freilegung durchgeführt werden (3). In der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) für periimplantäre Weichgewebsaugmentation wird außerdem festgehalten, dass die Verbreiterung der keratinisierten Gingiva mittels autologen Bindegewebs- oder Schleimhauttransplantaten keinen negativen Einfluss auf den unterliegenden Alveolarknochen besitzt (13). In Fällen defizitärer periimplantärer

Weichgewebesituationen sollte die Vestibulumplastik daher zur Verbesserung der Hygienefähigkeit und Ästhetik angeboten werden. Als Goldstandard für die Verbreiterung der keratinisierten Gingiva werden in der Literatur meist freie Schleimhauttransplantate aus dem Gaumen genannt (3, 14). Diese Transplantate sind insbesondere in Kombination mit lokalen Lappenplastiken eine effektive Möglichkeit zur Verbreiterung der Gingiva (3) und zeichnen sich durch eine gute Vorhersagbarkeit aus. Sie weisen jedoch aufgrund ihrer schwachen farblichen Übereinstimmung mit dem Umgebungsgewebe häufig eine mangelhafte Ästhetik auf (15). Ästhetisch ansprechendere Ergebnisse werden mit azellulären dermalen Matrices (16) und mit CM (17, 18) erzielt. Beide zeigen jedoch eine erhöhte Schrumpfung des Materials die durch die Verwendung größerer Transplantate ausgeglichen werden können (15-17). Während unter Nutzung azellulärer dermaler Matrices eine verzögerte Wundheilung zu beobachten ist (16), konnte mit CM eine zu autologen Transplantaten vergleichbar rasche Heilung beobachtet werden (14, 17-19). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse xenogener Materialien ohne Notwendigkeit der Transplantatentnahme und der hiermit einhergehenden Entnahmemorbidität ist das freie Schleimhauttransplantat als Goldstandard für die Vestibulumplastik umstritten (1, 12, 18).

Eine weitere Indikation für den Einsatz von Matrices stellt die periimplantäre Weichgewebeverdickung dar. Eine ausreichende Dicke der das Implantat umgebenden Weichgewebsmanschette trägt dazu bei, den marginalen Knochenabbau zu minimieren (6, 20-22). Häufig wird periimplantäres Weichgewebe auch aus ästhetischen Gründen augmentiert, um beispielsweise durch die Gingiva sichtbare Implantatbestandteile zu verdecken und die Rot-Weiß-Ästhetik zu verbessern (15). Hierfür werden in der Regel subepitheliale Bindegewebestransplantate verwendet (3). Im Gegensatz zu den freien Schleimhauttransplantaten wird lediglich das direkt unter dem Epithel liegende Bindegewebe entnommen (23). Freie Bindegewebestransplantate können sowohl aus dem Gaumen als auch aus dem Tuber maxillae gewonnen werden (1, 15). Aus ästhetischer Sicht werden hierbei bessere Ergebnisse als mit freien Schleimhauttransplantaten erzielt (15) und gleichzeitig eine stärkere Volumenzunahme erreicht, sodass diese in dieser Indikation den freien Schleimhauttransplantaten überlegen sind (24). Eine vielversprechende Alternative zu freien Bindegewebestransplantaten stellen in dieser Indikation kollagene Matrices dar (25). Diese zeigen inzwischen eine vergleichbare Volumenstabilität wie autologe Transplantate und können somit als valide Alternative angeboten werden (26, 27).

Abseits der *guided tissue regeneration* (GTR) werden Matrices außerdem in der gesteuerten Knochenregeneration (GBR) eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden Alveolarkammdefekte durch die Augmentation mit Eigenknochen oder Knochenersatzmaterialien rekonstruiert, häufig mit dem Ziel, ein suffizientes Knochenangebot für die anschließende Implantation zu schaffen (28). Matrices dienen hierbei sowohl der Stabilisierung als auch dem Schutz des

partikulären Materials (1), indem sie selbiges an Ort und Stelle fixieren und das Einwachsen von nicht für die Knochenregeneration förderlichem Weichgewebe verhindern (29, 30). Während der Nutzen der Barrierefunktion von Matrices in der Literatur kontrovers diskutiert wird (28, 29), stellt deren Einsatz einen klaren Vorteil für die anschließend erreichbare Volumenzunahme des Alveolarkamms dar. Die Anwendung von Matrices wird für die Regeneration periimplantärer Dehiszenzdefekte und die Behandlung komplexer Alveolarkammdefekte von bis zu 3 mm als klinischen Standard gesehen und in der Leitlinie der DGI (31) explizit empfohlen. Bei der Auswahl der Matrix ist die Dimension des zu rekonstruierenden Defektes zu berücksichtigen. Für den Knochenaufbau mit partikulärem Material empfiehlt die DGI bei kleineren Alveolarkammdefekten von bis zu 3 mm die Verwendung von Kollagen-, PTFE-, PGA- und PLA-Matrices (31). Unter den genannten Materialien zeigen resorbierbare CM das günstigste Verhältnis zwischen Defektfüllung und Komplikationsrate (31, 32). Gegenüber den bei größeren Defekten indizierten titanverstärkten PTFE-Matrices zeichnen sich diese durch ein vorteilhaftes Degradationsverhalten aus womit kein Bedarf an einem Zweiteingriff zur Entfernung des Materials besteht (31). Die rasche Degradation und geringe Volumenstabilität von CM limitieren jedoch ihren Einsatz bei größeren Augmentationen (33).

Die Deckung von häufig durch Parodontitis verursachten Rezessionen stellt eine weitere Indikation für die Nutzung von Weichgewebersatzmaterialien dar. Noch vor 40 Jahren wurden hierfür meist freie Schleimhauttransplantate verwendet, die vor allem im sichtbaren Bereich zu erheblichen ästhetischen Beeinträchtigungen führten (23). Mit der 1985 durch Raetzke erstmals beschriebenen *Envelope*-Technik (34) begannen sich autologe freie Bindegewebstransplantate aus dem Gaumen zunehmend durchzusetzen. Inzwischen existieren verschiedene Alternativen, um auf die Entnahme autologer Gewebe verzichten zu können, hierunter azelluläre dermale und kollagene Matrices sowie SMP-Derivate (35, 36). Diese werden aus ästhetischen Gründen meist mit Verschiebelappenplastiken kombiniert (36, 37). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Nutzung von SMP-Derivaten bei parodontalchirurgischen Eingriffen zu einem stärkeren Rückgang der Rezession führt, als dies bei einer reinen Lappenplastik zu erwarten wäre (36). Subepitheliale Bindegewebstransplantate in Kombination mit koronalen Verschiebelappen erzielten in Studien eine noch bessere Wurzeldeckung als freie Schleimhauttransplantate, allogene Alternativen, CM und SMP-Derivate (35, 36, 38). Sie gelten daher als

Goldstandard für die Deckung von Rezessionen an Zähnen und Implantaten (15, 23, 36). Um die mit der Entnahme autologer Transplantate einhergehende Entnahmemorbidität zu vermeiden, kann auf die Kombination von SMP-Derivaten mit CM zurückgegriffen werden (39, 40).

Weichgewebsaugmentate besitzen auch neben den bereits beschriebenen implantologischen und parodontologischen Indikationen ein breites Anwendungsspektrum. Sie werden unter anderem in der präprothetischen Chirurgie für die Optimierung des Prothesenlagers (24) oder in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die Behandlung tumorbedingter Weichgewebsdefekte eingesetzt (4). Der Fokus der vorliegenden Arbeit soll auf den bereits genannten Indikationen zur Regeneration von periimplantären Weich- und Hartgewebsdefekten liegen.

2.1.3 Einteilung der herkömmlichen Weichgewebsersatzmaterialien

Die im Kopf-Hals-Bereich verwendeten Biomaterialien können in biologisch gewonnene und synthetisch hergestellte Materialien unterteilt werden. Biologisch gewonnene Materialien lassen sich weiter in Präparate autologen, allogenen und xenogenen Ursprungs einteilen.

Autologe Transplantate werden häufig für die Rekonstruktion von Weichgewebe und Knochen genutzt (41). Während die Verwendung allogener und xenogener Materialien zu inflammatorischen Reaktionen oder sogar zur Abstoßung des Präparates führen kann (42), werden autologe Präparate durch den Organismus deutlich besser toleriert. Ist das Ziel der Gewebeaugmentation ein rascher Umbau des Gewebeersatzes in körpereigenes Weichgewebe, so gilt autologes Gewebe als Goldstandard, da es Wachstumshormone enthält, die den Umbau beschleunigen können (43). Der große Nachteil der autologen Präparate liegt jedoch in der Entnahmemorbidität, die in postoperativen Schmerzen, Blutungen und Schwellungen bestehen kann (44, 45). Neben ästhetischen Beeinträchtigungen durch eine verstärkte Narbenbildung besteht die Gefahr von Wundinfektionen an den Entnahmestellen (46). Des Weiteren limitiert die Anatomie an den Entnahmestellen die Größe und Verfügbarkeit von autologen Transplantaten (47). Neben der methodenimmanenten Morbidität werden außerdem bei Verwendung autologer Gewebe längere Operationszeiten benötigt, die sich ebenfalls nachteilig auf die Gesundheit und das Wohlbefinden insbesondere multimorbider Patienten auswirken können (25). Zudem weisen sie eine nicht zu vernachlässigende Schrumpfrate auf (48).

Allogene Gewebeersatzmaterialien sind nahezu unbegrenzt verfügbar und werden häufig über Biobanken bereitgestellt. Diese unterliegen der deutschen Arzneimittelverordnung und entsprechend strengen Regularien (31). Bei der Herstellung von Allografts wird durch aufwendige, chemische, enzymatische und physikalische Verfahren sichergestellt, dass keine potenziell infektiösen Materialien auf den Empfänger übertragen werden (49). Für die Weichgeweberegeneration produzierte Allografts werden meist aus Spenderhaut hergestellt und vor allem in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie, zur Behandlung von Verbrennungen und der Brustrekonstruktion eingesetzt. Die am häufigsten beschriebene azelluläre dermale Matrix ist AlloDerm® (AlloDerm Regenerative Tissue Matrix, LifeCell

Corporation, Bridgewater, USA), die in Deutschland allerdings bislang nicht zugelassen ist. Sie wurde bereits verwendet, um befestigte Gingiva aufzubauen und durch Tumore oder Mundschleimhauterkrankungen entstandene orale Defekte zu versorgen (4). Im Hinblick auf den klinischen Attachmentgewinn und die bedeckte Wurzeloberfläche führte die Matrix zwölf Wochen nach Rezessionsdeckung zu vergleichbaren Ergebnissen wie subepitheliale Bindegewebs-transplantate. Langzeitergebnisse aus derselben Studie zeigten jedoch, dass nur ein Drittel der Rezessionsdeckungen nach vier Jahren noch stabil war (50).

Üblicherweise werden xenogene CM für den Ersatz von Weichgewebsdefekten verwendet. Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein bei Säugetieren (51) und wird in der Medizin unter anderem als Nahtmaterial und zur Weichteil- und Knochenregeneration eingesetzt. Es wird in Form von Hydrogelen, Matrices, Schwämmen oder als Gerüstmaterial im *Tissue Engineering* verwendet (52). CM bestehen aus verschiedenen Kollagenfasern, verleihen dreidimensionale Stabilität und sind biologisch abbaubar. Die Struktur des Kollagens kann durch das Verhältnis von steiferen quervernetzten Kollagenfasern synthetischen Ursprungs und flexibleren natürlichen Fasern eingestellt werden. Im Dentalbereich werden meist bovine (1), equine (53) oder porcine (54) Kollagenfasern verwendet. Letztere werden aus der Dermis, dem Perikard oder dem Peritoneum gewonnen. Ein bislang ungelöstes Problem besteht jedoch in der relativ hohen Schrumpfrate der Matrices, die auf die gute Abbaubarkeit durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zurückzuführen ist (55-57). Zur Herstellung von Kollagen in Form von Matrices sind aufwendige Isolations- und Reinigungsverfahren notwendig, sodass hohe Verarbeitungskosten entstehen. Insbesondere die hohe Schrumpfrate während der Einheilung, die geringe Volumenstabilität und das eher theoretische Risiko einer Infektionsübertragung von Materialien tierischen oder humanen Ursprungs auf den Menschen schränken den Einsatz von Kollagen als Weichgewebsersatzmaterial ein (33, 52). Trotz des jahrzehntelangen Einsatzes von Kollagen als Gewebeersatzmaterial, gibt es bislang keine wissenschaftlich belegte Infektionsübertragung (1, 58).

Für diese Studie wurde die porcine CM Mucoderm® (Botiss Dental, Berlin, Deutschland) verwendet. Bei der Mucoderm® handelt es sich um eine dermale, nicht quervernetzte Matrix, die aus Kollagenfasern des Typs 1 und 3 und Elastin besteht (59, 60). Der Hersteller gibt die Dicke der Matrix mit 1,2–1,7 mm an und empfiehlt, diese vor der Anwendung in physiologischer Kochsalzlösung, Blut oder Thrombozytenkonzentrat zu rehydrieren. Kasaj et al. fanden heraus, dass eine Rehydrierungsdauer von 10–20 min für eine suffiziente Hydratation der Matrix erforderlich ist (60). Sowohl in trockenem als auch in rehydriertem Zustand weist die Matrix eine gute Zugfestigkeit und ein hohes Elastizitätsmodul auf (60). Um das mit natürlichem Kollagen einhergehende Risiko der Immunogenität zu minimieren (61), werden laut Hersteller in einem Aufreinigungsprozess alle antigenen Bestandteile entfernt. Das

dreidimensionale Netz der Matrix, bestehend aus dünnen Kollagenfasern, ermöglicht die Besiedlung mit Fibroblasten und Blutgefäßen (37, 62), die zu dem Ersatz der Matrix durch neu gebildetes Weichgewebe beitragen (63). In Tierversuchen zeigte die Mucoderm®-CM eine gute Integration in das Weichgewebe und eine hohe Revaskularisation der Matrix (64, 65). Auch in klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass chirurgisch periimplantär eingebrachte Mucoderm®-CM die keratinisierte Mukosadicke erhöht (66, 67) und damit das Rezessionsrisiko verringern kann. Bei Weichgewebsaugmentationen im Zusammenhang mit Sofortimplantationen zeigte diese CM vergleichbare ästhetische Ergebnisse wie Bindegewebstransplantate aus dem Tuber maxillae (68).

Als biologische resorbierbare Ersatzmaterialien werden häufig Komponenten der extrazellulären Matrix verwendet. Dazu gehören neben den körpereigenen Polymeren Elastin, Fibronectin und Kollagen auch die aus anderen Organismen gewonnenen Polymere Chitosan und Alginat. Elastin ist ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix der Haut und verleiht ihr Flexibilität und Widerstandsfähigkeit. Da sich die mechanischen Eigenschaften von Elastin und Kollagen im Körper ergänzen, wird Elastin meist in Kombination mit dem stabilisierenden Kollagen zu Matrices verarbeitet. Elastin kann jedoch auch mit Polyurethan und Chitosan kombiniert werden (69). Hafemann et al. zeigten eine gute Vaskularisationsrate für mit Keratinozyten besetzte Matrices, die zu 30 Prozent aus Elastin und zu 70 Prozent aus Kollagen bestanden. Als nachteilig erwies sich jedoch die hohe Schrumpfrate der Matrices durch eine rasche Degradation, die während der Einheilung auftritt (70, 71).

Das für den Gewebeersatz verwendete zelluläre Fibronectin kommt in der Basalmembran und in der extrazellulären Matrix vor und ist an der Neubildung und an dem Umbau von Gewebe während der Wundheilung beteiligt (72). Es bindet über Rezeptoren an Fibrin und Kollagen. Die Biofunktionalisierung von CM mit Fibronectin zeigte *in vitro* eine verbesserte Zelladhäsion und osteogene Differenzierung im Vergleich zu unbehandelten CM (73). Auch das Biopolymer Chitosan, das hauptsächlich aus dem Chitin von Garnelen- und Krabbenschalen gewonnen wird, findet vielfältige Anwendung im *Tissue Engineering*. Es handelt sich um ein natürliches, stark basisches Polysaccharid, das in den letzten Jahren aufgrund seiner guten Abbaubarkeit, Biokompatibilität und antibakteriellen Wirksamkeit in den Fokus der Biomedizin gerückt ist (74, 75). Die antibakterielle Wirksamkeit von Chitosan wird jedoch durch seine Wasserunlöslichkeit stark eingeschränkt. Neben Chitosan wird auch das aus Algen gewonnene Polysaccharid Alginat als Gewebeersatzmaterial untersucht. Alginat besitzt vorteilhafte antibakterielle Eigenschaften und eine schnelle Degradationsrate (76). Es ist biokompatibel und kann in 3D-Druckverfahren verarbeitet werden. Präklinische *in-vivo* Versuche haben gezeigt, dass Alginat als Transplantatersatz für die Regeneration von Weichgewebe und Knochen geeignet sein könnte (77).

Die steigende Nachfrage nach veganem Gewebeersatz treibt die Entwicklung pflanzlicher Ersatzmaterialien voran. Einen dieser neuen Forschungsansätze im *Tissue Engineering* verfolgen Kohlhaas et al. mit der Verwendung von Algenmatrices. Sie stellten solche in einer Kombination von Algenpulver aus Rot- und Braunalgen und PLA her. Algen zeichneten sich je nach Art durch antimikrobielle, antiallergische, antioxidative, antikanzerogene und immunstimulierende Eigenschaften aus. Insbesondere die Kombination der Alge *Sargassum vulgare* mit PLA zeigte *in vitro* proliferative Effekte auf Fibroblasten und Osteoblasten und antiproliferative Effekte auf Osteosarkomzellen. Die Algenmatrices wiesen jedoch aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften eine schlechte Benetzbarkeit auf (78).

Synthetisch hergestellte alloplastische Materialien sind nahezu unbegrenzt verfügbar und weisen, im Gegensatz zu biologisch gewonnenen Matrices, kein Infektionsrisiko auf. Alloplastische Ersatzmaterialien für den enoralen Einsatz werden in nicht resorbierbare und resorbierbare Materialien unterteilt. Nicht resorbierbare Gewebeersatzmaterialien bestehen meist aus Polytetrafluorethylen (PTFE) oder dem feinporigeren expandierten PTFE (ePTFE). Diese synthetischen Materialien sind bioinert, porös und flexibel (79, 80) und werden neben der GTR auch für Gefäßprothesen und als Beschichtung für Stents eingesetzt (81, 82). Neben der im Tierversuch nachgewiesenen guten Zugfestigkeit (80) sind die Matrices chemisch stabil, so dass keine starke Immunreaktion des Wirtes auftritt (83). Die ausgeprägte Barrierefunktion kann jedoch zu einer eingeschränkten Blutversorgung des umliegenden Gewebes und zu Dehiszenzen der Wunde führen (12, 13). Um der Matrix eine bessere Formstabilität zu verleihen, können auch mit Titan verstärkte PTFE-Matrices verwendet werden. Die Titanverstärkung ist dabei meist von PTFE umhüllt und bietet im Rahmen der GBR den Vorteil, dass ein formstabiler Hohlraum zwischen der Matrix und dem Knochen gebildet wird (1). Die Formstabilität der Matrix verringert zusätzlich das Risiko, dass die Matrix bei dem Vernähen des Weichgewebes deformiert und in den Defekt hineingezogen wird (84). Da PTFE nicht resorbierbar ist, ist ein zweiter chirurgischer Eingriff erforderlich, um die Matrix zu entfernen. Höhere Kosten und ein erneutes Infektionsrisiko durch den Zweiteingriff sind mögliche Folgen dieses Vorgehens (85).

Um die Risiken und Kosten einer zweiten Operation zu vermeiden, wurden synthetische resorbierbare Matrices entwickelt. Zu dieser Klasse von Matrices gehören die auf Polyester basierenden Kunststoffe PLA (Polylactidsäure), PCL (Polycaprolacton) und PGA (Polyglykolsäure) sowie Polyurethan. Diese Materialien sind sowohl biokompatibel (86-89) als auch durch Hydrolyse und Phagozytose bioresorbierbar (90). Durch Hydrolyse werden PLA und PGA zu Milchsäure und Glykolsäure abgebaut und schließlich im Citratzyklus zu Kohlendioxid und Wasser verstoffwechselt (91). Der bei der Metabolisierung entstehende erhöhte Säurespiegel kann jedoch inflammatorische Reaktionen auslösen (92), die zu einer verzögerten Wundheilung und Narbenbildung führen können (93). Milella et al. konnten

zeigen, dass kommerzielle biodegradierbare Matrices auf Polyesterbasis bereits innerhalb von 30 Tagen ihre Zugfestigkeit verlieren (94). Der frühe Verlust der mechanischen Belastbarkeit schränkt den Einsatz als langfristiger Platzhalter ein. Matrices, die zu je 50 Prozent aus Polylactid und Polyglykolid bestehen, konnten in Humanstudien weder die epitheliale Migration verhindern noch zu einer Verbesserung des bindegewebigen Attachments führen (95). Polyurethan weist im Vergleich zu PTFE eine bessere Elastizität und eine relativ gute Blutkompatibilität auf. Die geringere Zugfestigkeit und das Thrombose- und Entzündungsrisiko stellen jedoch Hindernisse für den Einsatz von Polyurethan als Gewebeersatzmaterial dar (96, 97).

Die in diesem Abschnitt genannten Gewebeersatzmaterialien weisen Schwächen hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften oder ihrer immunologischen Verträglichkeit auf. Optimalerweise sollte das Ersatzmaterial gute mechanische Eigenschaften, eine geringe Schrumpfung und Immunogenität *in vivo* aufweisen und gleichzeitig bioaktive, die Wundheilung fördernde Eigenschaften besitzen (33). Damit das Ersatzmaterial langfristig durch neu gebildetes Gewebe ersetzt werden kann, muss es zudem resorbierbar und biokompatibel sein. Dabei ist die Resorptionsrate von entscheidender Bedeutung, da das orale Weichgewebe eine Regenerationszeit von 4 bis 6 Wochen benötigt (98, 99). Darüber hinaus müssen die Materialien eine ausreichende Festigkeit aufweisen, um ein Kollabieren in den Defekt zu verhindern und die Barrierefunktion der Matrix aufrecht zu erhalten. Ein Material, das alle Anforderungen in höchstem Maße erfüllt, liegt nach derzeitigem Stand der Forschung noch nicht vor. Umso größer ist die Motivation, ein Gewebeersatzmaterial zu entwickeln, das den heutigen Anforderungen gerecht wird. Innovative Forschungsansätze zu Matrices aus Algen oder Seide könnten einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, dem Ziel eines vollständig immunologisch tolerierten und integrierten funktionellen Gewebeersatzes einen Schritt näher zu kommen.

2.1.4 Seidenfibroin als Gewebeersatzmaterial

Seide wird seit über 4000 Jahren in der Textilindustrie verwendet und gilt in der regenerativen Medizin als mögliche Alternative zu herkömmlichen Gewebeersatzmaterialien. Das natürliche Polymer wird in speziellen Drüsen von Arthropoden produziert (100, 101) und kommt in der Natur in verschiedenen Formen vor, von denen die Kokonseide des Seidenspinners *Bombyx mori* und die Spinnenseide von *Nephila clavipes* die bekanntesten sind. Die in diesem Versuch verwendete Kokonseide besteht aus den Proteinen Fibroin und Sericin. Das Faserprotein Fibroin liegt in Form von schweren (~350 kDa) und leichten (~25 kDa) Ketten vor (102, 103). Sericin verklebt die Fibroinketten miteinander und führt so zur Bildung des Kokons (103, 104). Ein einziger Seidenspinnerkokon besteht aus 800 m dieses biokompatiblen (105) und biodegradierbaren Materials (103). Aufgrund ihrer guten Handhabbarkeit, Bindefähigkeit,

Flexibilität und mechanischen Festigkeit werden Seidenfäden häufig zur Versorgung von intraoralen oder dermalen Wunden verwendet (106, 107). Seide ist durch die FDA (*Food and Drug Administration*) als Nahtmaterial und Stützstruktur in der rekonstruktiven Chirurgie zugelassen (108) und weist eine geringe Toxizität (101), Immunreaktivität (109) und individuell modifizierbare mechanische Belastbarkeit auf (100, 110). Seidenfibroin kann durch verschiedene Herstellungstechniken zu Fasern (111), Filmen (112), Matrices (105), Kapseln (113), Mikrosphären (114), Hydrogelen (115) und Schwämmen (116) verarbeitet werden. Durch Modifikation der Materialstruktur können sowohl die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung als auch die Degradationsrate *in vivo* reguliert werden (101, 110, 117). Moderne Techniken wie das Elektrosplennen ermöglichen es, Seidenfibroinfasern in unterschiedlichen Anordnungen und Faserdurchmessern bis in den Nanometerbereich zu verarbeiten und somit die biologischen und mechanischen Eigenschaften der Matrix individuell einzustellen (118). Nicht zuletzt können inzwischen auch 3D-gedruckte *Scaffolds* (110, 119) und patientenindividuelle Implantate aus Seidenfibroin hergestellt werden (120).

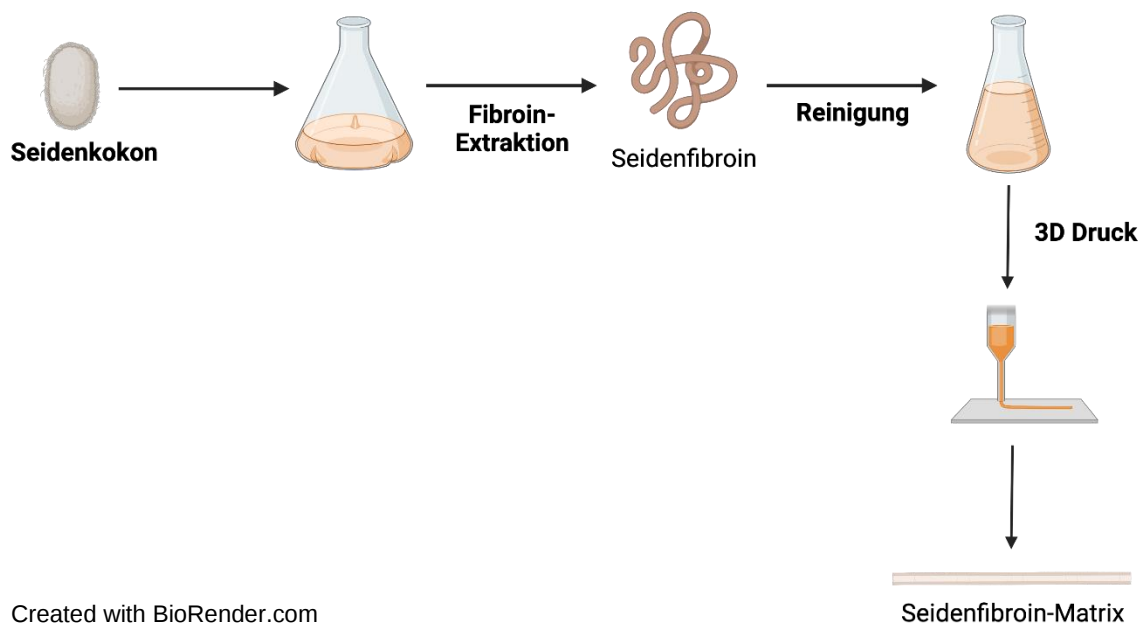


Abbildung 1: Herstellung von Matrices aus Seidenfibroin.

Zunächst wird die aus dem Seidenkokon gewonnene Rohseide in einer alkalischen Lösung entbastet. Durch die Entfernung der Sericinschicht kann das Fibroin extrahiert werden. Anschließend wird die getrocknete und entbastete Seide in eine Lösung aus CaCl_2 , Ethanol und Wasser überführt und einem Reinigungs- und Neutralisationsprozess unterzogen. Aus der so gewonnenen regenerierten Seide können mittels 3D-Druck Seidenfibroinmatrices hergestellt werden.

Der Herstellungsprozess von SFM ist in Abbildung 1 dargestellt und umfasst die Prozesse Entbasten, Lösen und Regenerieren der Seide. Rohseide besteht aus zwei parallel verlaufenden Fibroinfasern, die von einer Sericinschicht umhüllt sind. Die Entfernung der

Sericinschicht wird als Entbaste bezeichnet und kann enzymatisch, mit Seife oder säureunterstützt erfolgen (121, 122).

Die vielversprechenden Eigenschaften von Seidenfibroin eröffnen ein breites Anwendungsspektrum im *Tissue Engineering*. Die Regeneration von Knochen, Knorpel, Bändern, Sehnen, Gefäßen und Nerven wurde bereits *in vitro* und *in vivo* untersucht (123, 124). Huang et al. gelang es, Nervendefekte bei Ratten mittels Seidenkonstrukten zu überbrücken (125) und auch Forschungsansätze zu dem Ersatz von Herz- oder Lebergewebe (126, 127) und dem Einsatz transluzenter SFM zur Regeneration der Kornea (112) sind bereits etabliert. Klinische Studien belegen die Möglichkeit der Generierung von Stents aus Seidenfibroin zur Behandlung von Aneurysmen (124, 128, 129) und die Beschleunigung der Wundheilung der Haut durch Seidenfibroinfilme (130).

In Versuchen an Ratten zeigten SFM bei der GBR im Vergleich zu CM kaum Unterschiede im Hinblick auf das Ausmaß der Knochenneubildung in Defekten an der Schädelkalotte (131, 132). Smeets et al. konnten in einem Tierversuch zeigen, dass die für die GBR üblicherweise verwendeten CM im Vergleich zu SFM schneller resorbiert werden (105). Die langsamere und individuell anpassbare Degenerationsrate der SFM könnte in diesem Zusammenhang dazu in der Lage sein, die Regeneration knöcherner Defekte durch die Förderung selbiger zu erleichtern. Der Erfolg der Geweberegeneration hängt entscheidend von der Vaskularisation der Matrices nach der Applikation ab (133, 134). Eine Strategie zur Förderung der Angiogenese besteht in der Besiedlung der Matrices mit Angiogenesefaktoren. Luo et al. konnten im Tierversuch bei mit den Angiogenesefaktoren VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und Ang-1 (Angiopoietin-1) transfizierten SFM, die von Spalthaut bedeckt wurden, eine beschleunigte Angiogenese und dermale Wundheilung nachweisen (133). Auch mit humanen Fettstammzellen besiedelte SFM zeigten eine frühere Angiogenese als unbesiedelte Matrices (135). Woloszyk et al. konnten nachweisen, dass SFM, die mit Stammzellen der humanen Pulpa oder humanen Gingivafibroblasten besiedelt waren, einen positiven und auch gleich starken Vaskularisationseffekt aufwiesen (136, 137). Unger et al. verwendeten eine Mischung aus Endothelzellen und Osteoblasten, um die SFM vor der Implantation zu vaskularisieren. Nach der Implantation der prävaskularisierten Matrices bildeten sich Anastomosen zwischen den *in vitro* präformierten Mikrokapillaren und dem Wirtsgefäßsystem, so dass eine schnelle Vaskularisation der implantierten Matrix erreicht werden konnte (138). Trotz einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen mit Seidenfibroin mangelt es bisher an klinischen Studien, die das Potenzial dieses Biomaterials in seinen verschiedenen Indikationen belegen.

2.2 Tissue Engineering und Biofunktionalisierung von Matrices

Tissue Engineering bezeichnet in der regenerativen Medizin die Kombination eines Trägermaterials mit Zellen oder bioaktiven Molekülen, die gemeinsam ein funktionelles Gewebe bilden. Ziel des *Tissue Engineering* ist es, mit diesen funktionellen Ersatzgeweben geschädigte Gewebe oder Organe zu regenerieren oder funktionell zu ersetzen. Dabei stellt vor allem die exakte Rekonstruktion der strukturellen Eigenschaften, der Barriere- und Transportfunktionen sowie der biochemischen und sekretorischen Funktionen des zu ersetzenden Gewebes die Wissenschaft vor große Herausforderungen (139). Durch Biofunktionalisierung können die biologischen Eigenschaften der Trägermaterialien indikationsspezifisch modifiziert und verbessert werden. Hierzu werden die Materialien mit Wachstumsfaktoren oder Zellen besiedelt, die über verschiedene Signalwege Einfluss auf das umliegende Gewebe nehmen und zelluläre Prozesse manipulieren können. Mittels Biofunktionalisierung von Matrices wird versucht, die für die Geweberegeneration wichtigen Materialeigenschaften durch das Einbringen bioaktiver Substanzen zu verbessern. Für den Erfolg von Weichgewebsaugmentationen sind vor allem die Vaskularisation und die immunologische Toleranz des Gewebeersatzmaterials von Bedeutung (93, 140, 141).

2.2.1 Biofunktionalisierung mit PRF

Zur Verbesserung der Angiogenese von Gewebeersatzmaterialien werden verschiedene Verfahren eingesetzt. Neben der Prävaskularisation von Trägermaterialien *in vitro* und *in vivo* (142) stellt die Verwendung von plättchenreichem Fibrin (PRF) eine vielversprechende Möglichkeit zur Beschleunigung der Vaskularisation dar. PRF ist ein autologes Thrombozytenkonzentrat, das durch Zentrifugation aus venösem Vollblut gewonnen wird. Die fibrinreiche Matrix enthält Thrombozyten, Leukozyten und Wachstumsfaktoren, die für die Angiogenese und Neovaskularisation entscheidend sind (143, 144).

PRF wurde 2001 von Choukroun et al. entwickelt (145) und seitdem zur Regeneration von Weich- und Hartgewebe eingesetzt (146). Das Material wird durch Zentrifugation aus venösem Vollblut gewonnen und dabei in drei Fraktionen getrennt, wobei die untere Fraktion aus Erythrozyten, die mittlere Fraktion aus einem Fibringerinnsel und die obere Fraktion aus Plasma besteht (147). Bei der Herstellung von PRF werden nur die beiden letztgenannten Fraktionen verwendet. Das Fibringerinnsel kann als PRF-Clot durch ein Pressverfahren auch zu PRF-Plugs oder PRF-Matrices verarbeitet werden, was ein breiteres Anwendungsspektrum ermöglicht (147).

Seit der Erstbeschreibung wurden zahlreiche weitere Generationen von Thrombozytenkonzentraten mit unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten entwickelt. Im Vergleich zu anderen autologen Blutkonzentraten wie dem plättchenreichen Plasma (PRP),

werden die Wachstumsfaktoren in PRF durch das Fibringerüst zurückgehalten und erst allmählich freigesetzt (148). Zunächst wurde durch Reduktion der Zentrifugationsdauer und der Umdrehungszahl das *Advanced PRF* (A-PRF+) entwickelt, welches sich durch ein stark vernetztes Fibringerinnel mit hohem Wachstumsfaktoranteil auszeichnet. Eine weitere Reduzierung der Zentrifugationskraft und die Verwendung von Kunststoffvakuetten anstelle von Glasvakuetten ermöglichten die Herstellung des flüssigen injizierbaren PRF (i-PRF) (149). Ghanaati et al. entwickelten das so genannte *low speed centrifugation concept*, mit dem sie die Anzahl der Wachstumsfaktoren, Leukozyten und Thrombozyten in i-PRF steigern konnten (149, 150).

Aufgrund seiner proangiogenen und proliferationsfördernden Eigenschaften besitzt PRF ein breites klinisches Anwendungsspektrum (144, 150-152). In der dentalen Implantologie findet es sowohl in der regenerativen Versorgung von Extraktionsalveolen als auch in augmentativen Verfahren Anwendung (153). Je nach Indikation kann das Thrombozytenkonzentrat entweder allein oder in Kombination mit Knochenersatzmaterialien oder Matrices eingesetzt werden. Insbesondere bei der Weichgeweberegeneration zeigt PRF gute Ergebnisse. Es scheint die Heilung des Weichgewebes zu verbessern (154) und zu beschleunigen (143). In der S3-Leitlinie der DGI zu dem Einsatz von PRF in der Implantologie wurde eine evidenzbasierte Empfehlung für die Verwendung solider PRF-Plug-Matrices bei offen abheilenden Alveolen ausgesprochen. Dabei wurde auf mehrere Studien verwiesen, die eine Verbesserung des Alveolenverschlusses in Bezug auf die Weichgeweberegeneration und Epithelialisierung zeigten (143, 153-155). In einigen dieser Studien wurde auch eine Abnahme des postoperativen Schmerzerlebens bei der Anwendung von PRF beobachtet (154, 155). Eine signifikante Verbesserung ließ sich jedoch nicht in allen Studien nachweisen, sodass in der Leitlinie diesbezüglich keine evidenzbasierte Empfehlung ausgesprochen wurde (153, 156, 157). Untersuchungen zu dem autologen Thrombozytenkonzentrat wurden auch in Bezug auf die Behandlung parodontaler Knochendefekte und die Deckung von Rezessionen durchgeführt (153, 156). Obwohl der Nutzen von PRF-Matrices in der Weichgeweberegeneration als gesichert gilt, können sie nach derzeitigem Stand der Forschung bei der Rezessionsdeckung nicht als gleichwertige Alternative zu Bindegewebstransplantaten oder CM angesehen werden (1, 158).

Unter Nutzung des CAM-Assays wurde eine Förderung der Neovaskularisation durch die Anwendung von PRF-Matrices (159, 160) und von mit PRF biofunktionalisierten Knochenersatzmaterialien beobachtet (161). Die Untersuchung verschiedener porciner CM ergab, dass die Mucoderm®-CM in Kombination mit dem Thrombozytenkonzentrat ein vergleichsweise hohes angiogenes Potenzial aufweist (55, 162). Kyyak et al. beobachteten für die Kombination von i-PRF mit Knochenersatzmaterialien *in vitro* ebenfalls einen proliferationsfördernden Effekt (163). Für die Kombination von Seidenfibroin mit PRF mangelt

es bisher an Studien. Luo et al. konnten jedoch in ihrer Studie mittels CAM-Assay zeigen, dass Matrices, die mit dem in PRF enthaltenen Wachstumsfaktor VEGF transfiziert wurden, eine beschleunigte Neovaskularisation aufweisen (133).

2.2.2 Biofunktionalisierung mit Schmelz-Matrix-Proteinen

Schmelz-Matrix-Proteine (SMP) sind bioaktive Eiweiße, die an der Bildung des Zahnhalteapparats während der Zahnentwicklung beteiligt sind. Aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der Entwicklung von zahnstützendem Gewebe werden sie in der regenerativen Parodontalchirurgie verwendet. Die Bildung von SMP erfolgt in den Ameloblasten des Zahnkeims und in den Präameloblasten der Hertwig-Epithelscheide während der Zahnentwicklung (164, 165). Daher haben therapeutisch eingesetzte Schmelz-Matrix-Derivate meist einen tierischen Ursprung. So wird das in vielen Studien untersuchte kommerzielle SMP-Derivat Emdogain® aus porcinen Zahnkeimen gewonnen (166). Nach Angaben des Herstellers besteht das Gel aus Schmelz-Matrix-Proteinen, überwiegend Amelogenin und Ameloblastin, die in Wasser und der Trägersubstanz Propylenglykollalginat gelöst vorliegen (167).

Bereits 1989 erkannten Hammarström et. al. den Nutzen von SMP in der Zahnheilkunde (168, 169) und konnten anhand von Tierversuchen nachweisen, dass SMP die für die parodontale Regeneration wichtige Bildung von azellulärem Zement, Desmodont und Knochen fördern (170). Die Proteine wirken sich auf die Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Komponenten der extrazellulären Matrix aus und können die Epithelialisierung der Wunde beschleunigen (171-173). Sowohl *in vitro* als auch in Tierversuchen konnte bei der Anwendung von SMP eine beschleunigte Neovaskularisation beobachtet werden (174, 175). Aspriello et al. gelang der klinische Nachweis einer erhöhten VEGF-Expression 48 Stunden nach der Applikation von SMP auf die Wurzeloberfläche (176). Im Gegensatz dazu wurden proinflammatorische Gene durch die Applikation der Substanz bei Kaninchen herunterreguliert (177). Weitere Tierversuche zeigten eine verbesserte Wundheilung der Mundschleimhaut durch die Stimulation der Produktion von Kollagenfasern und Blutgefäßen in dem umliegenden Bindegewebe (166, 178).

Klinisch wird das SMP-Derivat Emdogain® neben der Regeneration von durch Parodontitis geschädigten Zähnen auch für die Deckung von Furkationsdefekten verwendet (171, 179, 180). In der S3-Leitlinie „*Treatment of Stage I-III Periodontitis*“ der *European Federation of Periodontology* wird eine evidenzbasierte Empfehlung für die Verwendung von Schmelz-Matrix-Proteinen in bestimmten Indikationen der regenerativen Parodontalchirurgie ausgesprochen (181, 182). Zusätzlich weist die deutsche Leitlinie auf die geringere postoperative Schwellung im Vergleich zu der Verwendung nicht resorbierbarer Matrices hin (182). Ob lediglich SMP oder diese nach dem Prinzip der GBR in Kombination mit Matrices genutzt werden, hängt von der Ausdehnung des zu therapierenden Defektes ab (183). SMP

stellen durch ihre Fähigkeit zur Regeneration des parodontalen Gewebes (171) eine Ergänzung zu der herkömmlichen Parodontitistherapie dar und können in der dritten Therapiestufe eingesetzt werden (182).

Unter Nutzung des CAM-Assays beobachteten Kauvar et al. eine Stimulation der Angiogenese durch SMP (184). Die Vaskularisation auf der CAM war dabei stärker als in der negativen Kontrollgruppe und vergleichbar mit der Anwendung einer Mischung aus FGF (*fibroblast growth factor*) und VEGF. Bei der klinischen Applikation des SMP-Derivats während der Implantation konnte eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen im periimplantären Weichgewebe festgestellt werden (185). Hierzu wurde das Gel unmittelbar nach der Implantation und noch vor der Repositionierung des Lappens auf die Abdeckschraube und das periimplantäre Gewebe aufgetragen. Kashefimehr et al. wendeten SMP nach dem mechanischen Debridement bei der Parodontitistherapie subgingival an und verglichen die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe ohne die Applikation. Dabei konnten sie durch Abnahme der Sondierungstiefe und des *Bleeding-on-Probing-Index* (BOP-Index) einen positiven Effekt auf die Wundheilung feststellen (186, 187). Weitere klinische Studien bestätigten eine verbesserte Wundheilung und eine Reduktion der Taschentiefe durch den Einsatz von Emdogain® in der Parodontitistherapie (188, 189).

Auch die Kombination von SMP mit Ersatzmaterialien wurde bereits untersucht. *In vitro* zeigten Park et al. an mit SMP biofunktionalisierten CM eine erhöhte Proliferation von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (190). Yuan et al. beobachteten an mit SMP rehydrierten Matrices behandelten Mäusen eine höhere Anzahl an Blutgefäßen in der direkten Umgebung des Materials als in der Kontrollgruppe, die nur mit der Trägersubstanz Propylenglykolalginat rehydriert wurde (191). Die CM wurden jedoch nicht von den Blutgefäßen infiltriert und es zeigte sich eine bandförmige Ansammlung von Entzündungszellen um die mit SMP behandelten Matrices. Der zuvor klinisch beobachtete positive Effekt auf die Wundheilung (188) ließ sich mit SMP rehydrierten Matrices bislang nicht eindeutig bestätigen. Vokurka et al. beobachteten bei mit der Substanz rehydrierten CM *in vivo* eine langsamere Angiogenese und keine Verbesserung der Weichgeweberegeneration im Vergleich zu unbehandelten Matrices (40). Auch Sangiorgio et al. kamen in ihrer klinischen Studie zur Rezessionsdeckung zu dem Ergebnis, dass die kombinierte Anwendung von CM, Emdogain® und einem Verschiebelappen keine signifikante Verbesserung gegenüber der Variante ohne SMP zeigte (39).

2.3 Untersuchung der Neovaskularisation im Chorion-Allantois-Membran-Assay

Bei dem CAM-Assay handelt es sich um eine an bebrüteten Vogeleiern durchgeführte Versuchsmethode, anhand derer die Angiogenese und Neovaskularisation von

Fremdmaterialien untersucht werden können (54). Das Assay wurde 1974 durch Folkmann et al. adaptiert und wird seitdem auch in der onkologischen Forschung und dem *Tissue Engineering* eingesetzt (192). Die extraembryonale Membran entsteht durch Verschmelzung der mesodermalen Schichten der Fruchthüllen Allantois und Chorion an den Eientwicklungstagen (EDD) 4 und 5 (135, 193). Erste Blutgefäße beginnen sich bereits 42 Stunden nach Inkubationsbeginn zu entwickeln, doch erst zwischen EDD 8 und 10 ist der zentrale Teil der CAM vollständig ausgebildet (193). Ab EDD 10 nimmt die Konzentration der Wachstumsfaktoren ab und aus den bereits gebildeten Gefäßen sprießen Kapillaren (193).

Das CAM-Assay ermöglicht die Beobachtung der Neovaskularisation von Gewebeersatzmaterialien während des gesamten Versuchsablaufs. Die Neovaskularisation lässt sich dabei in die Prozesse Vaskulogenese und Angiogenese unterteilen (135). Vaskulogenese beschreibt die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in ischämische Regionen, wo sie durch Sekretion proangiogener Wachstumsfaktoren zu der Neovaskularisation beitragen (194). Als Angiogenese wird das Aussprossen von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen bezeichnet (195). Sie beginnt mit der Vasodilatation und der Degradation der Basalmembran bereits vorhandener Gefäße. Anschließend proliferieren die Endothelzellen und migrieren von den bestehenden Blutgefäßen weg (135, 195). Das Zusammenspiel der Proliferation von Endothelzellen mit inflammatorischen und hypoxischen Reaktionen im Wundbereich erzeugt proangiogene Faktoren, die eine aktive Proliferation und Migration von Endothelzellen in dieses Gebiet fördern (135). Auf diese Weise können neue Blutgefäße entstehen. Sowohl die Vaskulogenese als auch die Angiogenese stellen wichtige Voraussetzungen für die suffiziente Integration von Gewebeersatzmaterialien dar.

In der Literatur existieren verschiedene Modifikationen und Adaptationen des CAM-Modells. Eine dieser Modifikationen stellt das *ex ovo* CAM-Assay dar, bei dem die Embryonen im Gegensatz zu dem *in ovo* CAM-Assay ohne Eischale und üblicherweise in Petrischalen inkubiert werden (133, 196, 197). Der Versuchsablauf eines *in ovo* CAM-Assays variiert bis zu der Fensterung der Eischale an EDD 3 nur geringfügig, meist in der eingestellten Inkubationstemperatur und Luftfeuchtigkeit (55, 198). In der internationalen Literatur existiert jedoch eine große Variationsbreite im Hinblick auf den Zeitpunkt der Materialauflage und die Inkubationszeit (199, 200). Nowak-Sliwinska et al. erstellten 2018 eine Richtlinie für die Interpretation von Angiogenese-Assays und legten darin EDD 7 als einen geeigneten Zeitpunkt für die Platzierung der Matrices auf der CAM fest (196). In diesem Stadium ist das Immunsystem des Embryos noch nicht vollständig entwickelt und die Bedingungen für die Angiogenese sind günstig.

3 Material und Methoden

Tabelle 1: Chemikalien, Kits und Primer.

Produkt	Hersteller
Eindeckmedium Eukitt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, USA
Paraffin ROTI®Plast	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, USA
RT²SYBR® Green Mastermix	Qiagen, USA
Schmelz-Matrix-Derivat Emdogain®	Straumann, Basel, Schweiz
Primer cVEGF, cHIF-1α, cMMP-13, cNOS	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

Tabelle 2: Lösungen und Puffer.

Produkt	Hersteller	Zusammensetzung
Beta Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	≥ 99,0 % ≤ 1 % Aqua dest
Eosin 1 %	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	1 % Eosin G < 0,1 % Essigsäure < 0,1 % Natriumacid 99 % Aqua dest
Ethanol 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,5 % Ethanol 0,5 % Aqua dest
Ethanol 50 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	50 % Ethanol (≥ 99,5 %) 50 % Aqua dest
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	70 % Ethanol (≥ 99,5 %) 30 % Aqua dest
Ethanol 96 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	96 % Ethanol (≥ 99,5 %) 4 % Aqua dest
Formaldehyd 4 %	VWR, Leuven, Belgien	4 % Formaldehyd 0,5-1,5 % Ethanol 95 % Aqua dest
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	50 g Kalialaun 50 g Choralhydrat 1 g Hämatoxylin

			1 g Citronensäure
			0,2 g Natriumjodat
			1000 ml Aqua dest
isotone Lösung	Kochsalz-	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	0,9 % NaCl 99,1 % Aqua dest
RDD Puffer		RNase-free DNase Set; Qiagen N.V., Hilden, Deutschland	Firmengeheimnis
Xylol-Ersatzmedium ROTI®Histol		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	97 % Orangenterpene Rest: Firmengeheimnis

Tabelle 3: Geräte.

Produkt	Hersteller
Analysewaage ABT 120-5DM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Brutmaschine Typ 3000	Siepmann GmbH, Herdecke, Deutschland
Gewebeentwässerungs- und Einbettautomat Tissue-Tek VIP 5 Jr.	Sakura, Tokyo, Japan
Heißwasserbad	Witegro Laborbedarf, Altenhain, Deutschland
<i>in-vivo</i> Fluoreszenzmikroskop Olympus BXFM	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Tokyo, Japan
Mikrotom Leica RM 2165	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
PCR Workstation Pro	peqlab, Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage Kern PCB 250-3	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop One	Thermo Scientific™ NanoDrop™ One; USA
Thermocycler CFX Connect™	Bio-Rad, Singapur
Thermocycler peqSTAR 96X universal	peqlab, Erlangen, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Büchenbach, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge PRF Duo quattro	Mectron, Köln, Deutschland
Zentrifuge SpeedMill Plus	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Zentrifuge Thermo Scientific™ Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
8er-PCR-Strips 0,2 ml mit separatem gewölbten Deckelstreifen	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Collection Tube 2ml	Qiagen, Hilden, Deutschland
Einbettkassette	LABORTECHNIK GmbH, Nürmbrecht-Elsenroth, Deutschland
Einbettschwamm Tissue embedding sponge	Deltalab, Barcelona, Spanien
Filterpapier Tissue-TEK II	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, Deutschland
Fixierpflaster Leukopor	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Hard-Shell PCR Plates 96-well	Bio-Rad Laboratories, Frankreich
innusPEED Lysis Tubes E	IST Innuscreen GmbH, Berlin, Deutschland
Kanüle Microlance™ 3 21G x 11/2" – Nr.2 0,8 x 40mm	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Kimtech Präzisionstücher	Kimberly-Clark Global Sales, Roswell, USA
Kryo-Gefäß	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Küvette	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Microseal® `B` seal	Bio-Rad Laboratories, Großbritannien
Polypropylen-Teströhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1.5mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safety Blood Collection Set + Holder	greiner bio-one; Kremsmünster, Österreich
Shredderäule QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Skalpell No. 21	Feather safety razor Co., Ltd., Osaka, Japan
S-PRF Vakuumröhrchen 10ml	Pro Cell PRF™ by choukroun, Italien
Spritze Discardit™ II	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Tesafilm	Tesa SE, Norderstedt, Deutschland
Verschlussfolie Parafilm	Bemis™, USA

Tabelle 5: Software.

Produkt	Hersteller
cellSens Dimension	Olympus, Tokio, Japan
EndNote, Version 20.5	Alfasoft GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Excel, Version 2311	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPadPrism, Version 6	GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA
ImageJ	National Institutes of Health; Bethesda; Maryland, USA
Thermo Scientific™ Acclaro™ Sample Intelligence software	Thermo Scientific™ NanoDrop™ One; USA

Tabelle 6: Versuchstiere und Matrices.

Produkt	Hersteller
Kollagenmatrix Mucoderm®	botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland
Seidenfibroinmatrix, Silk Fibroin Non-woven	Fibrothelium GmbH, Aachen, Deutschland
White Leghorn LSL Hühnereier	LSL, Rhein-Main GmbH, Dieburg, Deutschland

3.1.1 Chorion-Allantois-Membrane-Assay

Für die Versuche wurden befruchtete White Leghorn Hühnereier der Firma LSL verwendet. Diese wurden mit autoklaviertem, destilliertem Wasser und Präzisionsreinigungstüchern von sichtbaren Verunreinigungen befreit, fortlaufend nummeriert und anschließend horizontal liegend bei 37,5 °C und einer 50-prozentigen relativen Luftfeuchtigkeit in den Brutkästen bebrütet. Um die Luftfeuchtigkeit konstant zu halten, befanden sich in den gewählten Brutkästen integrierbare Wasserbehälter mit destilliertem, autoklaviertem Wasser. Während der ersten drei Tage (Eientwicklungstag (EDD) 1–3) der Bebrütung lagerten die Eier horizontal, sodass sich die enthaltene Luftblase nach oben verlagern konnte und bei dem Eröffnen der Eischale keine vitalen Strukturen verletzt wurden.

Im Rahmen des in Abbildung 2 dargestellten Versuchsablaufs erfolgte an EDD 3 das Eröffnen der Eischale. Dazu wurden zunächst 5–6 ml Eiweiß an dem stumpfen Pol des Eis mit Hilfe einer Spritze und einer BD Microlance Kanüle Nr. 2 entnommen. Dies führte dazu, dass sich das Eiklar absenkt und im oberen Bereich ein luftgefüllter Hohlraum unterhalb der Eischale

entstand. Die Punktionsstelle wurde sorgfältig mit transparentem Klebeband verschlossen, um das Austreten weiterer Flüssigkeit zu verhindern. Um die Eischale zu stabilisieren und bei Eröffnen dieser das Herabfallen von Schalenteilen zu verhindern, wurde die nach oben gerichtete Seite der Eischale mit einem Fixierpflaster abgeklebt. Mit einer sterilen Schere wurde anschließend eine circa 2 x 3 cm große Öffnung in die Eischale geschnitten. Diese wurde anschließend sorgfältig mit einer transparenten Verschlussfolie abgedeckt, um das Kontaminationsrisiko und den Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung zu minimieren. Die Identifizierung und Entsorgung der unbefruchteten Eier, erkennbar an der ausbleibenden Entwicklung eines Embryos, der von spinnennetzartigen Gefäßen umgeben ist, erfolgte ebenfalls in dieser Phase des Versuchs.

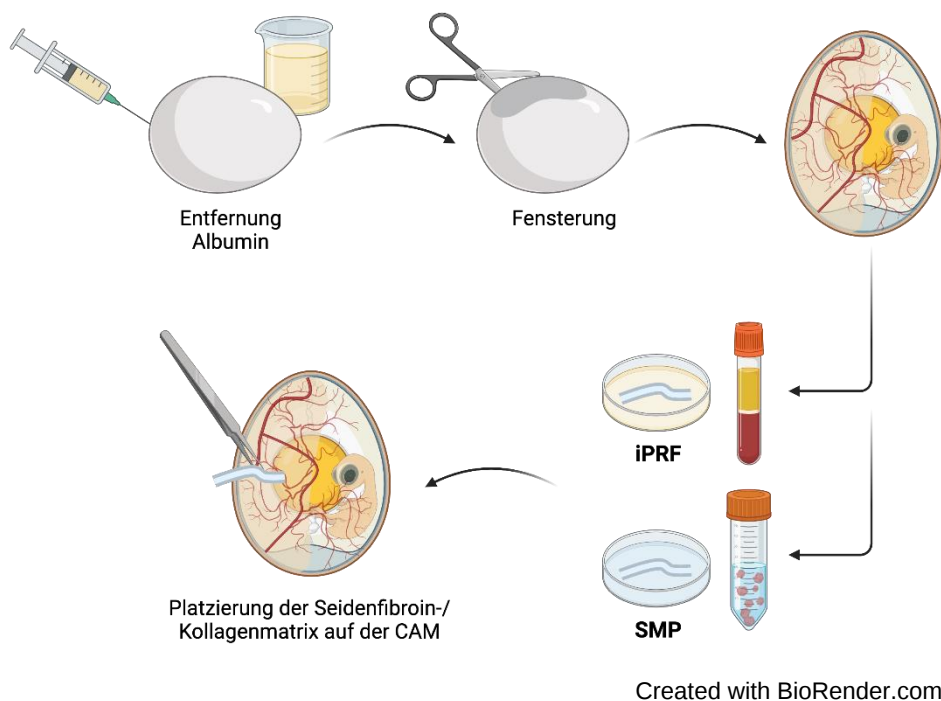


Abbildung 2: Ablauf CAM-Assay.

Die Entnahme einiger Milliliter Albumin führte zu einem Absinken des Eiklars und ermöglichte die Fensterung der Eischale an EDD 3. Nachdem die Matrices mit i-PRF und SMP biofunktionalisiert waren, wurden sie an EDD 7 auf der CAM platziert. Abkürzungen: CAM = Chorion-Allantois-Membran, EDD = egg development day, i-PRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Protein

An EDD 6 erfolgte die Erweiterung des ovalen Fensters auf eine Größe von 3 x 5 cm. Zu diesem Zeitpunkt begann die Chorion-Allantois-Membran (CAM) sich zu entfalten, sodass durch das vergrößerte Sichtfenster das Auflegen der Matrices (CM und SFM) an dem folgenden Tag möglich war. Die Matrices wurden an EDD 6 nach 20-minütiger Sterilisation unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell auf 0,5 x 0,5 cm zugeschnitten und in einer mit Verschlussfolie versiegelten Petrischale über Nacht gelagert. An EDD 7 wurden die zugeschnittenen Matrices für 10 Minuten in jeweils 400 µl der ihrer Versuchsgruppe zugeordneten Substanz rehydriert. Die hierzu benötigten Substanzen NaCl, i-PRF und

Emdogain® wurden nach den in Abschnitt 0 beschriebenen Verfahren vorbereitet. Eine Übersicht über die einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 7 dargestellt. Um zu verhindern, dass die Matrices ohne direkten Kontakt zur CAM auf einem Flüssigkeitsfilm zu liegen kamen, wurden beide Seiten der Matrix nach dem Rehydrieren für 10 Sekunden auf sterilem Filterpapier abgelegt. So konnte die überschüssige Flüssigkeit aus den rehydrierten Matrices aufgenommen und ein direkter Kontakt mit der CAM sichergestellt werden. Anschließend wurden die Eier nacheinander aus dem Brutkasten entnommen und die Matrices auf der CAM platziert. Dabei galt es, darauf zu achten, dass die Matrices wie in Abbildung 3 gezeigt, auf der konkaven Seite des Embryos auf der durchsichtigen und reich vaskularisierten CAM zu liegen kamen. Nach erneutem Verschließen der Eiöffnung mit Verschlussfolie konnten die Eier wieder in den Brutschrank zurückgelegt werden.

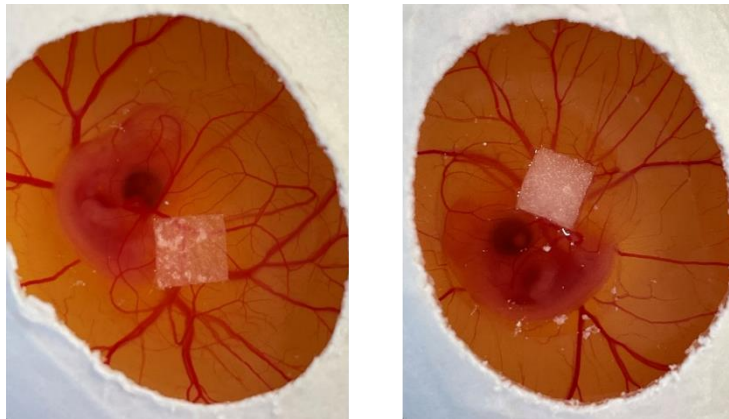


Abbildung 3: Auflage einer Seidenfibroin- (links) und einer Kollagenmatrix (rechts)

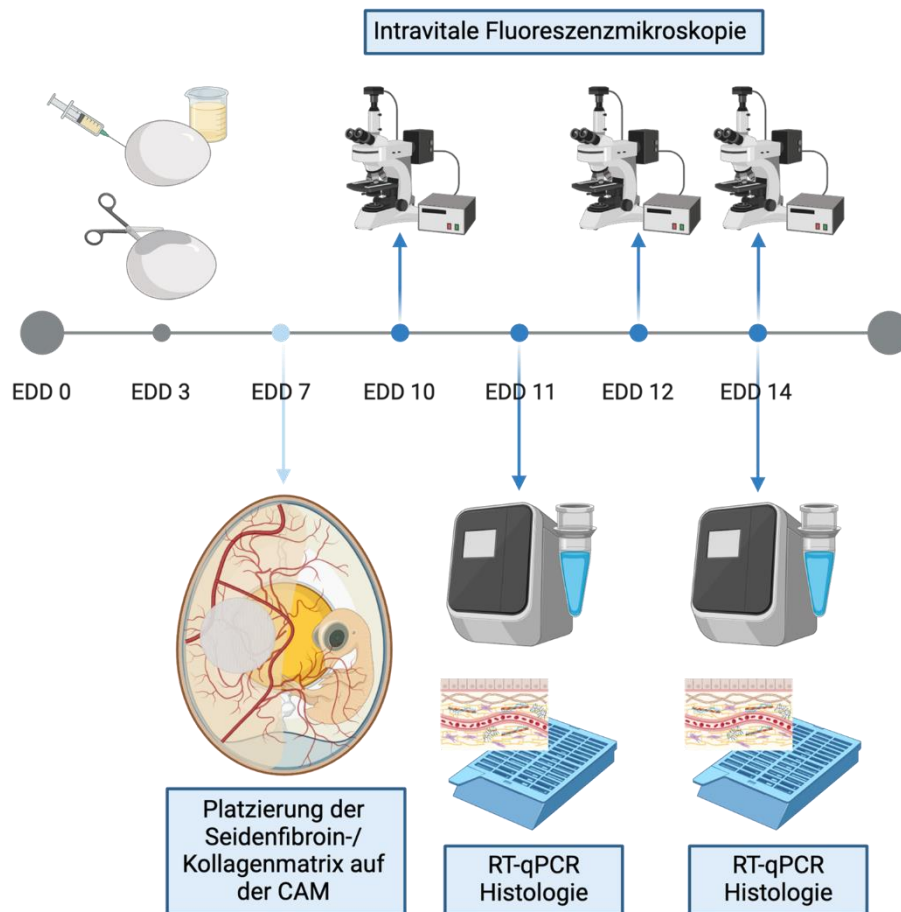
Drei, fünf und sieben Tage nach der Auflage der Matrices auf die CAM (EDD 10, 12 und 14) konnten mit Hilfe der *in-vivo* Fluoreszenzmikroskopie Bilder der Matrices einschließlich der sie umgebenden CAM nach dem in Abschnitt 3.1.4 beschriebenen Verfahren angefertigt werden (Abbildung 4).

An EDD 11 und 14 wurden für die qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) je Ei zwei RNA-Proben aus dem Randbereich der Matrix entnommen. Dies geschah mit sterilen Instrumenten an den jeweils gegenüberliegenden Ecken der Matrix aus der CAM. Die Proben wurden anschließend in zwei separate Kryoröhrchen überführt. Um sicherzustellen, dass die Probenmasse die für die qPCR festgelegte Maximalmasse von 30 mg nicht überschritt, wurde diese mit einer Präzisionswaage bestimmt. Alle Proben mussten unmittelbar nach dem Abwiegen in den Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur RNA-Extraktion bei -80 °C in einem Gefrierschrank gelagert werden.

Im Anschluss an die Entnahme der RNA-Proben an EDD 11 und 14 wurde die gesamte Matrix inklusive eines 3 mm breiten Randes aus der CAM für die histologische Untersuchung mit einer sterilen Schere entnommen. Dies stellte die nachvollziehbare Orientierung des

Präparates im weiteren Verlauf der Aufbereitung sicher. Die entnommene Matrix mit der umgebenden CAM wurde anschließend in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Petrischale überführt. Die Probe musste im Folgenden mit einer Pinzette möglichst faltenfrei auf ein vorgefertigtes Filterpapier aufgezogen werden. Dieses wurde so gefaltet, dass die Matrix von oben und unten mit Filterpapier bedeckt war. Nachdem die Matrix auf einen Einbetttschwamm überführt und in eine Einbettkassette gelegt wurde, konnte sie in wässriger Formalinlösung mit 4 % Formaldehyd fixiert werden. Nach der Probenentnahme erfolgte die Dekapitation des Embryos.

Die Entnahme der RNA- und histologischen Proben erfolgte an EDD 11 bei einem Drittel der Eier und anschließend an EDD 14 bei den restlichen Eiern eines Versuchsdurchgangs. Die Auswahl der an EDD 11 zu entnehmenden Eier erfolgte randomisiert.



Created with BioRender.com

Abbildung 4: Versuchsablauf in schematischer Übersicht.

Nach der Eröffnung der Eischale an EDD 3 und der Platzierung der Matrices auf der CAM (EDD 7) erfolgte die Analyse der Neovaskularisation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie an den EDD 10, 11 und 12. Proben für die molekulargenetische Untersuchung mittels RT-qPCR und die histologische Färbung wurden an EDD 11 und 14 entnommen. Abkürzungen: EDD = egg development day, CAM = Chorion-Allantois-Membran, RT-qPCR = reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Tabelle 7: Übersicht über die Versuchsgruppen.

Versuchsgruppe	Matrixtyp	Material zur Biofunktionalisierung	Entnahmezeitpunkt
I	CM	NaCl	EDD 11 & 14
II		i-PRF	
III		SMP	
IV	SFM	NaCl	EDD 11 & 14
V		i-PRF	
VI		SMP	

Abkürzungen: CM = Kollagenmatrix, SFM = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, i-PRF = *injectable platelet rich fibrin*, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, EDD = *egg development day*

3.1.2 Matrices

Für die vorliegende Arbeit wurde zum einen die kommerziell erhältliche CM Mucoderm® und zum anderen eine unlösliche SFM (105) verwendet. Beide Matrices wurden unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell auf eine Größe von 0,5 cm x 0,5 cm zugeschnitten.

Die in diesem Projekt verwendete SFM wurde mit Hilfe der PureSilk® Technologie (Fibrothelium gmbH, Aachen, Deutschland) hergestellt. Das Entbasten der Seide fand in einer heißen alkalischen Lösung statt. In einem zweiten Schritt wurde das gereinigte Seidenfibroin in einem schonenden Löseverfahren auf Basis von Ajisawas-Reagenz, bestehend aus Calciumchlorid, Wasser und Ethanol, gelöst, wobei auf den Einsatz toxischer Chemikalien verzichtet wurde. Im Anschluss wurde das gelöste Fibroin für acht Stunden gegen vollentsalztes Wasser dialysiert. Die so gewonnene Fibroinlösung diente in einer Konzentration von drei Gewichtsprozent der Herstellung elektrogesponnener nichtgewebter SFM. Das Elektrosponnen erfolgte mit Hilfe einer Spinndüse und einem Trommelsammler bei einer Spannung von 25–30 kV und einer Geschwindigkeit von 100 rpm.

Um das durchschnittliche Gewicht der beiden Matrixtypen zu bestimmen, wurden jeweils fünf Matrices pro Material mit einer Analysewaage gewogen. Anschließend wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) ermittelt. Die zugeschnittenen CM zeigten mit $10,62 \text{ mg} \pm 0,08 \text{ mg}$ ein deutlich höheres Gewicht als die SFM ($1,35 \text{ mg} \pm 0,08 \text{ mg}$). Nach der Rehydrierung der Matrices in jeweils 400 μl isotoner Kochsalzlösung für 10 Minuten und der anschließenden Auflage auf Filterpapier für 10 Sekunden, wurden sie erneut gewogen. Das durchschnittliche, durch die Matrices aufgenommene Volumen der CM betrug $19,64 \mu\text{l} \pm 5,91 \mu\text{l}$, das der SFM $0,74 \mu\text{l} \pm 0,44 \mu\text{l}$.

3.1.3 Materialien zur Biofunktionalisierung

Die Biofunktionalisierung der SFM und CM erfolgte durch Rehydrierung mit i-PRF und SMP. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und der Gewinnung der beiden zu untersuchenden Substanzen ist in Abbildung 5 dargestellt.

3.1.3.1 i-PRF

Zunächst erfolgte die venöse Blutentnahme bei einem gesunden Probanden mit der Butterfly-Kanüle des Safety Blood Collection Sets. Das Vollblut wurde in sterilen S-PRF Vakuumröhrchen (10 ml) aufgefangen und anschließend für 7 min bei 12 x 100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde mit der PRF Duo Zentrifuge durchgeführt. Für die Biofunktionalisierung musste das i-PRF mit einer Spritze und Kanüle aspiriert und zunächst in einer Petrischale gesammelt werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Kanüle auf keinen Fall mit der erythrozytenreichen Schicht in der unteren Phase des Röhrchens in Kontakt kam, so dass nur das Plasma einschließlich der leukozyten- und plättchenreichen Schicht in die Petrischale gelangte. Mit einer sterilen Kanüle konnte das i-PRF aus der Petrischale entnommen und auf die Matrices aufgetragen werden.

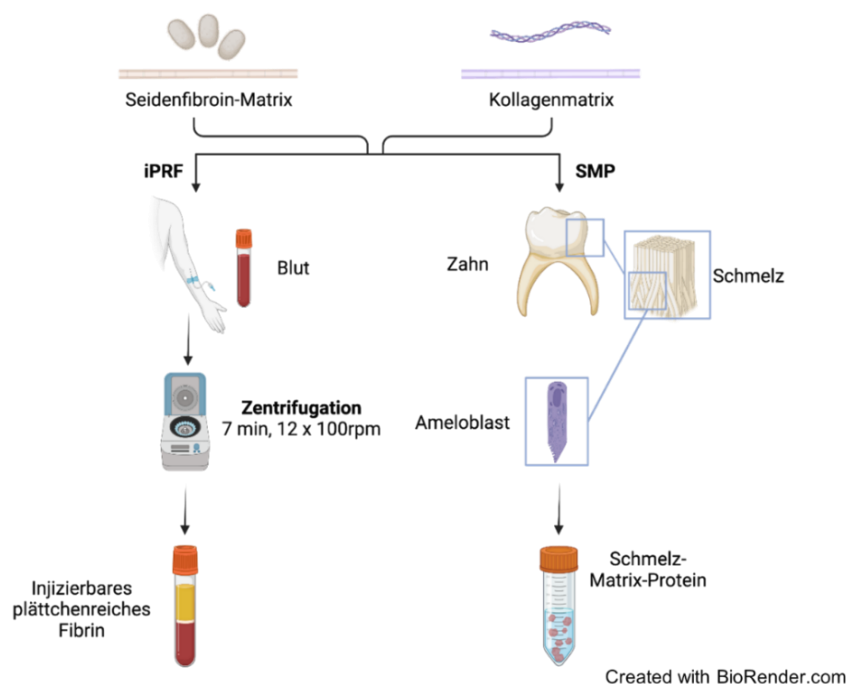


Abbildung 5: Versuchsaufbau der Biofunktionalisierung mit i-PRF und SMP.

Für die Herstellung von i-PRF wurde patienteneigenes Blut verwendet und durch Zentrifugation aufbereitet. Das sich in der obersten Phase befindliche Fibrin kam bei der Biofunktionalisierung der Matrices zum Einsatz. Das von Ameloblasten im Zahnkeim produzierte SMP wurde als kommerzielles Material für diesen Versuch erworben. Die gebrauchsfertige Masse kam in verdünnter Form auf den Seidenfibroin- und Kollagenmatrices zum Einsatz. Abkürzungen: i-PRF = injizierbares plättchenreiches Fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Protein

3.1.3.2 Schmelz Matrix Derivate

Das kommerziell erhältliche Gel Emdogain® enthält Schmelz-Matrix-Proteine. Vor der Anwendung musste die 0,7 ml Stammlösung mit einer Gelkonzentration von 30 mg/ml unter

sterilen Bedingungen mit isotoner Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt werden. Die so hergestellte Lösung konnte anschließend in 50 ml Polypropylen-Teströhrchen aliquotiert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

3.1.3.3 Natriumchlorid

Als Kontrollgruppe wurden beide Matrixtypen mit 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung rehydriert.

3.1.4 *In-vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an EDD 10, EDD 12 und EDD 14 mit dem *in-vivo* Fluoreszenzmikroskop bei 50-facher Vergrößerung. Für die Auswertung der Aufnahmen wurde die Software cellSens Dimension genutzt und die Daten im VSI-Format gespeichert. Anschließend wurden die Rohdaten in das Programm Excel überführt, in dem die weitere Berechnung stattfand.

An den drei Untersuchungszeitpunkten wurden jeweils eine Übersichtsaufnahme und zwei Detailaufnahmen von zwei gegenüberliegenden Matrixecken erstellt (Abbildung 6). Hierzu wurden die Eier so ausgerichtet, dass die Eibeschriftung bei dem Mikroskopieren zum Betrachter zeigte und die Aufnahmen von der am weitesten rechts und der am weitesten links liegenden Matrixecke angefertigt wurden. Die Übersichtsaufnahme setzte sich aus mehreren Einzelaufnahmen zusammen, die mit Hilfe der Software zu einem Multi-Image-Array zusammengefügt werden konnten. Anhand der Übersichtsaufnahme ließ sich die vaskularisierte Fläche A_v der Matrix mittels der unten aufgeführten Formel berechnen.

Berechnung der vaskularisierten Fläche:

$$A_1 - A_2 = A_v$$

Hierzu wurde in dem Programm eine Umrandung um die äußere Grenze der Matrix und um die innere Grenze der eingewachsenen Gefäße zur restlichen Matrixfläche gezeichnet. Die Software berechnete automatisch die eingeschlossenen Flächen und durch Subtraktion der äußeren (A_1) von der inneren Fläche (A_2) ergab sich die vaskularisierte Fläche (A_v). Um den prozentualen Anteil der vaskularisierten Fläche ($\%_{vas}$) an der Gesamtmatrixfläche zu berechnen, wurde die vaskularisierte Fläche durch die Gesamtfläche der Matrix (A_2) dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert.

Berechnung prozentualer Anteil der vaskularisierten Fläche:

$$\%_{vas} = \frac{A_v}{A_2} * 100$$

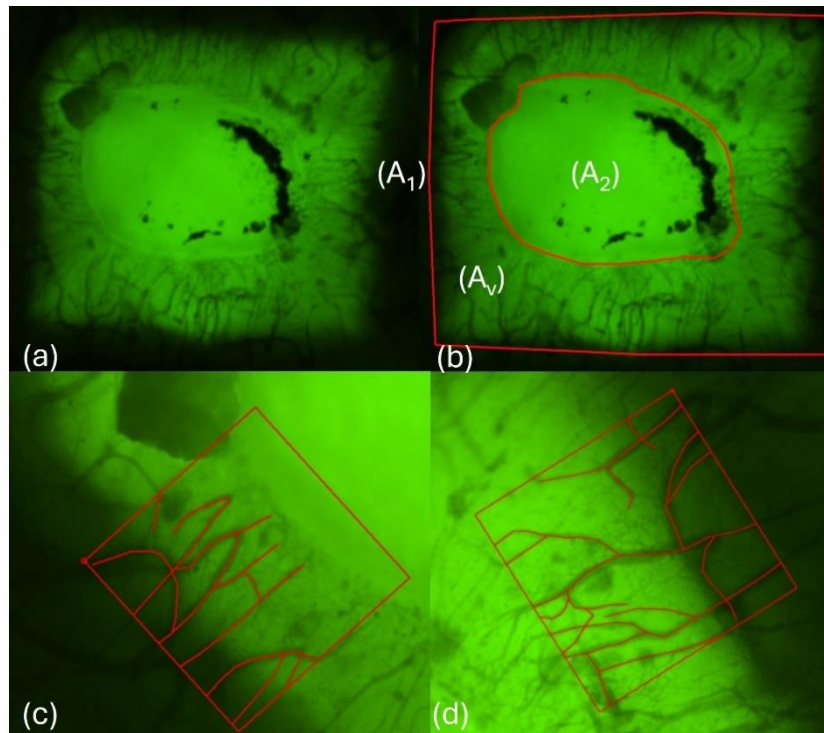


Abbildung 6: Exemplarische Bilder der Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie.

(a) Auf dem Multi-Image-Array der Kollagenmatrix sind aus den Randbereichen einwachsende kleine Gefäße zu erkennen. (b) Für die Berechnung der vaskularisierten Matrixfläche (A_v) wurde die nicht vaskularisierte Matrixfläche (A_2) von der Gesamtfläche der Matrix (A_1) subtrahiert. Die Gefäßdichte und die Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten wurde auf jeder Matrix in zwei regions of interest (ROI) gemessen, die sich jeweils in der linken (c) und rechten (d) Ecke der Matrix befanden.

Für die Gefäßverzweigungsanalyse wurden mit dem *in-vivo* Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen von zwei definierten Untersuchungsregionen (region of interest = ROI), der rechten und linken Ecke der Matrix, erstellt. Diese Detailaufnahmen dienten der Bestimmung der Gefäßdichte und der Anzahl an Gefäßverzweigungsstellen. Mit Hilfe der Software gelang das Projizieren eines Gitters mit den Maßen $1000 \times 1000 \mu\text{m}$ auf die beiden Ecken. Die Gefäße in der ROI konnten anschließend markiert und ihre Länge (VL) automatisch bestimmt werden. Durch Addition der einzelnen Gefäßlängen wurde die Gesamtgefäßlänge (VL_{ges}) berechnet.

Berechnung der Gesamtgefäßlänge:

$$VL_{ges} (\mu\text{m}) = VL_1 + VL_2 + VL_3 + \dots + VL_x$$

Die anschließende Division der Gesamtgefäßlänge durch die Gesamtfläche der auszuwertenden Fläche von $1.000.000 \mu\text{m}^2$ ergab die Gefäßdichte (VD) in der jeweiligen ROI. Letztlich wurden die berechneten Gefäßdichten der linken und der rechten ROI addiert und durch zwei dividiert, um die mittlere Gefäßdichte der beiden ROIs (VD_{av}) zu erhalten.

Berechnung Gefäßdichte:

$$VD \left(\frac{\mu m}{\mu m^2} \right) = \frac{VL_{ges}}{1.000.000 \mu m^2}$$

$$VD_{av} \left(\frac{\mu m}{\mu m^2} \right) = \frac{VD_1 + VD_2}{2}$$

Die Analyse der Gefäßverzweigungsstellen wurde ebenfalls mit den Aufnahmen der ROIs in der linken und rechten Ecke der Matrix durchgeführt. Hierzu wurden die Verzweigungsstellen (v_j) der bereits für die Gefäßdichteanalyse markierten Gefäße in der ROI händisch ausgewertet. Die Anzahl an Gefäßverzweigungsstellen in den beiden ROIs wurden addiert und durch die Anzahl der ROIs dividiert, sodass die durchschnittliche Anzahl von Gefäßverzweigungen in der ROI (VJ) berechnet werden konnte.

Berechnung Gefäßverzweigungsstellen:

$$VJ = \frac{vj_1 + vj_2}{2}$$

Sämtliche Aufnahmen wurden von derselben Person ausgewertet, um Abweichungen durch unterschiedliche Betrachter zu vermeiden. Für die statistische Analyse wurden die Daten aus Excel in das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, Version 6.0.0) überführt.

3.1.5 RT-qPCR

3.1.5.1 Allgemeines

Die *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) wird auch als qPCR abgekürzt und ist eine Methode zur Quantifizierung der Genexpression in Echtzeit. Sie ermöglicht die Bestimmung der tatsächlichen Menge des in einem bestimmten Zyklus vorhandenen PCR-Produkts. Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der hochspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und sich bei jeder Amplifikation proportional zur Menge des produzierten PCR-Produkts anreichert. Nach jedem Zyklus lässt sich die Fluoreszenz messen und eine Amplifikationskurve erstellen. Durch die Schmelzkurvenanalyse nach dem letzten Zyklus kann das Schmelzverhalten der amplifizierten Gensequenz bestimmt werden. In diesem Experiment wurden RNA-Proben entnommen, welche zunächst in cDNA umgewandelt werden mussten, bevor sie in der qPCR auf die proangiogenetischen Faktoren VEGF, HIF-1 α und Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13) sowie den Entzündungsfaktor Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (NOS2) untersucht werden konnten. Die Gensequenzen der einzelnen Primer sind in Tabelle 20 aufgeführt.

3.1.5.2 Vorbereitung der RNA und photometrische Konzentrationsbestimmung

Das RNeasy® Mini Kit wurde für die Isolierung von RNA aus den Proben von EDD 11 und EDD 14 verwendet. Wesentlich für die Arbeit mit RNA war eine schnelle und kontrollierte Handhabung der Proben, um Kontaminationen durch in der Umgebung befindliche RNasen zu minimieren. Zur sorgfältigen Vorbereitung der Extraktionsschritte gehörte auch das Ansetzen des verwendeten RLT-2-Mercaptoethanol-Puffers. Dieser bestand aus 10 ml RLT-Puffer aus dem RNeasy® Mini Kit und 100 µl 2-Mercaptoethanol. Um einen möglichst kontaminationsfreien Transfer der Proben in die Lysis Tubes zu ermöglichen, wurden die aus dem Gefrierschrank entnommenen Proben zunächst in flüssigem Stickstoff erneut eingefroren. Vor dem Überführen des Gewebes in die Lysis Tubes mussten jeweils 350 µl des zuvor hergestellten RLT-2-Mercaptoethanol-Puffers in die Lysis Tubes pipettiert werden. Nach der Homogenisierung des Gewebes in der SpeedMill für 20 Sekunden konnte das zerkleinerte Gewebe auf Shreddersäulen in 1,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben und erneut bei 13.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert werden. Anschließend wurde die Shreddersäule verworfen und das Filtrat bei 14.800 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Bei der Überführung in ein autoklaviertes 2 ml Collection Tube (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde darauf geachtet, dass ein leichter Überschuss im Eppendorfgefäß verbleibt. In das Lysat mussten 350 µl 70-prozentiges Ethanol pipettiert und vorsichtig gemischt werden. Daraufhin wurden 700 µl des Lysat-Ethanol-Gemisches auf die in einem Collection Tube befindliche RNA-Säule überführt und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte der Austausch des mit Eluat gefüllten Collection Tubes gegen ein neues autoklaviertes Collection Tube. Nachdem weitere 350 µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurden, konnte das Eluat verworfen und ein neues Collection Tube verwendet werden. Die Herstellung des DNase-Gemisches in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß erfolgte mit dem RNase free DNase Set durch Pipettieren und vorsichtiges Mischen von 10 µl DNase Stock Solution und 70 µl RDD-Puffer je Probe. Nach dem Transfer von 78 µl des DNase-Gemisches auf jede Säule folgte eine 15-minütige Einwirkzeit bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und diese für fünf Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran mussten je 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert werden. Nachfolgend konnten erneut 500 µl RPE-Puffer auf die in einem neuen Collection Tube befindliche Säule gegeben und für zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert werden. Nach dem Transfer auf ein neues Collection Tube wurde die Säule für eine Minute lang bei 14.800 rpm zentrifugiert. Als vorletzter Schritt folgte das Pipettieren von 40 µl RNase freiem Wasser auf die RNA-Säule, die in einem autoklavierten und mit der Probennummer beschrifteten 1,5 ml Eppendorfgefäß stand. Mit dem Eluat, das sich nach 1 min Zentrifugation bei 10.000 rpm in dem

Eppendorfgefäß befand, konnte die photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden.

Dazu wurde das NanoDrop-Spektralphotometer auf den RNA-Modus eingestellt und die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, die dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren entspricht. Mit Hilfe des NanoDrop konnte neben der RNA-Konzentration auch die Reinheit der RNA-Proben bestimmt werden. Hierzu lieferte das Gerät zwei Reinheitswerte. Mit dem A260/A280-Wert konnte die Proteinkontamination gemessen werden. Der zweite Reinheitswert (A260/A230) war ein Indikator für Verunreinigungen durch organische Verbindungen oder chaotrope Substanzen. Nur Proben mit einem ersten Reinheitswert (A260/A280) von mindestens 2 und einem zweiten Reinheitswert von mindestens 1,5 wurden in die weitere Auswertung der RNA einbezogen. RNA-Proben, die Verunreinigungen durch Proteine, Phenol, Guanidin-HCl oder Guanidiniumisothiocyanat aufwiesen, konnten durch die im NanoDrop integrierte Software erkannt werden. Dies verhinderte, dass stark kontaminierte Proben für die weiteren Experimente verwendet wurden.

Zu Beginn erfolgte die Messung des Leerwerts. Dazu wurde die Messstelle mit einem fussselfreien Kimtech-Tuch gereinigt und 1,5 µl RNase-freies Wasser auf die Messstelle aufgetragen. Nach erneuter Reinigung der Messstelle mit dem fussselfreien Tuch erfolgte die Pipettierung von 1,5 µl der RNA-Probe auf die Messstelle. Bevor die nächste Probe aufgetragen werden konnte, musste die Messstelle gereinigt werden. Abschließend wurde die RNA bei -80 °C eingefroren und erst zur Transkription in cDNA wieder aufgetaut.

3.1.5.3 Umschreibung der RNA in cDNA

Die Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA). Die hierfür und für die nachfolgende qPCR benötigten Materialien wurden vor der Verwendung für 20 Minuten unter einer UV-Lampe sterilisiert. Die zu transkribierenden RNA-Proben und der 5xiScript-Puffer tauten währenddessen auf Eis auf. Von jeder RNA-Probe wurden 500 ng in cDNA transkribiert.

Die Berechnung der dafür benötigten RNA-Menge erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\text{benötigte Menge RNA (ng)} = \frac{\text{umzuschreibende RNA – Menge(ng)}}{\text{Gesamtmenge RNA(ng)} * V1(\mu\text{l})}$$

$V1$ = Volumen, in dem RNA gelöst vorliegt

$$\text{benötigte Menge RNase freies Wasser } (\mu\text{l}) = 15 \mu\text{l} - \text{benötigte Menge RNA(ng)}$$

Anschließend wurde die entnommene Menge RNA in sterile 0,2 ml PCR-Strips pipettiert und mit RNase freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden je Well 5 µl des

Mastermixansatzes, bestehend aus 4 µl 5xiScript und 1 µl des Enzyms Reverse Transkriptase, gegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend in dem Thermocycler peqSTAR. Die einzelnen Reaktionsschritte können der Tabelle 19 entnommen werden. Die Verdünnung auf eine cDNA-Konzentration von 5 ng/µl erfolgte für alle Proben nach der Entnahme aus dem Thermocycler mit 80 µl RNase freiem Wasser gemäß der folgenden Formel. Abschließend wurden die Proben bei -20 °C in einem Gefrierschrank gelagert.

$$\frac{500 \text{ ng}}{15 \mu\text{l} \left(\frac{\text{RNA}}{\text{Wasser}} - \text{Gemisch} \right) + 5 \mu\text{l Mastermix} + 80 \mu\text{l RNase freies Wasser}} = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

3.1.5.4 Durchführung der RT-qPCR

Um Angiogenese und Inflammation eindeutig nachzuweisen, wurden in diesem Experiment die proangiogenetischen Faktoren VEGF, HIF-1α und MMP-13 sowie der Entzündungsfaktor NOS2 untersucht. Der Vergleich der Referenzgene Beta-Actin, GAPDH, HPRT, C18, H6PD und RPL4 ermöglichte die Auswahl eines zuverlässigen Housekeeping-Gens für dieses Experiment. Aus einer Stichprobe von 12 Proben, bestehend aus je einer Probe pro Versuchsgruppe und Entnahmetag, wurde das Referenzgen ausgewählt, das in allen Gruppen eindeutig nachweisbar war und eine möglichst geringe Streuung der Ct-Werte aufwies. Es zeigte sich, dass RPL4 die zuverlässigsten Ergebnisse für diesen Versuch lieferte und daher als Housekeeping-Gen festgelegt wurde. Vor Beginn der qPCR wurden die Primer für VEGF, HIF-1α, MMP-13 und NOS2 mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 pmol/µl verdünnt, der Primer für das Housekeeping-Gen RPL4 jedoch nicht. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der qPCR korrekt und vergleichbar sind, lief bei jeder qPCR eine externe Kontrollprobe mit. Diese Kontrollprobe wurde zuvor aus 8 unbehandelten RNA-Proben gemischt, von denen je vier Proben von EDD 11 und vier von EDD 14 stammten. Die RNA-Proben entstammten einer parallelisierten Kontrollgruppe. Die RNA-Konzentration der externen Kontrolle konnte mit dem NanoDrop-Spektralphotometer ermittelt werden. Anschließend wurde die externe Kontrolle in Eppendorfgefäße aliquotiert, sodass sich in jedem Gefäß 8 µg RNA befanden. Die Umschreibung der externen Kontrolle in cDNA erfolgte wie in Abschnitt 3.1.5.3 beschrieben. Nach der Verdünnung mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl wurden jeweils 6 µl cDNA in PCR-Strips aliquotiert und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Das Protokoll des RT² qPCR Primer Assay Handbooks diente als Vorlage für die in diesem Versuch durchgeführte qPCR. Für die Gene RPL4 und VEGF wurde der Thermocycler nach dem in Tabelle 21 dargestellten Protokoll programmiert. Die qPCR-Tests für Gene HIF-1α, NOS2 und MMP-13 sind in Tabelle 22 aufgeführt. Die Vorbereitung der Proben für die qPCR fand an einem separaten PCR-Arbeitsplatz unter sterilen Bedingungen statt. Zunächst wurden der RT²SYBR®Green Mastermix und die Primer für den Sense- sowie den Antisense-Strang

für 10 Sekunden zentrifugiert. Unter Verwendung des RT²SYBR®Green Mastermix konnte der PCR-Komponenten-Mix angesetzt werden. Dazu mussten je Well 12,5 µl des RT²SYBR®Green Mastermix mit 10,5 µl RNase freiem Wasser in ein 5 ml Eppendorf Tube pipettiert werden. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml des Primers für den Sense- und den Antisense-Strang des zu untersuchenden Gens zu dem Mix pipettiert.

Um verlässliche Ergebnisse zu generieren, erhielten jeweils drei benachbarte Wells die gleiche cDNA-Probe. Der Mittelwert der drei Ct-Werte war die Grundlage für die späteren Berechnungen der relativen Expression der Gene. In jedes Well der sterilen 96-Well-Platte wurden 24 µl des PCR-Komponenten-Mix und 1 µl der cDNA-Probe gegeben. Die Platte wurde daraufhin mit Microseal versiegelt und für eine Minute bei 1.000 rpm in der Megafuge zentrifugiert um Luftblasen zu eliminieren. Anschließend lief die qPCR nach den in Tabelle 21 und Tabelle 22 dargestellten Protokollen ab.

3.1.5.5 Auswertung der qPCR

Die Software Bio-Rad CFX Manager 3.1 ermöglichte die Auswertung der Ergebnisse der qPCR. Während der Amplifikation der DNA band der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green an die sich vervielfältigenden DNA-Moleküle und interkalierte in die DNA. Das Fluoreszenzsignal war somit direkt proportional zu der DNA-Konzentration in der Probe. Nach jedem Zyklus wurde dieses Signal gemessen und in der Einheit *relative fluorescence units* (RFU) angegeben. Die Software berechnete anschließend den *threshold cycle value* (Ct-Wert). Dieser Wert gab an, wie viele PCR-Zyklen notwendig waren, um ein definiertes Fluoreszenzniveau, den *threshold*, zu erreichen. In der graphischen Darstellung der Amplifikation (Abbildung 7) entsprach der Ct-Wert dem Schnittpunkt der Schwellenwertlinie (*threshold*) mit der Amplifikationskurve. Der *threshold* wurde für jedes Zielgen individuell angepasst und sollte sich in einem linearen Abschnitt im unteren Drittel des Amplifikationsdiagramms befinden. Für das Referenzgen RPL4 und VEGF betrug er 1500, für HIF-1α 200, für NOS2 70 und für MMP-13 200. Trotz des sequenzspezifischen Farbstoffs tritt bei Experimenten unter Nutzung der qPCR eine gewisse Hintergrundfluoreszenz auf. Für die Berechnung des Ct-Werts wurde daher neben dem *threshold* ein weiterer Wert, die Baseline, benötigt. Unterhalb der von der Software automatisch berechneten Baseline gemessene Fluoreszenzsignale wurden als Hintergrundfluoreszenz betrachtet und aus der Wertung herausgenommen. Der letztlich von der Software ausgegeben Ct-Wert ergab sich aus der Differenz zwischen dem gemessenen Fluoreszenzsignal und der Baseline.

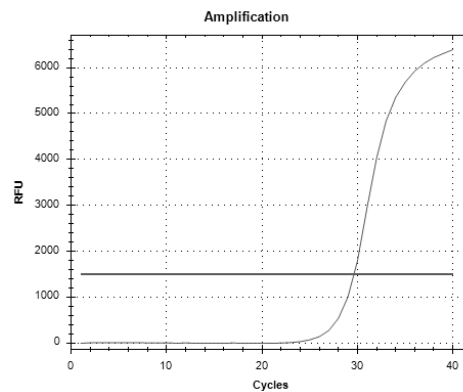


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung der Amplifikationskurve.

Der Ct-Wert liegt in diesem Beispiel bei 29,5 an dem graphischen Schnittpunkt des threshold (1500 RFU) mit der Amplifikationskurve.

Mit Hilfe der im letzten Schritt der qPCR ablaufenden Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der qPCR bestimmt werden. Durch stufenweises Erhitzen der PCR-Produkte von 50 °C auf 90 °C und die parallel dazu ablaufende Messung des Fluoreszenzsignals konnte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA zeitlich bestimmt werden. Bei dem Zerfall in Einzelstränge dissoziierte der Farbstoff und ein Abfall des Fluoreszenzsignals konnte detektiert werden. Wie in Abbildung 8 (a) zu sehen ist, nahm das Fluoreszenzsignal bis zu dem Erreichen der Schmelztemperatur konstant ab. An dem Punkt der Schmelztemperatur fiel der RFU-Wert stark ab und die Steigung der sigmoidalen Kurve veränderte sich. Die Software konnte diese Veränderung graphisch darstellen, indem sie wie in Abbildung 8 (b) dargestellt die negative Änderungsrate der Schmelzkurve als Funktion der Temperatur auftrug.

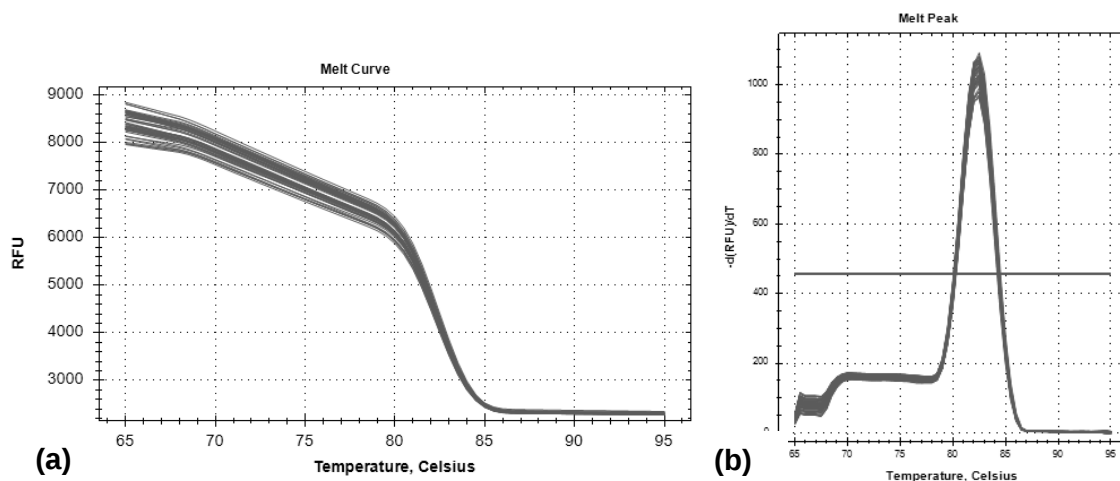


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Schmelzkurve und deren Änderungsrate.

- (a) Darstellung der Schmelzkurve: Das Fluoreszenzsignal (RFU) wird gegen die Temperatur (T) (°C) aufgetragen.
- (b) Darstellung der Änderungsrate der Schmelzkurve ($-d(RFU)/dT$) nach der Temperatur (°C).

An dem Maximum der Schmelzkurve war die DNA zur Hälfte denaturiert. Da bei dem gleichen Primer auch das gleiche Amplikon vervielfältigt wurde, war davon auszugehen, dass die PCR-Produkte bei derselben Temperatur schmolzen und die Schmelzkurve im Optimalfall nur ein Maximum aufwies. Traten mehrere Maxima auf, konnte dies auf eine unspezifische Vervielfältigung hinweisen. Daher wurden weder die Proben bei denen mehrere oder keine Maxima festgestellt wurden, noch die Proben deren Maxima stark von der für den Primer zu erwartenden spezifischen Schmelztemperatur abwichen, in der weiteren Auswertung berücksichtigt.

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Programm: Excel, Microsoft®, Version 2311). Neben den bereits bei der Schmelzkurvenanalyse als Ausreißer detektierten Proben, wurden auch Proben deren Ct-Mittelwert ≥ 35 lagen nicht in die Statistik aufgenommen. Bei der Bestimmung der relativen Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens in Relation zu der Expression eines nicht regulierten Housekeeping-Gens gesetzt. In diesem Versuch wurde die relative Veränderung der Genexpression zwischen der experimentellen Probe und der externen Kontrolle normalisiert zu dem Housekeeping-Gen RPL4 bestimmt. Hierzu musste zunächst für jede Probe der Mittelwert aus den gemessenen Ct-Werten der drei Wells ermittelt werden.

$$Ct_{Zielgen} = \frac{Ct_1 + Ct_2 + Ct_3}{3}$$

Für die Normalisierung der Expression des Zielgens auf die Expression des Housekeeping-Gens wurde der ΔCt -Wert bestimmt. Dieser Wert errechnete sich aus der Differenz des Ct-Mittelwerts des Referenzgens und des Zielgens über die dargestellte Formel.

$$\Delta Ct_{Zielgen} = Ct_{Zielgen} - Ct_{HKG}$$

Die Bestimmung des ΔCt -Werts erfolgte sowohl für die experimentellen Proben als auch für die externe Kontrolle. Da für die Ermittlung der Expression aller Proben mehrere qPCR-Tests nötig waren, wurde für die externe Kontrolle der durchschnittliche ΔCt -Wert, der für dieses Zielgen mitgelaufenen externen Kontrollen ermittelt. Der Vergleich zwischen der normalisierten Expression des Zielgens und der normalisierten und mittleren Expression der Kontrollgruppe wurde mit Hilfe der beschriebenen Formel berechnet.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Zielgen} - \emptyset \Delta Ct_{Kontrollgruppe}$$

Da die $\Delta\Delta Ct$ -Methode von einer 100-prozentigen Amplifikationseffizienz, also einer Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus ausgeht, wurde die relative Veränderung der Genexpression (Ratio) über die unten stehende Formel berechnet.

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dabei musste jedoch beachtet werden, dass die eigentliche Effizienz der qPCR meist in dem Bereich von 1,7 bis 1,9 liegt, sodass die Aussagekraft der mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelten Expressionsunterschiede begrenzt war (201).

3.1.6 Histologie

Um in die Matrix einwachsende Gefäße nachzuweisen, wurde die HE-Färbung durchgeführt. Anschließend konnten die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop bei 50-facher Vergrößerung eingelesen und ausgewertet werden.

3.1.6.1 Matrixentnahme

Die Entnahme der Matrices einschließlich der sie umgebenden CAM erfolgte an EDD 12 und EDD 14 unter scharfer Präparation mit Pinzette und Schere. Nach dem in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Entnahmeverfahren wurden die Proben nach ein bis vier Tagen aus dem 4-prozentigen Formaldehyd entnommen und mit dem Tissue-Tek Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Der Ablauf der Gewebeverarbeitung und -infiltration ist in Tabelle 24 dargestellt.

Mit dem Mikrotom wurden 4 μm dünne Schnitte längs zur okklusiven Seite der eingebetteten Matrix angefertigt. Die erhaltenen Schnitte wurden zunächst in ein Kältebad (Raumtemperatur), das aus einer mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette bestand, und anschließend in ein Warmwasserbad bei 48 °C überführt und möglichst faltenfrei auf den Objektträger gezogen. Nach 24-stündiger Lagerung in einem Wärmeschrank bei 38 °C konnten die Schnitte angefärbt werden.

3.1.6.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wurde nach dem aus Tabelle 8 zu entnehmenden Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte mit ROTI®Histol entparaffiniert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Auf die Färbung basophiler Strukturen mit Hämalaun folgte die Bläuung mit mineralhaltigem Mainzer Leitungswasser. Nach der Gegenfärbung mit Eosin, konnte der Schnitt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich in Xylol geklärt werden. Schließlich wurde das Deckglas auf eine dünne Schicht des Eindeckmediums Eukitt aufgelegt. Über Nacht härtete das Medium aus und an dem Folgetag konnte mit der lichtmikroskopischen Untersuchung begonnen werden.

3.1.6.3 Auswertung der histologischen Färbung

Mit dem Eclipse Lichtmikroskop wurden bei 50-facher Vergrößerung Aufnahmen der Schnitte erstellt. Mit Hilfe der Software ImageJ konnten mehrere Einzelaufnahmen zu einer Übersichtsaufnahme zusammengefügt werden und im Dateiformat JPEG und TIF gespeichert werden. Anschließend wurden die Präparate visuell auf das Vorhandensein von Gefäßen untersucht. Die histologische Färbung diente in erster Linie dazu, die unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtete Vaskularisation der Matrices zu bestätigen. Anhand der

Lage der detektierten Blutgefäße ließ sich auch feststellen, ob die Gefäße auf oder in der Matrix eingewachsen waren.

Tabelle 8: Protokoll zur HE-Färbung.

Schritt	Reagenz	Dauer (min:sek)
Entparaffinieren	ROTI®Histol	5:00
	ROTI®Histol	5:00
	ROTI®Histol	5:00
Rehydratisieren	100 % Ethanol	5:00
	100 % Ethanol	5:00
	96 % Ethanol	5:00
	70 % Ethanol	5:00
	50 % Ethanol	5:00
Ruhen	Aqua dest	20:00
Hämatoxylin-Kernfärbung	10 % Hämalaun	5:00
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	10:00
Eosin-Gegenfärbung	Eosin	1:30
Spülen	Aqua dest	0:10
Entwässern	70 % Ethanol	0:10
	96 % Ethanol	0:10
	100 % Ethanol	5:00
Klären	ROTI®Histol	10:00

3.1.7 Statistische Auswertung

Die deskriptive und explorative Datenanalyse sowie die Erstellung von Graphiken erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, Version 6.0.0). Dabei wurden der mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmte prozentuale Anteil der vaskularisierten Matrixfläche, die Gefäßdichte und die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte sowie die bei der qPCR gemessene relative Expression der Zielgene analysiert. Für jeden der genannten Parameter wurde zunächst der Mittelwert für die jeweilige Versuchsgruppe aus den Messwerten eines Versuchsdurchlaufs gebildet. Aus den Mittelwerten der fünf unabhängigen Versuchsdurchläufe wurde anschließend der finale Mittelwert gebildet, welcher in den Graphiken dargestellt wurde. Für die Bestimmung des Anteils vaskularisierter Matrices und der vaskularisierten Matrixfläche wurden sämtliche Matrices unabhängig von ihrer Vaskularisation in die Statistik einbezogen. Bei der Bestimmung der Gesamtgefäßdichte und

der Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten wurden hingegen ausschließlich Matrices berücksichtigt, die an EDD 14 Gefäße zeigten. Somit konnte unter den am letzten Versuchstag vaskularisierten Matrices ein genaueres Bild der Vaskularisation in der ROI gewonnen werden.

Für die genannten Parameter erfolgte zunächst eine deskriptive Analyse. Die Mittelwerte (M) $\pm$ Standardabweichung (SD) wurden in dem Text in Klammern hinter der jeweiligen Versuchsgruppe aufgeführt. Um sowohl die beiden Matrixarten als auch die verschiedenen Biofunktionalisierungen zu vergleichen erfolgte eine two-way ANOVA. Sofern die two-way ANOVA signifikante Ergebnisse lieferte, wurde die Bonferroni Korrektur angewandt. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus wurden mit Sternchen angegeben und auf $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) festgelegt.

Die Visualisierung der Graphiken erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Dabei wurden für die Darstellung der Ergebnisse Säulendiagramme verwendet. Die Säulendiagramme stellen die Mittelwerte der gemessenen Parameter dar und weisen Fehlerbalken auf, die der einfachen Standardabweichung entsprechen.

4 Ergebnisse

4.1 Fluoreszenzmikroskopie

4.1.1 Prozentualer Anteil vaskularisierter Matrices

In Abbildung 9 ist der prozentuale Anteil vaskularisierter Matrices an der Gesamtzahl der Matrices einer Versuchsgruppe dargestellt. Diese wurden als vaskularisiert gewertet, sobald Gefäße auf der Matrix mittels *in-vivo* Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnten. In die Auswertung wurden ausschließlich vaskularisierte Matrices einbezogen.

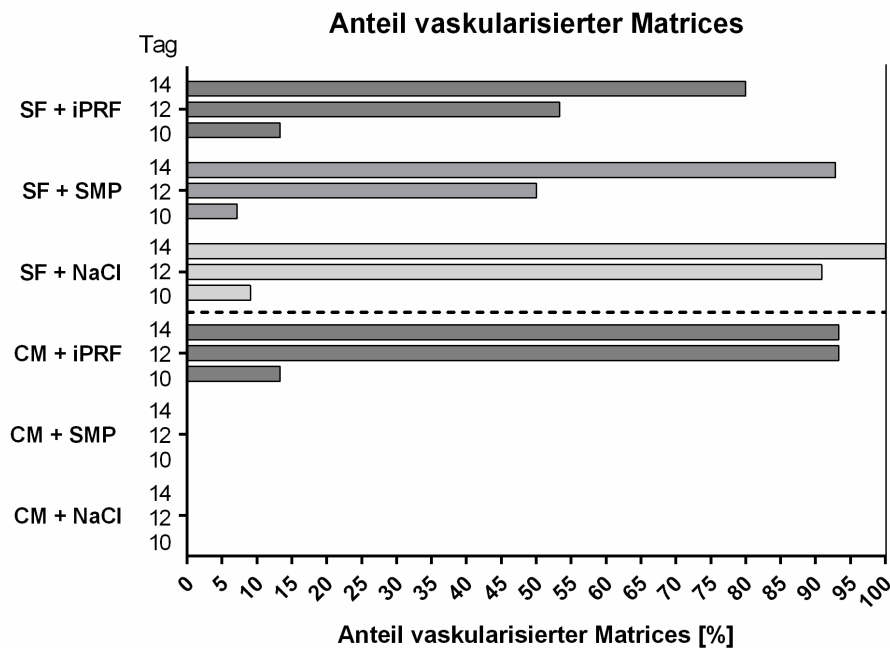


Abbildung 9: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 10, EDD 12 und EDD 14.

Der prozentuale Anteil vaskularisierter Matrices an der Gesamtanzahl der Matrices der Versuchsgruppen CM+NaCl ($n = 9$), CM+iPRF ($n = 15$), CM+SMP ($n = 17$), SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 15$) und SF+SMP ($n = 14$) wurde als Säulendiagramm dargestellt. In den SF-Gruppen und der CM+iPRF-Gruppe zeigte sich an EDD 14 ein hoher Anteil vaskularisierter Matrices. In den mit NaCl und SMP behandelten CM war keine Vaskularisation nachzuweisen. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl

An EDD 12 wies die SF-Kontrollgruppe eine Vaskularisationsrate von 91 Prozent auf. Im Gegensatz dazu konnten in der CM-Kontrollgruppe keine Gefäße auf der Matrix nachgewiesen werden. Die mit i-PRF biofunktionalisierte CM erfuhr eine besonders frühe Vaskularisation; an EDD 12 waren bereits 93 Prozent der Matrices vaskularisiert. In der SF+iPRF-Gruppe konnte zu diesem Zeitpunkt eine Vaskularisationsrate von 53 Prozent beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Behandlung mit SMP. Auch hier wurden auf der biologisierten CM keine Gefäße detektiert, wohingegen 50 Prozent der Matrices der SF+SMP-Gruppe vaskularisiert waren. Während bei den CM an EDD 12 lediglich in der CM+iPRF-Gruppe eine Vaskularisation nachgewiesen wurde, wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits mehr als 50 Prozent

der SFM Gefäße auf. Dabei zeigte die SF+NaCl-Gruppe den größten Anteil vaskularisierter Matrices vor der mit i-PRF und der mit SMP biofunktionalisierten Matrix.

Während an EDD 14 in der SF-Kontrollgruppe auf allen Matrices Gefäße nachgewiesen wurden, zeigte die CM-Kontrollgruppe weiterhin keine Vaskularisation. Die Biofunktionalisierung mit i-PRF resultierte bei beiden Matrices in einem ähnlich hohen Anteil vaskularisierter Matrices an dem letzten Versuchstag (CM+iPRF: 93 %; SF+iPRF: 80 %). Nach der Behandlung mit SMP zeigten sich hingegen erhebliche Unterschiede. So konnten in der SF+SMP-Gruppe an EDD 14 bei 93 Prozent der behandelten Matrices Gefäße detektiert werden, wohingegen in der CM+SMP-Gruppe keine Gefäße nachgewiesen werden konnte. Bei den CM wurde ausschließlich in der Gruppe der mit i-PRF biofunktionalisierten Matrices eine Vaskularisation festgestellt, während die SF-Kontrollgruppe den höchsten Wert, gefolgt von der SF+SMP- und der SF+iPRF-Gruppe aufwies.

Tabelle 9: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 10

Gruppe	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
Nicht vaskularisiert (n)	9	13	17	10	13	13
Vaskularisiert (n)	0	2	0	1	2	1
untersuchte Matrices (n)	9	15	17	11	15	14
vaskularisierter Anteil (%)	0	13,33	0	9,09	13,33	7,14

Tabelle 10: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 12

Gruppe	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
Nicht vaskularisiert (n)	9	1	17	1	7	7
Vaskularisiert (n)	0	14	0	10	8	7
untersuchte Matrices (n)	9	15	17	11	15	14
vaskularisierter Anteil (%)	0	93,33	0	90,9	53,33	50

Tabelle 11: Anteil vaskularisierter Matrices an EDD 14

Gruppe	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
Nicht vaskularisiert (n)	9	1	17	0	3	1
Vaskularisiert (n)	0	14	0	11	12	13
untersuchte Matrices (n)	9	15	17	11	15	14
vaskularisierter Anteil (%)	0	93,33	0	100	80	92,86

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.1.2 Bestimmung der vaskularisierten Matrixfläche

Die vaskularisierte Matrixfläche variierte zwischen den Versuchsgruppen je nach Biofunktionalisierung und Matrixtyp. Im Gegensatz zu der nicht vaskularisierten CM+NaCl-Gruppe, waren in der SF-Kontrollgruppe an EDD 12 10 Prozent der Matrixfläche mit Gefäßen bedeckt (Abbildung 10) (SF+NaCl: $9,94 \pm 7,00$ %). Die mit i-PRF behandelten Matrices beider Gruppen wiesen diesbezüglich nur geringe Unterschiede auf (CM+iPRF: $26,59 \pm 4,56$ %; SF+iPRF: $13,26 \pm 9,23$ %). Bei den CM führte die Biofunktionalisierung mit i-PRF an EDD 12 im Gegensatz zu den anderen beiden CM zu einer signifikant stärkeren Vaskularisation der Matrixfläche ($p < 0,01$). In der Gruppe der SFM konnten für die Biofunktionalisierung mit i-PRF ähnlich hohe Werte wie für die Biofunktionalisierung mit SMP und eine doppelt so große vaskularisierte Matrixfläche wie in der SF-Kontrollgruppe nachgewiesen werden (SF+SMP: $10,47 \pm 13,73$ %).

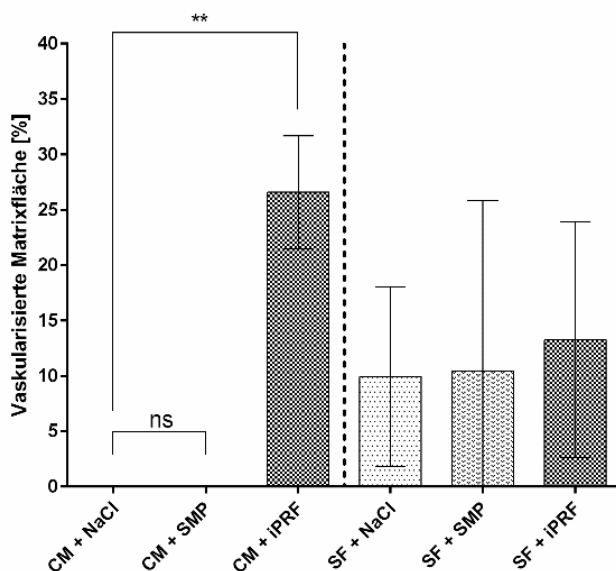


Abbildung 10: Vaskularisierte Matrixfläche an EDD 12.

Die Ergebnisse der vaskularisierten Matrixfläche an EDD 12 aus den Gruppen CM+NaCl ($n = 9$), CM+iPRF ($n = 15$), CM+SMP ($n = 17$), SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 15$) und SF+SMP ($n = 14$) wurden als Säulendiagramm dargestellt. Schwarze Sterne markierten voneinander signifikant unterschiedliche Ergebnisse (two-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur: $** p < 0,01$). Die CM+iPRF-Gruppe zeigte einen signifikant höheren Anteil der vaskularisierten Matrixfläche als die nicht vaskularisierte CM+NaCl- und CM+SMP-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den SFM waren gering. Auch zwischen den jeweils mit der gleichen Substanz rehydrierten CM und SFM konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl

Bis EDD 14 nahm die vaskularisierte Matrixfläche in den vier vaskularisierten Gruppen zu. An dem letzten Versuchstag betrug der Wert in der SF-Kontrollgruppe 36 Prozent, während in der CM-Kontrollgruppe weiterhin keine Gefäße zu beobachten waren (SF+NaCl: $35,98 \pm 27,05$ %). In der CM+iPRF-Gruppe wurde eine vaskularisierte Matrixfläche von 58 Prozent beobachtet, die damit signifikant höher als in der SF+iPRF-Gruppe ($p < 0,001$), der SF+NaCl ($p = 0,042$) und der SF+SMP-Gruppe ($p = 0,003$) war (CM+iPRF: $57,52 \pm 5,51$ %;

SF+iPRF: $21,87 \pm 18,13$ %) (Abbildung 11). Wie in dem Vergleich der Kontrollgruppen konnte auch bei den mit SMP biologisierten Matrices nur in der SF+SMP-Gruppe eine Vaskularisation auf den Matrices nachgewiesen werden (SF+SMP: $31,65 \pm 11,99$ %). Die Biofunktionalisierung der CM mit iPRF zeigte signifikant höhere Messwerte als bei der Rehydrierung mit NaCl und SMP ($p < 0,001$). Bei den SFM konnten keine wesentlichen Unterschiede durch die Biofunktionalisierung festgestellt werden.

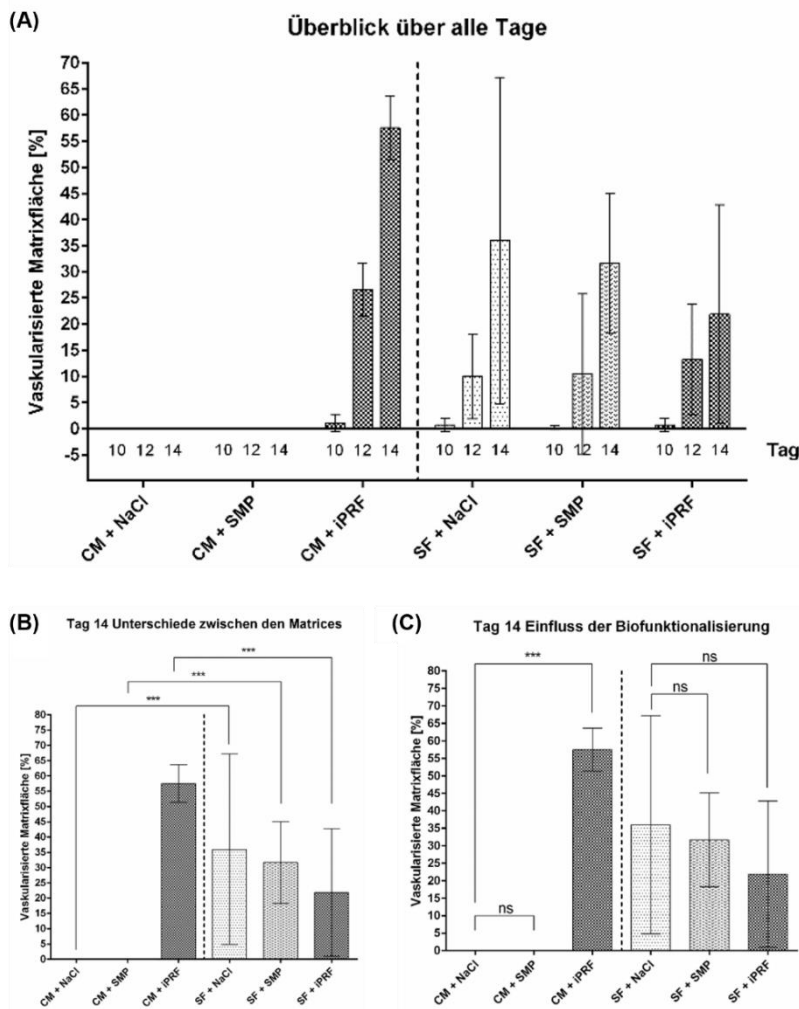


Abbildung 11 Vaskularisierte Matrixfläche an EDD 14.

(A) Vaskularisierte Matrixfläche an den Versuchstagen 10, 12 und 14. Der prozentuale Anteil der vaskularisierten Matrixfläche in den Gruppen CM+NaCl ($n = 9$), CM+iPRF ($n = 15$), CM+SMP ($n = 17$), SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 15$) und SF+SMP ($n = 14$) wurde als Säulendiagramm dargestellt. Er verdoppelte sich in den meisten Gruppen zwischen den Versuchstagen 12 und 14. (B) Vergleich zwischen den Matrixarten an Tag 14. Aufgrund der fehlenden Vaskularisation in den mit NaCl und SMP rehydrierten CM wiesen die entsprechend behandelten SFM eine signifikant größere vaskularisierte Matrixfläche auf. Die Biofunktionalisierung mit iPRF zeigte hingegen in den CM signifikant höhere Werte als in den SFM. (C) Vergleich zwischen den Arten der Biofunktionalisierung an Tag 14. Bei den CM führte eine Biofunktionalisierung mit iPRF zu einer signifikant höheren vaskularisierten Matrixfläche gegenüber den mit NaCl und SMP behandelten CM. Zwischen den SFM konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Schwarze Sterne markierten voneinander signifikant unterschiedliche Ergebnisse (two-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur: *** $p < 0,001$). Abkürzungen: EDD = egg development day; CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, ns= nicht signifikant

Tabelle 12: Messwerte Vaskularisierte Matrixfläche

Gruppe	n	EDD	Vaskularisierte Fläche (%)	
			M	SD
CM+NaCl	9	10	0	0
	9	12	0	0
	9	14	0	0
CM+iPRF	15	10	1,09	1,46
	15	12	26,59	4,56
	15	14	57,52	5,51
CM+SMP	17	10	0	0
	17	12	0	0
	17	14	0	0
SF+NaCl	11	10	0,65	1,13
	11	12	9,94	7,00
	11	14	35,98	27,05
SF+iPRF	15	10	0,68	1,10
	15	12	13,26	9,23
	15	14	21,87	18,13
SF+SMP	14	10	0,17	0,34
	14	12	10,47	13,73
	14	14	31,65	11,99

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.1.3 Bestimmung der Gefäßdichte

In Abbildung 12 ist die Gesamtgefäßdichte in $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ für die einzelnen Versuchsgruppen an EDD 12 dargestellt. Im Gegensatz zu der nicht vaskularisierten CM+NaCl-Gruppe wies die SF-Kontrollgruppe eine Gefäßdichte von $0,001122 \pm 0,00042 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ auf. Bei der Biofunktionalisierung mit i-PRF wurde eine geringfügig höhere Gefäßdichte bei SFM als bei CM nachgewiesen (CM+iPRF: $0,002247 \pm 0,00162 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$; SF+iPRF: $0,001614 \pm 0,00095 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$). In der Gruppe der mit SMP biofunktionalisierten Matrices zeigte die SFM einen Wert von $0,000570 \pm 0,00078 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$, während in der CM+SMP-Gruppe keine Gefäßverzweigungspunkte auf der Matrix nachgewiesen werden konnten. Die Biofunktionalisierung mit i-PRF bewirkte bei beiden Matrices eine Erhöhung der Gefäßdichte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den CM. Dennoch zeigten auch die mit SMP behandelten Matrices und die SF-Kontrollgruppe niedrigere Messwerte an EDD 12 als die SF+iPRF-Gruppe. An EDD 12 konnten zwischen sämtlichen vaskularisierten Matrices keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

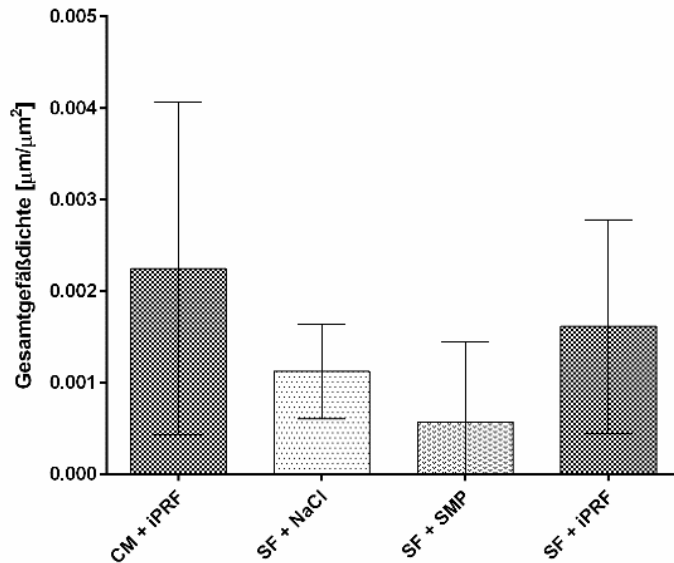


Abbildung 12: Gesamtgefäßdichte an EDD 12.

Die Ergebnisse der Gesamtgefäßdichte ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) an EDD 12 aus den Gruppen CM+iPRF ($n = 14$), SF+NaCl ($n = 10$), SF+iPRF ($n = 8$) und SF+SMP ($n = 7$) wurden als Säulendiagramm dargestellt. Die Messwerte in der mit NaCl oder SMP biofunktionalisierten SFM waren höher als in der entsprechenden CM. Tendenziell konnte in der SF+iPRF-Gruppe eine höhere Gefäßdichte nachgewiesen werden als in der CM+iPRF-Gruppe. Die Unterschiede zwischen sämtlichen Versuchsgruppen waren jedoch nicht signifikant. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl

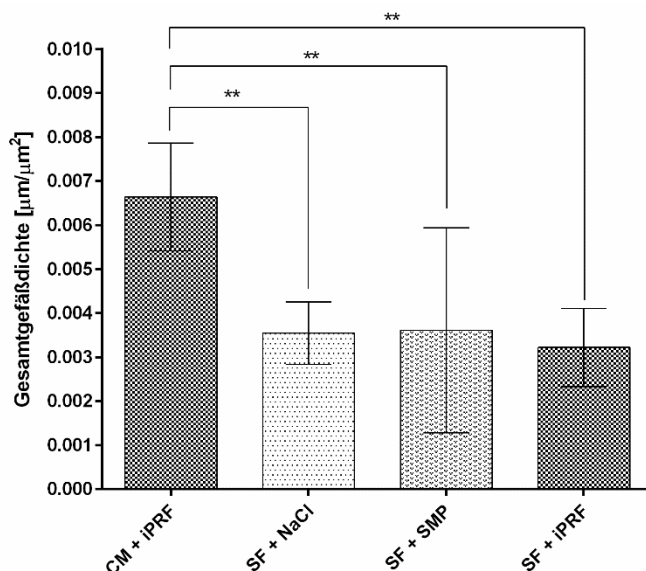


Abbildung 13: Gesamtgefäßdichte an EDD 14.

Die Ergebnisse der Gesamtgefäßdichte ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$) an EDD 14 aus den Gruppen CM+iPRF ($n = 14$), SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 12$) und SF+SMP ($n = 13$) wurden als Säulendiagramm dargestellt. Schwarze Sterne markierten voneinander signifikant unterschiedliche Ergebnisse (two-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur: $** p < 0,01$). Die CM+iPRF-Gruppe zeigte eine signifikant höhere Gefäßdichte im Vergleich zu allen SF-Gruppen. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl

Zwischen EDD 12 und EDD 14 nahm die Gefäßdichte in allen vier vaskularisierten Gruppen zu. Auch an EDD 14 konnten in der CM-Kontrollgruppe und in der CM+SMP-Gruppe aufgrund

des Fehlens von Gefäßen keine Messwerte erhoben werden. Dementsprechend verzeichneten die SFM für die Rehydrierung mit NaCl und SMP eine deutliche Zunahme der Gefäßdichte (SF+NaCl: $0,003545 \pm 0,00058$; SF+SMP: $0,003612 \pm 0,00208$). Dagegen wies die mit i-PRF biofunktionalisierte CM eine signifikant höhere Gefäßdichte auf als die SF+iPRF-Gruppe (CM+iPRF: $0,006639 \pm 0,00110$; SF+iPRF: $0,003218 \pm 0,00072$) ($p = 0,002$) (Abbildung 13). Auch im Vergleich zu der SF-Kontrollgruppe ($p = 0,006$) und der mit SMP biofunktionalisierten SFM ($p = 0,002$) zeigte die mit i-PRF biofunktionalisierte CM signifikant höhere Messwerte. Während sich die Messwerte in der CM-Gruppe in Abhängigkeit von der Biofunktionalisierung stark unterschieden, wurden in der SF-Gruppe nur geringe Varianzen festgestellt, wobei die SF+SMP-Gruppe vor der SF+NaCl- und der SF+iPRF-Gruppe die höchsten Werte aufwies.

Tabelle 13: Messwerte Gesamtgefäßdichte.

Gruppe	n	EDD	Gesamtgefäßdichte ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	
			M	SD
CM+iPRF	2	10	0,000091	0,00016
	14	12	0,002247	0,00162
	14	14	0,006639	0,00110
SF+NaCl	1	10	0,000105	0,00015
	10	12	0,001122	0,00042
	11	14	0,003545	0,00058
SF+iPRF	2	10	0,000040	0,00006
	8	12	0,001614	0,00095
	12	14	0,003218	0,00072
SF+SMP	1	10	0,000014	0,00003
	7	12	0,000570	0,00078
	13	14	0,003612	0,00208

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.1.4 Bestimmung der Gefäßverzweigungspunkte

Analog zu den bereits beschriebenen Parametern wiesen die SF-Kontrollgruppe und die SF+SMP-Gruppe an EDD 12 höhere Messwerte auf als die entsprechend behandelten nicht vaskularisierten CM (Abbildung 14) (SF+NaCl: $1,08 \pm 0,42$; SF+SMP: $0,35 \pm 0,58$). Die Messwerte der mit i-PRF behandelten CM lagen über den Werten der SF+iPRF-Gruppe (CM+iPRF: $4,13 \pm 4,67$; SF+iPRF: $1,74 \pm 0,72$). Bei den CM resultierte die Biofunktionalisierung mit i-PRF an EDD 12 in einer höheren Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten gegenüber den anderen CM-Gruppen. Im Vergleich zu der

SF-Kontrollgruppe zeigte die mit i-PRF biofunktionalisierten SFM fast doppelt so viele und im Vergleich zu der SF+SMP-Gruppe nahezu fünffach so viele Verzweigungspunkte.

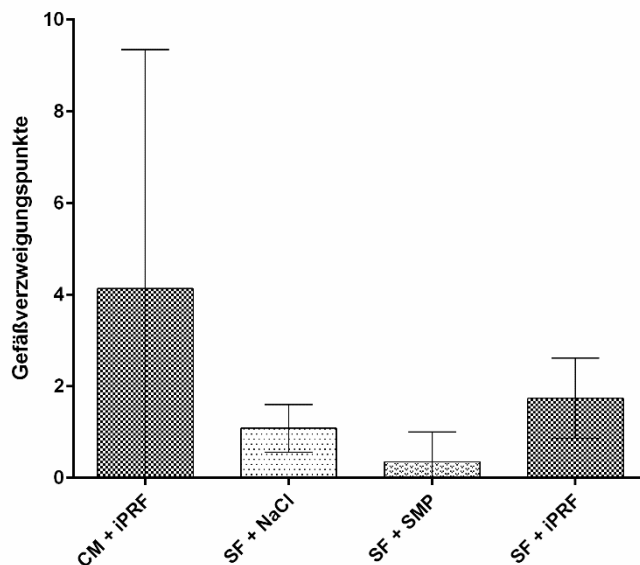


Abbildung 14: Gefäßverzweigungspunkte an EDD 12.

Die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte der vaskularisierten Matrices an EDD 12 aus den Gruppen CM+iPRF ($n = 14$), SF+NaCl ($n = 10$), SF+iPRF ($n = 8$) und SF+SMP ($n = 7$) wurden als Säulendiagramm dargestellt. Die Messwerte in den mit NaCl oder SMP biofunktionalisierten SFM waren höher als in den entsprechenden nicht vaskularisierten CM, für die keine Messwerte vorlagen. Tendenziell konnte in der SF+iPRF-Gruppe eine höhere Gefäßdichte nachgewiesen werden als in der SF+NaCl- und der SF+SMP-Gruppe. Die Unterschiede zwischen sämtlichen Versuchsgruppen waren jedoch nicht signifikant. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl

Zwischen EDD 12 und EDD 14 stieg die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte in den vier Gruppen stark an. An dem letzten Versuchstag konnten aufgrund der fehlenden Vaskularisation in der CM-Kontrollgruppe und in der CM+SMP-Gruppe weiterhin keine Gefäßverzweigungspunkte nachgewiesen werden, sodass die korrespondierenden SF-Gruppen höhere Messwerte für diesen Parameter aufwiesen (SF+NaCl: $7,11 \pm 3,11$; SF+SMP: $4,92 \pm 2,60$). Im Gegensatz dazu, zeigte die CM+iPRF-Gruppe ($14,45 \pm 4,85$) signifikant mehr Verzweigungspunkte als die SF+iPRF-Gruppe (SF+iPRF: $1,74 \pm 0,72$) ($p < 0,001$). Auch im Vergleich zu der SF-Kontrollgruppe ($p = 0,008$) und der SF+SMP-Gruppe ($p < 0,001$) konnte für diese CM+iPRF-Gruppe ein signifikant höherer Messwert festgestellt werden (Abbildung 15). In der CM-Gruppe wurden lediglich für die Kombination mit i-PRF Gefäßverzweigungen nachgewiesen. Zwischen den SFM ließ sich kein wesentlicher Unterschied feststellen.

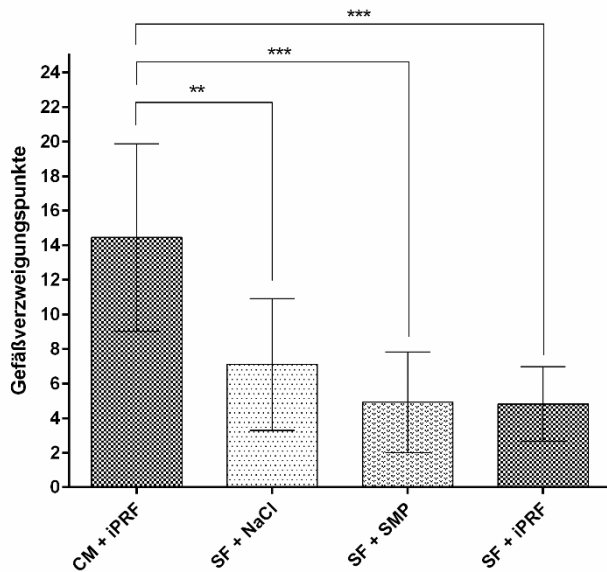


Abbildung 15: Gefäßverzweigungspunkte an EDD 14.

Die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte der vaskularisierten Matrices an EDD 14 aus den Gruppen CM+iPRF ($n = 14$), SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 12$) und SF+SMP ($n = 13$) wurde als Säulendiagramm dargestellt. Schwarze Sterne markierten voneinander signifikant unterschiedliche Ergebnisse (two-way ANOVA mit Bonferroni Korrektur: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die CM+iPRF-Gruppe zeigte signifikant höhere Messwerte als die SF+iPRF-Gruppe, die mit NaCl rehydrierte SF und die SF+SMP-Gruppe. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl

Tabelle 14: Messwerte Gefäßverzweigungspunkte.

Gruppe	n	EDD	Gefäßverzweigungspunkte	
			M	SD
CM+iPRF	2	10	0,10	0,20
	14	12	4,13	4,67
	14	14	14,45	4,85
SF+NaCl	1	10	0,03	0,05
	10	12	1,08	0,42
	11	14	7,11	3,11
SF+iPRF	2	10	0	0
	8	12	1,74	0,72
	12	14	4,82	1,75
SF+SMP	1	10	0	0
	7	12	0,35	0,58
	13	14	4,92	2,60

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.2 qPCR

Die qPCR ermöglichte die Untersuchung der relativen Expression der für die Angiogenese und Inflammation relevanten Gene VEGF, HIF-1 α , MMP-13 und NOS2. Es wurden sowohl die vaskularisierten als auch die nicht vaskularisierten Matrices in die Auswertung miteinbezogen. Werte, die über dem zehnfachen Mittelwert einer Versuchsgruppe lagen, wurden als Ausreißer gewertet und aus der Statistik ausgeschlossen.

4.2.1 Relative Expression VEGF

In Abbildung 16 ist die relative Expression von VEGF dargestellt. Der proangiogene Wachstumsfaktor wurde an EDD 11 in der CM+NaCl-Gruppe stärker exprimiert als in der SF-Vergleichsgruppe (CM+NaCl: $3,17 \pm 1,12$; SF+NaCl: $2,83 \pm 2,38$). Auch bei der mit i-PRF behandelten Matrices war die Expression in der CM-Gruppe tendenziell höher als in den SF-Gruppe (CM+iPRF: $2,35 \pm 1,34$; SF+iPRF: $1,76 \pm 1,32$). In der CM+NaCl- und der CM+iPRF-Gruppe wurden höhere Werte gemessen als in der mit SMP biofunktionalisierten CM (CM+SMP: $1,39 \pm 0,86$). Das gleiche Bild zeigte sich bei den SFM (SF+SMP: $1,42 \pm 0,67$).

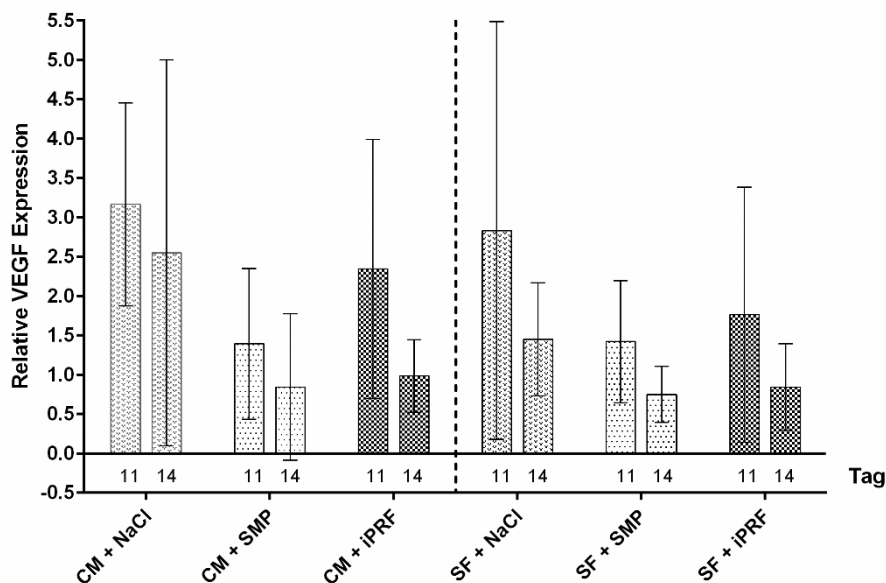


Abbildung 16: Übersicht relative Expression der qPCR für das Gen VEGF

Die relative Expression an EDD 11 wurde in den Gruppen CM+NaCl ($n = 3$), CM+iPRF ($n = 4$), CM+SMP ($n = 5$) SF+NaCl ($n = 5$), SF+iPRF ($n = 5$), SF+SMP ($n = 5$) und an EDD 14 in den Gruppen CM+NaCl ($n = 7$), CM+iPRF ($n = 12$), CM+SMP ($n = 9$) SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 14$), SF+SMP ($n = 13$) als Säulendiagramm dargestellt. Die Kontrollgruppen zeigten an EDD 11 eine besonders starke Expression von VEGF. Die Genexpression war an diesem Tag in den Kontrollgruppen am höchsten, gefolgt von den mit i-PRF behandelten Gruppen und den mit SMP biofunktionalisierten Matrices. Auch an EDD 14 wurde VEGF in den Kontrollgruppen stärker exprimiert als in den mit i-PRF oder SMP behandelten Gruppen. In den CM-Gruppen konnte, außer bei den mit SMP biofunktionalisierten Matrices an EDD 12 zu beiden Zeitpunkten eine geringfügig höhere Expression von VEGF als in den SF-Gruppen festgestellt werden. Die Messwerte sämtlicher Versuchsgruppen unterschieden sich jedoch weder an EDD 11 noch an EDD 14 signifikant voneinander. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VEGF = vascular endothelial growth factor

An EDD 14 wiesen alle CM-Gruppen eine leicht höhere Expression von VEGF auf als die entsprechenden SF-Gruppen. Sowohl in den CM- als auch in den SF-Gruppen wurde der Wachstumsfaktor in der Kontrollgruppe am stärksten exprimiert (CM+NaCl: $2,55 \pm 2,00$; SF+NaCl: $1,45 \pm 0,51$), gefolgt von den mit i-PRF (CM+iPRF: $0,99 \pm 0,41$; SF+iPRF: $0,84 \pm 0,45$) und den mit SMP biofunktionalisierten Gruppen (CM+SMP: $0,85 \pm 0,76$; SF+SMP: $0,75 \pm 0,31$). Sowohl an EDD 11 als auch an EDD 14 konnten mittels einfaktorieller ANOVA keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 15: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen VEGF.

	EDD	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
M $\pm$ SD	11	3.17 ± 1.12	2.35 ± 1.34	1.39 ± 0.86	2.83 ± 2.38	1.76 ± 1.32	1.42 ± 0.67
	14	2.55 ± 2.00	0.99 ± 0.41	0.85 ± 0.76	1.45 ± 0.51	0.84 ± 0.45	0.75 ± 0.31
n	11	3	4	5	5	5	5
	14	7	12	9	11	14	13

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.2.2 Relative Expression HIF-1 α

In Abbildung 17 ist die relative Expression aller Versuchsgruppen dargestellt. An EDD 11 zeigte die CM-Kontrollgruppe eine leicht höhere relative Expression als die SF-Kontrollgruppe (CM+NaCl: $0,96 \pm 0,72$; SF+NaCl: $0,54 \pm 0,38$). Im Gegensatz dazu war die Expression in der mit i-PRF behandelten SFM geringfügig höher als in der entsprechenden CM-Gruppe (CM+iPRF: $0,53 \pm 0,07$; SF+iPRF: $0,72 \pm 0,24$). Die mit SMP biofunktionalisierten Matrices unterschieden sich kaum (CM+SMP: $0,45 \pm 0,06$; SF+SMP: $0,38 \pm 0,22$). Auch bei den CM zeigte sich eine geringe Varianz in der Expression von HIF-1 α . Die CM-Kontrollgruppe wies eine leicht höhere Expression als die CM+iPRF- und die CM+SMP-Gruppe auf. In der SF-Gruppe zeigte die mit i-PRF rehydrierte SFM die höchste relative Expression vor der SF-Kontrollgruppe und der SF+SMP-Gruppe.

Zwischen EDD 11 und EDD 14 ging die Expression in allen, außer der mit SMP behandelten SFM, zurück. An dem letzten Versuchstag war HIF-1 α in der CM-Kontrollgruppe geringfügig stärker exprimiert als in der SF-Kontrollgruppe (CM+NaCl: $0,67 \pm 0,67$; SF+NaCl: $0,31 \pm 0,07$). Sowohl für die Biofunktionalisierung mit i-PRF als auch mit SMP konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den Matrices festgestellt werden (CM+iPRF: $0,33 \pm 0,14$; SF+iPRF: $0,23 \pm 0,06$). Die Biofunktionalisierung mit SMP führte bei den SFM zu einer ähnlich starken relativen Expression wie bei den CM (CM+SMP: $0,40 \pm 0,17$; SF+SMP: $0,60 \pm 0,46$). In der Gruppe der CM verzeichnete die Kontrollgruppe die höchsten Messwerte vor den mit SMP und den mit i-PRF rehydrierten Matrices. Bei den SFM hingegen konnte in der SF+SMP-Gruppe eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden als in der

Kontrollgruppe und der mit i-PRF biofunktionalisierten Matrix. An EDD 14 konnten zwischen allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

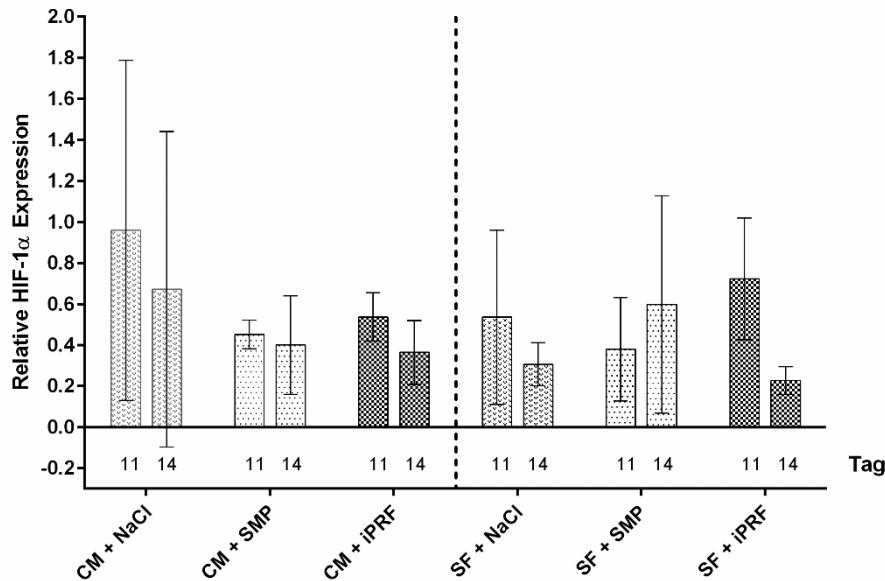


Abbildung 17: Übersicht relative Expression für das Gen HIF-1 α .

Die relative Expression an EDD 11 wurde in den Gruppen CM+NaCl ($n = 3$), CM+iPRF ($n = 4$), CM+SMP ($n = 5$) SF+NaCl ($n = 5$), SF+iPRF ($n = 5$), SF+SMP ($n = 5$) und an EDD 14 in den Gruppen CM+NaCl ($n = 7$), CM+iPRF ($n = 12$), CM+SMP ($n = 9$), SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 14$), SF+SMP ($n = 13$) als Säulendiagramm dargestellt. Sowohl an EDD 11 als auch an EDD 14 konnte bei den Kontrollgruppen, den i-PRF-Gruppen, und den SMP-Gruppen kein wesentlicher Unterschied zwischen den CM und SFM festgestellt werden. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, HIF-1 α = Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha

Tabelle 16: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen HIF-1 α .

	EDD	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
M $\pm$ SD	11	0.96 $\pm$ 0.72	0.53 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.38	0.72 $\pm$ 0.24	0.38 $\pm$ 0.22
	14	0.67 $\pm$ 0.67	0.33 $\pm$ 0.14	0.40 $\pm$ 0.17	0.31 $\pm$ 0.07	0.23 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.46
n	11	3	4	5	5	5	5
	14	7	12	9	11	14	13

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.2.3 Relative Expression MMP-13

Die Abbildung 18 zeigt die relative Expression des Transkriptionsfaktors MMP-13. An EDD 11 wies die CM+NaCl-Gruppe einen höheren Mittelwert auf als die SF-Kontrollgruppe (CM+NaCl: $1,22 \pm 1,71$; SF+NaCl: $0,43 \pm 0,24$). Die Expression war sowohl in der mit i-PRF behandelten als auch in der mit SMP biofunktionalisierten CM leicht höher als in den entsprechenden SF-Vergleichsgruppen (CM+iPRF: $2,12 \pm 1,52$; SF+iPRF: $1,30 \pm 1,02$; CM+SMP: $0,60 \pm 0,54$; SF+SMP: $0,31 \pm 0,27$). In der Gruppe der CM wurde eine leicht stärkere Expression an EDD 11 in der Kontrollgruppe nachgewiesen, während in der CM+iPRF- und der CM+SMP-Gruppe niedrigere Werte gemessen wurden. Bei den SF-Gruppen waren die

Unterschiede zwischen den Gruppen geringer, wobei auch hier MMP-13 bei den mit i-PRF behandelten Matrices am stärksten exprimiert wurde. Die relative Expression unterschied sich zwischen der SF+NaCl- und der SF+SMP-Gruppe kaum.

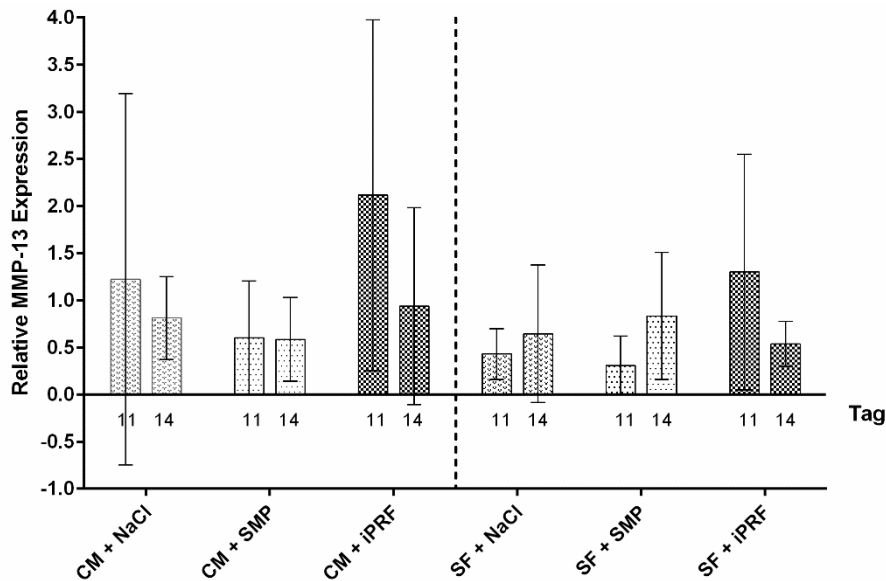


Abbildung 18: Übersicht relative Expression für das Gen MMP-13.

Die relative Expression an EDD 11 wurde in den Gruppen CM+NaCl ($n = 3$), CM+iPRF ($n = 4$), CM+SMP ($n = 5$) SF+NaCl ($n = 5$), SF+iPRF ($n = 5$), SF+SMP ($n = 5$) und an EDD 14 in den Gruppen CM+NaCl ($n = 7$), CM+iPRF ($n = 12$), CM+SMP ($n = 9$) SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 14$), SF+SMP ($n = 13$) als Säulendiagramm dargestellt. An EDD 11 war die Expression von MMP-13 in den CM-Gruppen geringfügig stärker als in den entsprechenden SF-Gruppen. Zwischen EDD 11 und EDD 14 nahm die Expression in allen CM-Gruppen und der SF+iPRF-Gruppe ab, während sie in der SF+NaCl und in der SF+SMP-Gruppe zunahm. An EDD 14 war die Expression in allen CM-Gruppen ähnlich stark. Bei den SFM wies die mit SMP biologisierte Matrix eine höhere Expression auf als die beiden anderen Gruppen. Die Messwerte sämtlicher Versuchsgruppen unterschieden sich weder an EDD 11 noch an EDD 14 signifikant voneinander. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, MMP-13 = Matrix-Metalloproteinase 13

Tabelle 17: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen MMP-13.

	EDD	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
M ± SD	11	1.22 ± 1.71	2.12 ± 1.52	0.60 ± 0.54	0.43 ± 0.24	1.30 ± 1.02	0.31 ± 0.27
	14	0.81 ± 0.38	0.94 ± 0.91	0.59 ± 0.31	0.64 ± 0.51	0.54 ± 0.20	0.83 ± 0.58
n	11	3	4	5	5	5	5
	14	7	12	9	11	14	13

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Analog zu den Daten für HIF-1 α nahm die Expression in den meisten Gruppen zwischen EDD 11 und EDD 14 ab und stieg nur in der SF+ NaCl- und der SF+ SMP-Gruppe geringfügig an. An dem letzten Versuchstag unterschied sich die Expression des Enzyms zwischen den Kontrollgruppen kaum (CM+NaCl: $0,81 \pm 0,38$; SF+NaCl: $0,64 \pm 0,51$). Die Biofunktionalisierung mit i-PRF resultierte in den CM in geringfügig höheren Messwerten als

in der SFM (CM+iPRF: $0,94 \pm 0,91$; SF+iPRF: $0,54 \pm 0,20$). Dagegen zeigten die mit SMP behandelten SF eine höhere Expression als die entsprechenden CM (CM+SMP: $0,59 \pm 0,31$; SF+SMP: $0,83 \pm 0,58$). Sämtliche für MMP-13 aufgeführten Unterschiede waren nicht signifikant.

4.2.4 Relative Expression NOS2

In Abbildung 19 ist die relative Expression von NOS2 dargestellt. Für das Zielgen zeigte sich in allen Gruppen eine im Vergleich zu den anderen Faktoren große Streuung der Ct-Werte, sodass die Ergebnisse nur eingeschränkt interpretierbar sind. An EDD 11 war die Expression in der SF-Kontrollgruppe geringfügig höher als in der CM-Kontrollgruppe (CM+NaCl: $5,67 \pm 8,57$; SF+NaCl: $7,62 \pm 9,11$). Im Gegensatz dazu wurde bei den mit i-PRF biofunktionalisierten Matrices für die CM-Gruppe eine höhere Expression als für die SFM-Gruppe festgestellt werden (CM+iPRF: $8,65 \pm 12,22$; SF+iPRF: $6,38 \pm 6,35$). NOS2 wurde wiederum in der CM+SMP-Gruppe ähnlich stark exprimiert wie in der SF+SMP-Gruppe (CM+SMP: $3,07 \pm 5,56$; SF+SMP: $3,00 \pm 5,00$). Sowohl bei den CM als auch bei den SFM verzeichneten die Kontrollgruppen und die mit i-PRF rehydrierten Matrices eine leicht höhere relative Expression als die mit SMP behandelten Gruppen. Zwischen EDD 11 und EDD 14 nahm die Expression des Faktors in allen Gruppen außer der SF+SMP-Gruppe ab.

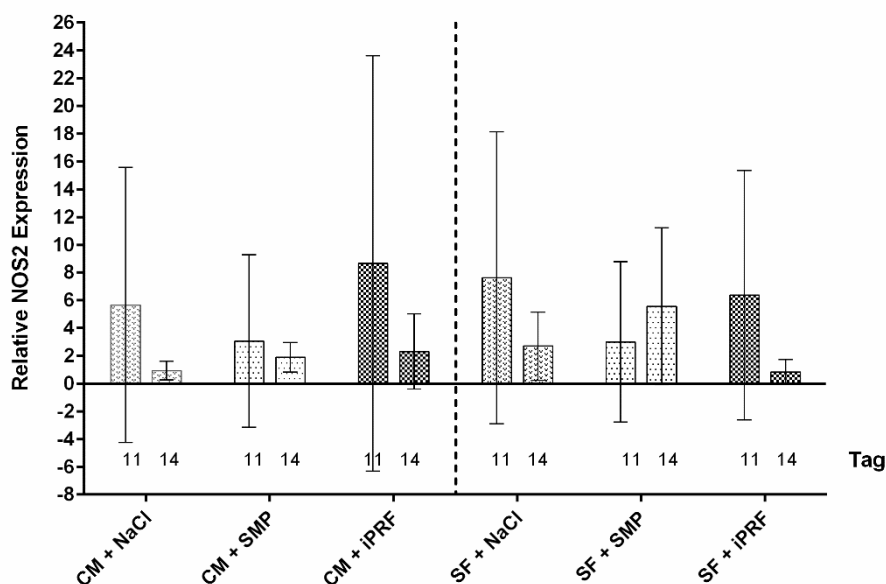


Abbildung 19: Übersicht relative Expression der qPCR für das Gen NOS2.

Die relative Expression an EDD 11 wurde in den Gruppen CM+NaCl ($n = 3$), CM+iPRF ($n = 4$), CM+SMP ($n = 5$) SF+NaCl ($n = 5$), SF+iPRF ($n = 5$), SF+SMP ($n = 5$) und an EDD 14 in den Gruppen CM+NaCl ($n = 7$), CM+iPRF ($n = 12$), CM+SMP ($n = 9$) SF+NaCl ($n = 11$), SF+iPRF ($n = 14$), SF+SMP ($n = 13$) als Säulendiagramm dargestellt. Die Messwerte sämtlicher Versuchsgruppen unterschieden sich weder an EDD 11 noch an EDD 14 signifikant voneinander. Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, NOS2 = nitric oxide synthase 2

An dem letzten Versuchstag war die Expression von NOS2 in der Kontrollgruppe und der mit SMP behandelten Gruppe für die SFM mehr als doppelt so hoch wie für die CM (CM+NaCl:

0,94 ± 0,54; SF+NaCl: 2,70 ± 1,74; CM+SMP: 1,90 ± 0,75; SF+SMP: 5,57 ± 4,62). Bei der Biofunktionalisierung mit iPRF zeigten die Werte allerdings einen umgekehrten Trend (CM+iPRF: 2,31 ± 2,34; SF+iPRF: 0,84 ± 0,74). Bei den mit i-PRF und den mit SMP behandelten CM war die Expression des Zielgens an EDD 14 höher als in der Kontrollgruppe. Dagegen wurde NOS2 bei den SFM in der mit SMP biofunktionalisierten Gruppe stärker exprimiert als in den beiden anderen Gruppen. Sämtliche Versuchsgruppen unterschieden sich in der relativen Expression von NOS2 weder an EDD 11 noch an EDD 14 signifikant voneinander.

Tabelle 18: Messwerte relative Expression der qPCR für das Gen NOS2.

	EDD	CM+NaCl	CM+iPRF	CM+SMP	SF+NaCl	SF+iPRF	SF+SMP
M ± SD	11	5.67 ± 8.57	8.65 ± 12.22	3.07 ± 5.56	7.62 ± 9.11	6.38 ± 6.35	3.00 ± 5.00
	14	0.94 ± 0.54	2.31 ± 2.34	1.90 ± 0.75	2.70 ± 1.74	0.84 ± 0.74	5.57 ± 4.62
n	11	3	4	5	5	5	5
	14	7	12	9	11	14	13

Abkürzungen: EDD = egg development day, CM = Kollagenmatrix, SF = Seidenfibroinmatrix, NaCl = Natriumchlorid, iPRF = injectable platelet rich fibrin, SMP = Schmelz-Matrix-Proteine, n = Stichprobenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung

4.3 Histologie

Die Histologie ermöglichte einen Vergleich der Matrixstruktur und die Lokalisierung der Blutgefäße auf histologischer Ebene. Hierzu wurden Schnitte der mittels Fluoreszenzmikroskopie als vaskularisiert gewerteten Matrices erstellt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

In ihrem histologischen Aufbau unterschieden sich die Mucoderm®-CM und die SFM deutlich (Abbildung 20). Die CM präsentierte sich in den Schnitten als quaderförmige Struktur mit einer wesentlich höheren Dicke als ihr Pendant aus Seide. Sie zeigte ein homogenes Erscheinungsbild mit einer Vielzahl an ineinander verflochtener Kollagenfasern. Wie durch den Hersteller beschrieben, erscheint die Matrix kompakt aufgebaut. Mittels HE-Färbung konnten keine größeren Hohlräume innerhalb der Matrix festgestellt werden; die Oberfläche der CM erschien glatt. Im Gegensatz dazu, zeigte sie SFM eine deutlich geringere Dicke. Sie bestand aus einem heterogenen Gemisch von dünnen Filamenten und größeren, rundlichen Anschnitten von Seidenfasern. Die Matrix wies eine Vielzahl an Hohlräumen auf und wirkte insgesamt sehr locker und durchlässig.

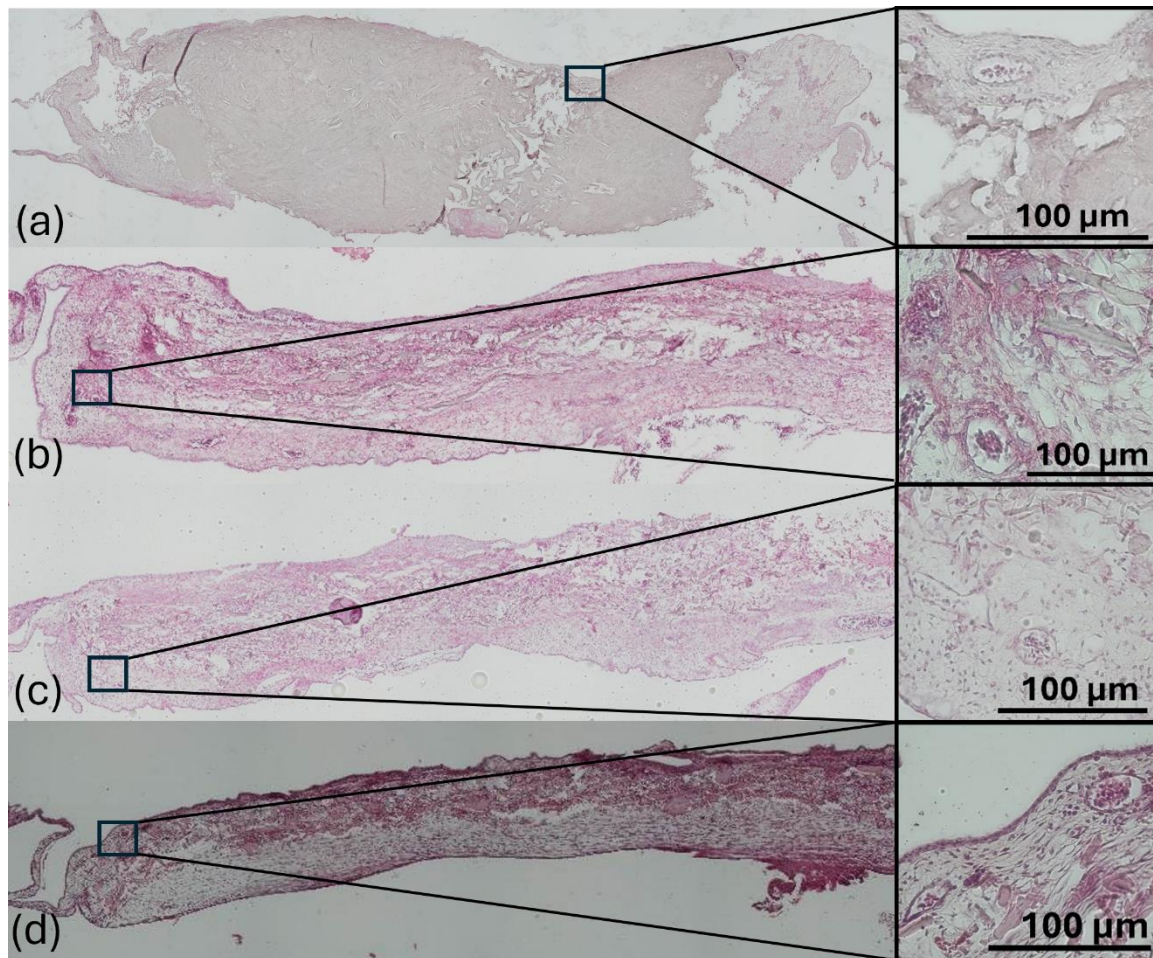


Abbildung 20: HE-Färbung der in die CAM integrierten Matrices.

Die Aufnahmen wurden bei 50-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop angefertigt und zu Übersichtsaufnahmen zusammengefügt. (a) zeigt eine mit i-PRF rehydrierte Kollagenmatrix. In (b-d) sind die Seidenfibroinmatrices der Kontrollgruppe (b), der SF+iPRF- (c) und der SF+SMP-Gruppe (d) zu sehen. Auf der rechten Seite sind die jeweils vergrößerten Aufnahmen (50-fache Vergrößerung) dargestellt, die die vaskularisierten Randbereiche der Matrices zeigen. Abkürzungen: SF = Seidenfibroin, SMP= Schmelz-Matrix-Protein, i-PRF = injectable platelet rich fibrin.

Die Übergangszone zwischen den Matrices und dem CAM-Gewebe war in den CM deutlich klarer strukturiert als in den SFM. Während die CM gegenüber dem umliegenden CAM-Gewebe klar abgegrenzt war, schien die SFM fließend in dieses überzugehen. Die Matrices waren allseitig von Bindegewebe umgeben und schienen dementsprechend gut in das umliegende Gewebe integriert zu sein. In den vier vaskularisierten Gruppen konnten in die peripheren Randbereiche der Matrices infiltrierende mononukleäre Zellen beobachtet werden. Während innerhalb der CM nur vereinzelt Zellen erkennbar waren, waren diese in der SFM ubiquitär zu sehen. Die Ränder waren tendenziell stärker mit Zellen besiedelt als die zentralen Bereiche der Matrix. Darüber hinaus fanden sich in den Randbereichen der SFM und der CM+iPRF-Gruppe kleine Blutgefäße, die anhand der eingeschlossenen Erythrozyten identifiziert wurden (Abbildung 20). Innerhalb der Matrices konnten mittels HE-Färbung jedoch keine Gefäße nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Das CAM-Assay und seine Limitationen

In dieser Studie wurde das CAM-Assay verwendet, um CM und SFM vergleichend auf Angiogenese und immunologische Toleranz zu testen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Biofunktionalisierung beider Matrices mit i-PRF und SMP untersucht. CAM-Assays haben sich aufgrund ihrer zahlreichen Vorteile in der Wissenschaft etabliert. Im Sinne des von Russel und Burch formulierten 3R-Prinzips trägt das Modell auch dazu bei, die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren (*reduction*) (202, 203). Aufgrund der fehlenden Innervation des extraembryonalen Gefäßsystems, wird das Leiden der Tiere im Vergleich zu klassischen Tierversuchen verringert (*refinement*) (193, 204, 205). Neueste Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass Hühnerembryonen erst ab EDD 13 über ein funktionsfähiges Gehirn verfügen, sodass vor diesem Zeitpunkt nicht von einem möglichen Schmerzempfinden ausgegangen werden kann (206, 207). Bis EDD 14 wird das CAM-Assay rechtlich nicht als Tierversuch angesehen und stellt eine Alternative (*replacement*) zu solchen dar (197, 208, 209). Mit dieser Methode kann die Lücke zwischen *in-vitro* Tests und den klassischen Tierversuchen geschlossen werden. Die kurze Entwicklungszeit der Hühnerembryonen ermöglicht schnellere Ergebnisse als in den meisten Tierversuchen bei gleichzeitig hohen Probenzahlen und einer kostengünstigen Durchführung der Versuche (193, 210). Daher wird das CAM-Assay schon seit Jahrzehnten eingesetzt, um die Wirkung von pro- und antiangiogenen Substanzen zu testen (211).

Zu den Limitationen des CAM-Assays zählt die Übertragbarkeit der *in ovo* erzielten Ergebnisse auf den Menschen. Wie bereits in Abschnitt 0 beschrieben, befindet sich das Gefäßsystem zwischen EDD 4 und EDD 12 noch im Aufbau und zeigt insbesondere an den letzten drei Tagen eine hohe Toleranz gegenüber Transplantaten (212, 213). Ihren Höhepunkt erreicht die Angiogenese in dem Assay zwischen EDD 7 und EDD 12 (214). Auch die für die Angiogenese wichtigen Wachstumsfaktoren VEGF und TGF- β werden in dem Embryonalstadium an diesen Tagen besonders stark exprimiert (135, 215). Ein Vergleich mit der Anwendung bei humanen Patienten unterschiedlichen Alters ist daher nur eingeschränkt möglich. Des Weiteren erschwert das dichte Gefäßnetz der CAM die Beurteilung der Wirkung von nur schwach proangiogen wirkenden Substanzen auf die Neovaskularisation (216). Da auch nicht spezifische Entzündungsreaktionen auf Fremdkörper wie Matrices zu einer Stimulation der Angiogenese führen können, erweist sich eine Unterscheidung zwischen normaler und induzierter Angiogenese in diesem Modell als schwierig (211, 217). Um eine unspezifische Immunreaktion zu minimieren, sollte die Applikation des zu untersuchenden Materials auf die sich entwickelnde CAM möglichst frühzeitig erfolgen. (197).

Auch die Verwendung des CAM-Assays als Modell für immunbasierte Studien ist an bestimmte Beschränkungen geknüpft. Obgleich sich die Immunsysteme von Vögeln und Menschen funktionell ähneln und vergleichbare Immunantworten aufweisen, zeigen sich dennoch Unterschiede (210, 218). Während sich das T-Zellsystem weitgehend gleicht, ist das B-Zellsystem in einigen Aspekten differierend (219, 220). Hühner besitzen keine eingekapselten Lymphknoten und nutzen für die B-Zellreifung, welche beim Menschen im Knochenmark stattfindet, ein eigenes Organ, den Fabricius-Schleimbeutel, in dem auch die Antikörperbildung stattfindet (221). Analog zu den neutrophilen Granulozyten des Menschen, verfügen Hühner über heterophile Granulozyten, die für die Phagozytose von Pathogenen und Fremdkörpern zuständig sind (222). Die Hämatopoese und die inflammatorischen Prozesse weisen eine hohe Ähnlichkeit auf und für die wichtigsten Entzündungsmediatoren wurden bereits ähnlich funktionierende Äquivalente im Huhn entdeckt (210, 221). Des Weiteren ist das Immunsystem von Hühnerembryonen erst ab EDD 10 bis EDD 12 funktionsfähig (55, 210, 223) und bis EDD 15 nur eingeschränkt aktiv (193). Daher kann eine Aussage über die immunologische Toleranz von xenogenen Materialien, die auf der CAM getestet wurden, lediglich unter Vorbehalt getroffen werden. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass sich die untersuchten Hühnerembryonen genetisch individuell unterscheiden und dementsprechend auch verschieden auf die applizierten Matrices reagieren können. Um die Effekte der biofunktionalisierten Matrices auf die Neovaskularisation *in vivo* an genetisch identischen Organismen zu untersuchen, können weiterführende Untersuchungen an geklonten Mäusen durchgeführt werden.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann die Neovaskularisation auf der CAM nach Länge, Durchmesser, Anzahl und Dichte von Gefäßen quantifiziert werden (197, 224). Für die Untersuchung dieser Parameter wird häufig ein definierter Bereich (ROI) auf der Matrix ausgewählt, der repräsentativ für die Gesamtoberfläche steht. Dies reduziert den Auswertungsaufwand erheblich, birgt jedoch auch ein erhöhtes Fehlerrisiko, zumal die Neovaskularisation an verschiedenen Stellen der Matrix unterschiedlich weit fortgeschritten sein kann (197). Darüber hinaus ist bei der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop zu berücksichtigen, dass die detektierten Gefäße nicht eindeutig lokalisiert werden können, da nicht ersichtlich ist, ob sie auf, innerhalb oder unter der Matrix gewachsen sind (225). Um die gesamte Oberfläche der Matrix auf Gefäße hin zu untersuchen, eignen sich Softwareprogramme, die in der Lage sind, große Datenmengen schnell auszuwerten und auch für das menschliche Auge kaum sichtbare Gefäße zu identifizieren (223). Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Differenzierung zwischen Gefäßen und Kollagen- oder Seidenfasern, die bei der Verwendung der Software ImageJ auftraten, wurde in dieser Studie auf eine manuelle Auswertung zurückgegriffen. In anderen Studien erwies sich die Verwendung softwaregestützter Analysetechniken wie des *Vessel Analysis Plug-Ins* (Nivetha Govindaraju,

M. farna) für das Programm Fiji als hilfreich (54, 55). Um eine eindeutige Differenzierung zwischen Blutgefäßen und Matrixstrukturen zu gewährleisten, kann die intravenöse Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen. Die markierten Blutgefäße lassen sich anschließend softwaregestützt auswerten (196). Da die verwendeten Färbelösungen meist toxisch sind (55), sterben die Embryos bei der Applikation der Substanz ab, sodass diese Methode für die Beobachtung der Vaskularisation über einen längeren Zeitraum hinweg ungeeignet ist. Als Alternative zu den toxischen Farbstoffen könnten in Zukunft biokompatible farbstoffmarkierte virale Nanopartikel für Langzeitversuche dienen (226).

Im Rahmen der Untersuchung der Immunantwort von Hühnerembryonen auf die biofunktionalisierten Matrices wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Diese Methode weist eine hohe Spezifität und Sensitivität auf und wurde bereits in Vorläuferversuchen eingesetzt (54, 215). In der Literatur finden sich vergleichbare Beschreibungen der Abläufe bei der RNA-Isolation und der qPCR, wobei die Vorgehensweisen herstellerspezifisch nur geringfügig variieren. Die Angaben zu der genauen Entnahmestelle von RNA-Proben in der Umgebung von Matrices unterscheiden sich jedoch von Studie zu Studie (227-229). Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Gewinnung einer ausreichenden Probenmenge von der Unterseite der Matrices wurden die RNA-Proben aus dem Randbereich der Matrix von der CAM entnommen. Daher ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der qPCR lediglich eine Aussage über die Expression der Zielgene in der unmittelbaren Umgebung der Matrix auf der CAM zulassen und nicht über die tatsächlich innerhalb der Matrix aufgetretene Expression. Inwieweit die Entnahmestelle der Proben die Messwerte der relativen Expression beeinflusst, ist derzeit noch unklar. In der Literatur werden je nach Versuchsaufbau unterschiedliche Housekeeping-Gene für die qPCR verwendet. In Versuchen mit Hühnerembryonen werden in der Regel die Referenzgene GAPDH (179, 230), β -Actin (54), HPRT (40, 215), HMBS (40) oder RPL4 (215, 228) einzeln oder auch in Kombination miteinander verwendet. In den in Abschnitt 3.1.5.4 beschriebenen Vorversuchen lieferte RPL4 die zuverlässigsten Ergebnisse und wurde daher für diese Arbeit als Referenzgen festgelegt. Für die Zielgene VEGF, HIF-1 α , MMP-13 und NOS2 wurden spezifische Primer für das Hühnergenom verwendet, die zuvor von Sax et al. unter ähnlichen Bedingungen in einem CAM-Assay getestet wurden (215). Die Auswertung der qPCR erfolgte unabhängig von der Vaskularisation der Matrices, da in diesem Versuch keine wesentlichen Unterschiede in der Expression zwischen den vaskularisierten und den nicht vaskularisierten Matrices einer Versuchsgruppe festgestellt wurden. Es traten teilweise starke Differenzen zwischen den Ct-Werten der gleichen Versuchsgruppe auf, deren Ursache sich nicht eindeutig zuordnen lässt. Eine mögliche Ursache könnte in der Anwendung der qPCR in lebenden Organismen liegen, die sich im Vergleich zu *in vitro* kultivierten Zelllinien unterschiedlich schnell entwickeln und sich genetisch voneinander unterscheiden. Auch die Interpretation der qPCR-Ergebnisse im CAM-Assay wird durch die starken Schwankungen von

Wachstumsfaktoren in der Embryonalphase erschwert. Vor allem die Unterscheidung zwischen dem proangiogenen Einfluss der untersuchten Substanzen und der von Natur aus stark ausgeprägten Neovaskularisation zwischen EDD 8 und 12 fällt in diesem Modell nicht leicht (227, 231).

Die histologischen Untersuchungen erlauben es, sowohl Rückschlüsse auf die genaue Lage der Gefäße in den Matrices als auch auf die immunologische Toleranz der Materialien zu ziehen (217). Obwohl sich das Immunsystem der Hühnerembryonen an EDD 14 noch im Aufbau befindet, lassen sich mittels HE-Färbung bereits zu diesem Zeitpunkt wertvolle Daten zu der initialen Gewebereaktion gewinnen (223). Mittels HE-Färbung oder Masson-Goldner-Trichromfärbung können Gefäße und Zellen in den Präparaten sichtbar gemacht werden (232). Die HE-Färbung ist inzwischen als Standardfärbung etabliert und wurde in den vergangenen Jahren bereits in zahlreichen CAM-Studien für den Nachweis von Gefäßen verwendet (162, 223, 229, 232, 233). Um bestimmte Strukturen präzise anfärben zu können, werden in einigen Studien zusätzlich immunhistochemische Färbungen eingesetzt (40, 199, 200, 232, 234). Diese eignen sich für die spezifische Detektion von Blutgefäßen in dem CAM-Modell, sind jedoch mit einem deutlich höheren Kosten- und Zeitaufwand verbunden als die Standardfärbungen (235). Meist werden dabei Antikörper gegen die in Gefäßen vorkommenden Proteine CD31, CD34, CD105 oder den von-Willebrand-Faktor verwendet (196). Die CD31-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit probeweise angewendet, zeigte jedoch keinen wesentlichen Mehrwert gegenüber der HE-Färbung, da eine Validierung der Neovaskularisation in den Matrices auch mit dieser Grundfärbung möglich war. Blatt et al. verwendeten für ihre Färbung von Gefäßen auf CM Antikörper gegen α -SMA und den Gefäßmarker CD105, der sich besonders gut für den Nachweis von Neovaskularisation eignet (162, 236). Die Auswertung der gefärbten Schnitte kann sowohl manuell als auch softwaregestützt erfolgen (162). Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese lediglich eine Schichtdicke von 4 μ m wiedergeben und Gefäßverläufe sowie Gefäßverzweigungspunkte kaum darstellbar sind. Da die histologische Auswertung in dieser Arbeit nicht der Quantifizierung, sondern lediglich der Validierung der Neovaskularisation auf den untersuchten Matrices diene, wurde auf eine softwaregestützte Auswertung verzichtet.

5.2 Seidenfibroinmatrices als Alternative in der Weichgewebschirurgie

In Anbetracht der demographischen Entwicklung, die mit einem steigenden Anteil älterer Patienten auch in der Implantologie einhergeht, gewinnen Matrices für den Ersatz von Weichgewebe zunehmend an Bedeutung. SFM bieten aufgrund ihrer Biokompatibilität (105) und mechanischen Festigkeit (107) gute Voraussetzungen, um den hohen Anforderungen in vielfältigen Indikationen gerecht zu werden (237, 238).

Obgleich derzeit autologe Transplantate, insbesondere für den Einsatz als Schleimhautersatz oder zur Weichgewebeverdickung, als klinischer Goldstandard gelten, bedingt eine steigende Anzahl vorerkrankter Patienten mit Risikofaktoren für unerwünschte Ereignisse bei der Eigengewebeentnahme den Bedarf an effektiven Alternativen (239). Der Einsatz xenogener, allogener oder alloplastischer Matrices ermöglicht eine Reduktion der Operationsdauer und der postoperativen Morbidität. Hinsichtlich der Komplikationen sind vor allem Schmerzen, Schwellungen und Blutungen zu nennen (44, 240). Gleichzeitig sind kommerzielle Matrices jedoch mit zusätzlichen Kosten für Patienten und Behandler verbunden, die neben den bereits genannten Vorteilen auch durch indikationsspezifische Vorteile wie einen reduzierten Knochenabbau nach der Zahnextraktion und damit bessere biologische Voraussetzungen für eine spätere Implantation gerechtfertigt werden können (241).

Die Anwendung xenogener Matrices in Form von CM und SFM wurde bereits für die Verbreiterung von keratinisierter Gingiva (12, 17), die Weichgewebeverdickung (25, 26), die GBR (105, 242) und die Rezessionsdeckung (36, 39) untersucht. In Bezug auf die Regeneration des Weichgewebes zeigten SFM vielversprechende Ergebnisse (130, 242). So konnten Ge et al. bei in die bukkale Mukosa von Ratten implantierten SFM eine verbesserte Wundheilung in Form einer verminderten Wundkontraktion und inflammatorischen Reaktion im Vergleich zu der mit einem Vaseline-Wundverband behandelten Kontrollgruppe beobachten (243). Insbesondere bei der GBR könnten die in ihrer Zugfestigkeit im rehydrierten Zustand den CM überlegenen SF von Nutzen sein (242). Ha et al. verwendeten für die GBR an Knochendefekten in dem Scheitelbein von Ratten SFM, die CM Rapi-Gide® und PTFE-Matrices und verglichen diese miteinander (242). Dabei stellten sie eine effektivere Knochenregeneration in den mit SFM behandelten Defekten fest. Auch Smeets et al. beobachteten bei für die GBR verwendeten SFM, die mit β -Tricalciumphosphat modifiziert wurden, eine Förderung der Knochenneubildung in Knochendefekten an der Schädelkalotte von Kaninchen (105). Weitere Modifikationen könnten die mechanischen Eigenschaften des Materials und dessen Integration in das umliegende Gewebe erleichtern und somit das Indikationsspektrum von SFM über die bereits genannten Indikationen hinaus erweitern. Für eine optimale Integration der Matrices ist jedoch eine suffiziente Neovaskularisation und immunologische Toleranz von entscheidender Bedeutung, die in dieser Studie mittels Fluoreszenzmikroskopie, qPCR und Histologie untersucht wurde.

5.2.1 Diskussion der Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

In dieser Arbeit wurden SFM und CM vergleichend auf die Induktion der Neovaskularisation untersucht. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Materialien festgestellt werden. Während in der SF-Kontrollgruppe bereits an EDD 10 Gefäße auf der Matrix nachgewiesen wurden, wurde bis zu dem Versuchsende keine Gefäßeinsprossung in die CM-Kontrollgruppe beobachtet (Abbildung 9). Dementsprechend zeigte die SF-Kontrollgruppe

sowohl an EDD 12 als auch an EDD 14 deutlich höhere Werte für den Anteil vaskularisierter Matrices, die Gefäßdichte und die Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten.

In Bezug auf die Fluoreszenzmikroskopie war ein Vergleich mit der Literatur aufgrund variierender Auswertungsmethoden nur eingeschränkt möglich. Die Ergebnisse der mit NaCl rehydrierten CM wichen teilweise von den Ergebnissen anderer Studien ab (54, 162). Während in dieser Arbeit in der CM-Kontrollgruppe an EDD 14 keine Gefäße nachgewiesen wurden, zeigte die von Heimes et al. untersuchte Mucoderm®-CM zu diesem Zeitpunkt bereits eine vaskularisierte Fläche von 57 Prozent. In den ROIs wurde eine Gefäßdichte von $0,0016 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ gemessen und eine durchschnittliche Anzahl von 21 Gefäßverzweigungspunkten festgestellt. Auch Blatt et al. konnten anhand dieser CM bereits an EDD 12 eine vaskularisierte Matrixfläche von 23 Prozent nachweisen (162). Des Weiteren beobachteten Kohli et al. in dem *ex ovo* CAM-Assay an EDD 12 in der CM FirstLink® eine Gefäßdichte von 6 Prozent. Auf den $0,5 \times 0,5$ cm großen Scaffolds wurden durchschnittlich 40 Gefäßverzweigungspunkte gemessen (244). Auch die von Keshaw et al. aus bovinen Kollagenfasern hergestellten Kollagendiscs wiesen in dem CAM-Assay an EDD 14 Blutgefäße auf (245).

SFM wurden unter Nutzung des CAM-Assays bisher kaum mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Neovaskularisation untersucht. In dieser Studie konnte ab EDD 10 eine Zunahme der drei fluoreszenzmikroskopischen Parameter in der SF-Gruppe beobachtet werden. An dem letzten Versuchstag zeigten die SFM in dieser Arbeit eine durchschnittliche vaskularisierte Fläche von 36 Prozent und in den ROIs eine Gefäßdichte von $0,0035 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ sowie 7 Gefäßverzweigungspunkte. Luo et al. ermittelten in einem *ex ovo* CAM-Assay bei SFM hingegen eine vaskularisierte Matrixfläche von 15 Prozent an EDD 15 (133). Die Abweichung zu dem in dieser Studie an EDD 14 gemessenen Wert könnte unter anderem auf den späteren Zeitpunkt der Matrixauflage zurückzuführen sein. Während in dieser Arbeit die Matrices bereits an EDD 7 auf die CAM aufgebracht wurden, erfolgte die Applikation bei Luo et al. erst an EDD 11.

Die Gründe für die fehlende Vaskularisation der CM in dieser Arbeit sind bislang ungeklärt. Da für die SFM die gleiche Kochsalzlösung verwendet wurde, erscheint eine mögliche Verunreinigung der Lösung als Ursache für die ausgebliebene Vaskularisation wenig wahrscheinlich. Die Vermutung liegt nahe, dass die deutlich größere Flüssigkeitsaufnahme der CM zu einem Flüssigkeitsfilm zwischen der CAM und der CM führte, sodass kein direkter Kontakt zur CAM entstand. Im Hinblick auf diese Theorie ist anzumerken, dass die mit i-PRF biofunktionalisierten CM trotz der gleichen Menge aufgenommener Flüssigkeit suffizient adhärten.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Histologie

Die histologischen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie in dieser Arbeit. In allen SFM und der mit i-PRF biofunktionalisierten CM konnten mittels HE-Färbung kleine Gefäße in den Randbereichen auf beiden Seiten der Matrix nachgewiesen werden. In weiteren Studien wurde ebenfalls eine Vaskularisation von CM (246-248) und SFM (135, 247, 249-251) durch Mikrogefäße beobachtet. Histologische Vergleiche zwischen subkutan eingebrachten SFM und der CM Bio-Gide® in Mäusen konnten eine beschleunigte Vaskularisation und Integration von SFM gegenüber der CM feststellen (247). Eine transmembranale Vaskularisation wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch weder in der CM noch in der SFM nachgewiesen. Versuche an Mäusen und Ratten zeigten, dass die CM je nach Zusammensetzung hierfür in der Regel einen Zeitraum zwischen 3 und 8 Wochen benötigten (56, 59, 64, 247). Pabst et al. konnten bereits 21 Tage nach der subkutanen Implantation von Mucoderm®-CM mittels immunohistochemischer CD31-Färbung Mikrogefäße in der Matrix nachweisen (64). Wie bereits in mehreren Studien gezeigt, wurden einwachsende Gefäße meist in der Übergangszone der Matrix zu dem umliegenden Gewebe beobachtet, wobei die Gefäßdichte zum Zentrum hin abnahm (54, 250). Des Weiteren ließ sich die bereits zuvor beobachtete Infiltration von mononukleären Zellen in die Randbereiche der Matrices in dieser Arbeit bestätigen (59, 247). Meinel et al. konnten in Ratten histologisch nachweisen, dass intramuskulär implantierte SFM zu einer schwächeren inflammatorischen Reaktion führten als die aus bovinen Kollagenfasern eigens hergestellten CM (250). Die stärkere Gewebereaktion in den CM könnte eine Ursache für das Fehlen von Gefäßen in den unbehandelten CM darstellen. In der vorliegenden Arbeit war histologisch in der eng verwobenen CM eine klare Abgrenzung zu dem umliegenden CAM-Gewebe zu erkennen. Zudem konnten kaum Bindegewebszellen im Inneren der Matrix nachgewiesen werden, was auf eine Barrierefunktion der CM gegenüber einer Gewebeeinfiltration hindeuten könnte. Im Gegensatz dazu wurde bei den SFM keine klare Abgrenzung und eine stärkere Infiltration mit mononukleären Zellen festgestellt, in deren Folge Ghanaati et al. in ihren Versuchen einen beschleunigten Matrixabbau beobachteten (247). Das in die SFM eingewachsene Bindegewebe könnte die Neovaskularisation der Matrices beschleunigt haben und somit die guten Ergebnisse im Hinblick auf die Vaskularisation in den SFM erklären (33, 247). Weitere Ursachen für die 100-prozentige Vaskularisationsrate der SFM stellen sowohl der proangiogene Effekt des Materials (124) als auch seine strukturellen Eigenschaften dar (244, 252). Die verwendete SFM wies sowohl eine geringere Dicke als auch größere Hohlräume auf. Die Porosität und Porengröße lassen sich in der Herstellung zwar modifizieren, schienen in der Literatur jedoch in SFM meist größer zu sein als in CM (244, 252-254). So stellten Kohli et al. in der von ihnen verwendeten CM FirstLink® eine Porosität von 57 Prozent und eine Porengröße von überwiegend zwischen 20 und 39 µm fest, wohingegen Vishwanath et al. in hauptsächlich aus SF bestehenden SF/Chitosan-Matrices eine Porosität von 82 Prozent und

eine Porengröße von 70–200 µm maßen (244, 253). Auch Bhardwaj stellten in *Scaffolds* aus SF und Keratin eine Porosität von über 85 % fest (254). Für die Infiltration von umliegenden Zellen erwies sich eine Porengröße von 100–500 µm als förderlich (255). Eine zunehmende Porengröße erleichterte auch das Einwachsen von Gefäßen (244, 256) und könnte somit zu der stärkeren Neovaskularisation in den SFM beigetragen haben. In weiterführenden Studien könnte die Anwendung immunhistochemischer Färbungen helfen, einen tieferen Einblick in den Prozess der Neovaskularisation von SFM zu gewinnen. Spezifische Färbungen würden den eindeutigen Nachweis von Mikrogefäßen und die Identifizierung infiltrierender Zellen ermöglichen und damit zu einem besseren Verständnis der Immunreaktion in der Matrix beitragen.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse der qPCR

Um die Unterschiede zwischen SFM und CM auch auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse für die an der Angiogenese und Inflammation beteiligten Faktoren VEGF, HIF-1 α , MMP-13 und NOS2 durchgeführt. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass das CAM-Gewebe bis EDD 10 eine natürliche hohe Mitoserate aufweist, die an den Folgetagen rapide abnimmt und die starke Neovaskularisation in den ersten Entwicklungstagen erklärt (231). Die in diesem Versuch mittels qPCR erzielten Ergebnisse müssen daher vor dem Hintergrund der natürlich ablaufenden angiogenen und inflammatorischen Zusammenhänge bei Hühnerembryonen betrachtet werden.

Einer der wichtigsten Faktoren in dem Prozess der Neovaskularisation ist der Wachstumsfaktor VEGF (257). Das dimere Glykoprotein spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des vaskulären und hämatopoetischen Systems während der Embryonalentwicklung und ist sowohl an der Zellproliferation als auch an der Rekrutierung von Entzündungszellen beteiligt (257, 258). Die VEGF-Familie umfasst die Unterarten VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F sowie den *placenta growth factor* (PlGF) und den *endocrine gland-derived* VEGF (ED-VEGF) (257). Von besonderer Relevanz für die Angiogenese ist dabei der von Endothelzellen produzierte Faktor VEGF-A. Das Protein wird hauptsächlich durch die auf Endothelzellen vorkommende Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR-2 gebunden und löst anschließend eine Signalkaskade aus, bei der es zu Endothelzellproliferation, Vasodilatation und einer Permeabilitätssteigerung in Gefäßen kommen kann (227, 257, 259). Darüber hinaus kann der Konzentrationsgradient von VEGF-A die Richtung des Gefäßwachstums beeinflussen, indem er die Migration von endothelialen Tip-Zellen steuert, welche den Ausgangspunkt für die Sprossung neuer Gefäße bilden (260, 261).

In dieser Arbeit konnte in den CM und SFM eine Abnahme der relativen Expression von VEGF-A um etwa die Hälfte zwischen EDD 11 und EDD 14 beobachtet werden (Abbildung 16)

In vergleichbaren Studien wurde ebenfalls ein Rückgang der VEGF-Expression in diesem Zeitraum nachgewiesen (214, 215). Baum et al. ermittelten im CAM-Assay an EDD 8 und EDD 12 die höchsten Werte für die relative Expression des Wachstumsfaktors (227). In einer Studie von Sax et al. wurde unter vergleichbaren Laborbedingungen eine Abnahme der relativen Expression des Wachstumsfaktors ab EDD 11 festgestellt, welche sich durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigen ließ (215). Heimes et al. konnten unter Anwendung der Mucoderm®-CM eine vergleichbare Abnahme der Expression zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten feststellen (54). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die VEGF-Expression in der CM zwar nicht signifikant, jedoch geringfügig höher war als in der SFM. Auch Keshaw et al. stellten mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) *in vitro* eine Stimulation der VEGF-Expression von Myofibroblasten auf eigens fabrizierten bovinen Kollagendiscs im Vergleich zu den Zellen ohne Matrix fest (245). In einer weiteren Studie führten Vokurka et al. eine qPCR an Mäusen durch und konnten eine minimal erhöhte VEGF-Expression in der von ihnen auf der oralen Mukosa verwendeten CM (Mucograft®) gegenüber einer unbehandelten Kontrolle nachweisen (40).

In SFM wurde die VEGF-Expression bisher nur unzureichend untersucht. *In-vitro* Studien zu der Expression in mit glatten Muskelzellen beladenen SF-Filmen zeigten jedoch eine zunehmende VEGF-Expression innerhalb der ersten sieben Tage (262). Erst zwischen EDD 7 und EDD 14 wurde eine Abnahme der relativen Expression von VEGFR-2, dem Signalrezeptor von VEGF, in mit Endothelzellen und Fibroblasten beladenen SFM festgestellt (263). Die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der Expression von VEGF zwischen dem vierten und siebten Tag nach Applikation der SFM, lässt sich in Übereinstimmung mit den zitierten Studien, dadurch erklären, dass die mRNA-Proben aus embryonalem Gewebe entnommen wurden, in dem die Expression des Wachstumsfaktors starken Schwankungen unterliegt (227).

Einer der wichtigsten Auslöser für die Bildung neuer Gefäße ist die im geschädigten Gewebe vorherrschende Hypoxie (264, 265). Diese resultiert in der Aktivierung des dimeren Transkriptionsfaktors HIF, der aus einer sauerstoffregulierten α -Untereinheit und einer β -Untereinheit besteht (266). Die α -Untereinheit lässt sich in die Isoformen HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α einteilen (265). Die für die Neovaskularisation entscheidende Aktivierung von HIF-1 α findet in Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen statt und wird auch sauerstoffunabhängig durch die Expression von Wachstumsfaktoren reguliert (55, 265). Gleichzeitig kann eine vermehrte Sekretion von HIF-1 α auch eine Stimulation der VEGF-Expression durch Endothelzellen verursachen, wodurch die Angiogenese gefördert wird (264, 267).

In dieser Studie war die Expression des Transkriptionsfaktors an beiden Versuchstagen in der CM-Gruppe fast doppelt so hoch wie in der SF-Gruppe. Zudem nahm sie in beiden Gruppen

über den Versuchsverlauf ab (Abbildung 17). Ein genereller Abfall der HIF-Expression zwischen EDD 11 und 14 wurde im CAM-Assay auch durch Sax et al. beobachtet (215). In der Mucoderm®-CM konnten Heimes et al. eine relative Expression von 0,65 an EDD 11 und 0,58 an EDD 14 nachweisen. Die in dieser Arbeit gemessene relative Expression von 0,96 an EDD 11 und 0,67 an EDD 14 bestätigte die zuvor genannten Ergebnisse. Wang et al. konnten in einem Seiden-Gel-Scaffold *in vitro* drei Tage nach der Inkubation mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen eine relative HIF-Expression von circa 0,5 feststellen, was der in dieser Arbeit im CAM-Assay an EDD 11 gemessenen Expression von 0,54 nahe kam (268). Eine mögliche Ursache für die höhere Expression von HIF-1 α in den CM könnte die bereits beschriebene stärkere Stimulation von VEGF durch die Matrices sein, welche indirekt die Expression von HIF-1 α fördert.

Die in dem Hühnerei zwischen EDD 10 und EDD 14 relevanten Immunzellen sind Heterophile, ein vogelartiges Äquivalent zu menschlichen Neutrophilen, und Zellen der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie (200, 222). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind zinkabhängige Endopeptidasen, deren Produktion vor allem durch die letztgenannte Zelllinie erfolgt. Sie unterstützen die Degradation und den Umbau der extrazellulären Matrix und werden in sechs Klassen unterteilt, die sowohl hemmend als auch stimulierend auf die Angiogenese wirken können (269-271). Zijlstra et al. konnten zeigen, dass die Expression von MMP-13 unter den in dem CAM-Assay identifizierten MMPs am stärksten mit dem Beginn der Angiogenese korreliert (200). Die zu der Klasse der Kollagenasen gehörende MMP-13 wurde in Hühnerembryonen als direkter Förderer der Neovaskularisation identifiziert und trägt durch ihre proteolytische Aktivität maßgeblich zu dem Aussprossen von Gefäßen bei (270, 272, 273). Kudo et al. konnten zeigen, dass die auch als Kollagenase 3 bekannte MMP-13 die Sekretion von VEGF in Fibroblasten und Endothelzellen *in vitro* stimuliert und somit sowohl direkt als auch indirekt auf die Neovaskularisation einwirken kann (270). Während MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 Seidenfibroin proteolytisch zersetzen können (274, 275), scheint das Faserprotein jedoch kein Substrat von MMP-13 zu sein (276).

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, dass das Enzym an EDD 11 in der CM im Vergleich zu der SFM nahezu dreifach höher exprimiert wurde. Bis EDD 14 sank die Expression des Enzyms in der CM, während sie in der SFM leicht anstieg. Ein Rückgang der MMP-13-Expression zeigte sich auch in der Studie durch Sax et al. auf der unbehandelten CAM (215). In der Mucoderm®-CM beobachteten Heimes et al. einen ebenso starken Abfall der Expression zwischen den beiden Versuchstagen (54). Luttikhuisen et al. hingegen registrierten bei in Mäusen subkutan implantierten und aus bovinen Kollagenfasern hergestellten CM bis zu dem siebten Tag nach der Implantation eine konstant niedrige Expression, welche erst zwischen Tag 7 und Tag 21 anstieg (277). Die höhere Expression von MMP-13 in den CM lässt sich dadurch erklären, dass Kollagen Typ 1, wesentlicher Bestandteil

der Mucoderm®, im Gegensatz zu SF ein Substrat der MMP-13 darstellt (276, 278). Nach der Applikation der CM scheint die Anzahl an Kollagenasen hochreguliert zu werden, um das Fremdmaterial abzubauen.

Um ein Gleichgewicht zwischen Neovaskularisation und Degradation der Matrices zu erreichen, ist die Funktion der Makrophagen von besonderer Bedeutung. Diese werden in die Subtypen M1- und M2-Makrophagen unterteilt, wobei letzteren eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese zugeschrieben wird. M1-Makrophagen hingegen werden bislang vor allem mit einem proinflammatorischen und antiangiogenen Einfluss in Verbindung gebracht (221, 279, 280) und produzieren die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), die auch als NOS2 bezeichnet wird. NOS2 wirkt bei Hühnern als Entzündungsmediator (281) und wird als proinflammatorischer Marker verstanden (282, 283). Das Enzym ist ein entscheidender Bestandteil der Abwehr von Pathogenen und wird während der Phagozytose und Inflammation stärker exprimiert (284-286). Das durch das Enzym synthetisierte NO ist an einer Vielzahl pathologischer Prozesse wie Entzündungen und Zellschäden beteiligt und gilt als endogener antiangiogener Mediator (283, 287, 288).

Aufgrund der starken Streuung der Messwerte für die Expression von NOS2 war eine Interpretation der Ergebnisse in dieser Arbeit nur eingeschränkt möglich. Dennoch konnten sowohl Pipili-Synetos et al. als auch Sax et al. mittels qPCR in dem CAM-Assay zeigen, dass die Expression von NOS2 ab EDD 8 stark anstieg und ihr Maximum an EDD 11 erreichte (215, 287), was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigte. Beide untersuchten die Expression jedoch auf unbehandelten Eiern und konnten dabei an EDD 11 und 14 eine niedrigere Expression als in den in dieser Arbeit untersuchten Membranen mit CM und SFM feststellen. Heimes et al. ermittelten in der Mucoderm®-CM an EDD 11 eine deutlich höhere Expression von 40,77, während in dieser Studie eine Expression von 5,67 gemessen wurde (54). An EDD 14 fiel die relative Expression des Faktors in beiden Studien stark ab. In der Studie von Heimes et al. wurde ein Wert von 1,84 gemessen, während in der vorliegenden Arbeit ein Wert von 0,94 ermittelt wurde. Die festgestellten Unterschiede lassen sich auf die bereits beschriebene starke Schwankung der Ct-Werte in dieser Arbeit zurückführen. Es ist ebenfalls denkbar, dass die Interaktion zwischen CM und CAM durch den Flüssigkeitsfilm weniger intensiv war als in der Arbeit von Heimes et al. Cho et al. konnten mittels Western Blot bei Ratten, die nach der Laminektomie mit einer Seidenfibroinlösung behandelt wurden, eine verminderte Expression des proinflammatorischen Markers im Vergleich zu der Anwendung ohne Matrices nachweisen (286). Dieses Ergebnis bestätigt die in dieser Arbeit beobachtete gute immunologische Toleranz von Seidenfibroin.

5.3 Diskussion der Biofunktionalisierung von Matrices

In dieser Arbeit wurde neben der Untersuchung der Neovaskularisation und Immunreaktion in nativen Matrices auch der Einfluss der Biofunktionalisierung mit i-PRF und SMP auf CM und SFM untersucht. Hierbei ist eine suffiziente Hydratation der Matrices von entscheidender Bedeutung. Für die Mucoderm®-CM wird laut aktueller Studienlage eine Zeitspanne von 10–20 min benötigt (60), während entsprechende Daten für die SFM fehlen. Al-Maawi et al. konnten bei einer 15-minütigen Rehydrierungsdauer feststellen, dass in der Mucoderm®-CM, im Gegensatz zu der Mucograft®-CM, nur die oberflächlichen Schichten mit i-PRF interagierten und die Matrix somit nur partiell von dem Thrombozytenkonzentrat penetriert wurde (248). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass die nur etwa 200 µm dicke SFM tendenziell schneller rehydrierte als die 1,2–1,7 mm dicke Mucoderm®-CM (289). Mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,35 mg war die SFM zudem wesentlich leichter als die 10,62 mg schwere CM (289). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass die CM ein Volumen von 19,64 µl speichern konnte, wohingegen die SFM lediglich ein 20-fach geringeres Speichervolumen von 0,74 µl aufwies. Dies könnte die Auswirkung der für die Biofunktionalisierung verwendeten Substanzen auf die Neovaskularisation *in ovo* beeinflussen und die geringen Divergenzen bei der Neovaskularisation zwischen den SF-Gruppen erklären.

5.3.1 Einfluss von i-PRF auf die Neovaskularisation und Inflammation

Insbesondere flüssige Eigenblutkonzentrate sind für das *Tissue Engineering* von großem Interesse. Das autologe Blutkonzentrat PRF wird für die Rehydrierung von Matrices verwendet und hat gegenüber anderen Adjuvantien den Vorteil, dass die Herstellung *chairside* erfolgen kann. Zudem ist aufgrund des autologen Ursprungs keine nachteilige immunologische Reaktion zu erwarten. Für die Herstellung von i-PRF stehen verschiedene Protokolle zur Verfügung. Die Zentrifugationszeit der mit venösem Blut gefüllten Kunststoffvakuetten variiert zwischen 3 und 8 min, während die Umdrehungszahl zwischen 600 und 2400 Umdrehungen pro Minute liegt (149, 290, 291). In dieser Arbeit wurde das Blut von einem gesunden Probanden entnommen und für 7 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Die Untersuchung der Neovaskularisation in den biofunktionalisierten Matrices erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Sowohl auf den mit i-PRF rehydrierten CM als auch auf den gleich behandelten SFM konnten bereits ab EDD 10 Gefäße detektiert werden. Im Gegensatz zu den SFM schien die Rehydrierung mit i-PRF bei den CM die Neovaskularisation der Matrix überhaupt erst zu ermöglichen. In sämtlichen Gruppen wurden an EDD 12 und EDD 14 hinsichtlich des vaskularisierten Anteils der Matrixfläche, der Gefäßdicke und der Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte die höchsten Werte in der mit i-PRF biologisierten CM festgestellt (Abbildung 10Abbildung 13Abbildung 15). Darüber hinaus wies die CM+iPRF-Gruppe an

EDD 14 eine signifikant größere vaskularisierte Matrixfläche, Gesamtgefäßdichte und Anzahl an Gefäßverzweigungspunkte als die entsprechend behandelte SFM auf. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie legen nahe, dass die Biofunktionalisierung von CM mit i-PRF *in ovo* zu einer deutlichen Steigerung der Vaskularisation führt.

Auch in anderen Studien konnte ein stimulativer Einfluss von PRF auf die Neovaskularisation im CAM-Assay beobachtet werden (159, 162). Ratajczak et al. untersuchten PRF-Matrices in dem Assay und konnten im Vergleich zu der unbehandelten CAM bestätigen, dass das Thrombozytenkonzentrat die Neovaskularisation *in ovo* induziert (159). In einer weiteren Studie wurden die CM Collprotect®, Jason® und Mucoderm® mit A-PRF biofunktionalisiert und auf Angiogenese im CAM-Assay untersucht (162). Die biologisierte Mucoderm®-CM wies im Vergleich zu der unbehandelten Matrix eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen pro mm², Gefäßdichte und Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten auf. Blatt et al. detektierten in der mit PRF behandelten Mucoderm®-CM durchschnittlich 29 Gefäßverzweigungspunkte pro mm² und eine prozentuale Gefäßdichte von 31 Prozent. Diese Ergebnisse bekräftigen die in dieser Arbeit festgestellte proangiogene Wirkung von mit PRF rehydrierter Mucoderm®-CM auf die Neovaskularisation. Die im Vergleich zu dieser Arbeit beobachteten höheren Messwerte lassen sich durch die softwaregesteuerte Auswertung in der Arbeit von Blatt et al. erklären. Der proangiogene Effekt des Thrombozytenkonzentrates scheint sich zwischen unterschiedlichen CM stark zu unterscheiden. In einer anderen Studie wurde anhand von mit A-PRF rehydrierten CM porcinen (Bio-Gide®) und bovinen Ursprungs (Symbios®) in dem *yolk sac membrane assay* 72 Stunden nach der Applikation der Matrices keine signifikant höhere Gefäßanzahl und Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten zwischen den biologisierten und den nativen CM festgestellt (292). Auch Schröger et al. beobachteten bei der Biofunktionalisierung der porcinen CM NovoMatrix® mit i-PRF und A-PRF im CAM-Assay keine signifikante Stimulation der Neovaskularisation durch die Kombination von PRF mit der CM (233). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlich starke Neovaskularisation in den CM könnte in variierenden Materialeigenschaften wie Dicke, Zusammensetzung, Porengröße und der damit verbundenen Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie den unterschiedlichen Auflagezeiten und Modellen (CAM-Assay, *yolk sac membrane assay*) liegen (233, 244). Die Verwendung von CM, welche eine vollständige Penetration mit i-PRF ermöglichen, könnte zu einer weiteren Verbesserung der Neovaskularisation führen (248).

Die mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelten Werte für die Kombination von SFM mit i-PRF wiesen in diesem Versuch lediglich geringfügige Abweichungen gegenüber der Kontrollgruppe auf. Weder an EDD 12 noch an EDD 14 waren wesentliche Unterschiede zwischen der SF+iPRF-Gruppe und der SF-Kontrollgruppe in Bezug auf die vaskularisierte Matrixfläche, die Gefäßdichte und die Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten festzustellen, was möglicherweise auf die vergleichsweise geringe Speicherkapazität der SFM zurückzuführen

ist. Diese Resultate legen nahe, dass SFM eine, von der Biofunktionalisierung unabhängige, stark proangiogene Wirkung besitzt.

Derzeit liegen nur wenige vergleichbare Daten zu der Neovaskularisation von mit PRF biofunktionalisierten Seidenmatrices vor. Samal et al. konnten *in vitro* zeigen, dass der Zusatz von Fibrinogen zu SFM die Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten erhöht (263). In einer Studie an Mäusen wiesen Bai et al. für die Kombination eines subkutan applizierten Hydrogels, bestehend aus dem von dem Seidenspinner gewonnenen Sericin, mit i-PRF einen proangiogenen und antiinflammatorischen Effekt nach (293). Auch in einem mit VEGF und *bone morphogenetic protein* (BMP) beladenem Hydrogel aus Seidenfibroin, das bei der Sinusbodenelevation in Kaninchen untersucht wurde, konnte eine Stimulation der Angiogenese nachgewiesen werden (294). Luo et al. untersuchten in dem CAM-Assay SFM mit aktiver Koexpression der auch in PRF vorhandenen Angiogenesefaktoren VEGF und Ang-1 durch Plasmidtransfektion (133). Die untersuchten Matrices wiesen im Vergleich zu der unbehandelten SFM eine mehr als doppelt so hohe vaskularisierte Matrixfläche von 40 Prozent auf. Im Gegensatz dazu konnten Bienert et al. in mit VEGF biofunktionalisierten SFM keine Erhöhung der Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten im Vergleich zu der unbehandelten SFM feststellen (295). Auch in dieser Arbeit wurde ein proangiogener Effekt von i-PRF auf SFM nicht bestätigt. Die geringe Speicherkapazität der Matrix für flüssige Substanzen wie i-PRF könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass sich die Neovaskularisation in der SF+iPRF-Gruppe und der SF-Kontrollgruppe kaum unterschied.

Mittels qPCR wurden an beiden Tagen nur geringfügige Unterschiede in der relativen Expression der Gene VEGF, HIF-1 α , MMP-13 und NOS2 zwischen der CM-Kontrollgruppe und der CM+iPRF-Gruppe festgestellt (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Auch bei den SFM zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression der vier Zielgene. Die an EDD 11 im Vergleich zu der SF-Kontrollgruppe beobachtete leicht höhere Expression von HIF-1 α und MMP-13 in der mit i-PRF rehydrierten SFM könnte in Zusammenhang mit der in der Fluoreszenzmikroskopie besonders früh aufgetretenen Neovaskularisation in dieser Gruppe stehen. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass i-PRF, im Gegensatz zu SMP, eine frühe Induktion der Vaskularisation bewirkt, was insbesondere im Fall der CM auch mit einer ausgeprägten, fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren, Gefäßdurchbauung einhergeht. Diese Beobachtung könnte durch die spezifische, für eine Gefäßneubildung vulnerable Zeit der CAM-Entwicklung an EDD 11 gegenüber späteren Entwicklungsstadien erklärt werden.

In der Literatur finden sich nur wenige Studien, die sich mit der Expression der Wachstumsfaktoren in mit PRF biofunktionalisierten CM und SFM befassen. Blatt et al. konnten mittels ELISA 24 Stunden nach Applikation von mit A-PRF rehydrierten Mucoderm®-

CM eine signifikant höhere VEGF-Expression gegenüber der unbehandelten Matrix feststellen (246). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Komplexbildung zwischen VEGF und Kollagen sein, die zu einer verlängerten Freisetzung des Wachstumsfaktors führt (53). Wie auch in dieser Studie, wurden jedoch bereits 96 Stunden und 168 Stunden nach der Applikation keine wesentlichen Unterschiede bei der Expression der beiden Matrices mehr festgestellt. Auch Vokurka et al. konnten mittels qPCR keine signifikanten Unterschiede in der Expression von VEGF zwischen mit PRP, mit PRF und mit NaCl rehydrierten CM vom Typ Mucograft® in oralen Mukosadefekten bei Kaninchen feststellen (40). Darüber hinaus zeigte sich klinisch in Knochendefekten, die mit einer CM bedeckt und mit leukozyten- und plättchenreichem PRF (L-PRF) gefüllt waren, das durch 12-minütige Zentrifugation bei 2700 rpm gewonnen wurde, eine gleich hohe Expression von VEGF wie ohne die Kombination von L-PRF und Matrix (296). Die VEGF-Expression scheint demnach nicht allein für eine adäquate Neovaskularisation maßgeblich zu sein.

In einer mit Fibringel rehydrierten SFM konnten Samal et al. *in vitro* mittels RT-qPCR sieben Tage nach der Rehydrierung eine signifikant höhere VEGF-Expression als in der unbehandelten Matrix feststellen (263). Bienert et al. wiesen an mit dem Wachstumsfaktor VEGF biofunktionalisierten SFM einen Tag nach der Inkubation mit Makrophagen *in vitro* eine höhere Freisetzung von VEGF nach als in der unbehandelten SFM (295). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, was möglicherweise auf die geringe Speicherkapazität der SFM und die Durchführung des Versuchs *in vivo* zurückzuführen ist. Um eine längere Wirkdauer und stärkere Expression von VEGF auch in SFM zu erzielen, könnten die von Luo et al. entwickelten Komplexe aus Seidenfibroin, kationisiertem Seidenfibroin, Polyethylenimin und den Wachstumsfaktoren VEGF sowie Ang-1 dienen (133).

Die Expression der Wachstumsfaktoren HIF-1 α , MMP-13 und NOS2 in mit PRF biofunktionalisierten CM und SFM war bislang Gegenstand nur weniger Studien. *In vitro* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die in PRF enthaltenen Wachstumsfaktoren TGF- β und *platelet-derived growth factor* (PDGF) die Expression von HIF-1 α (297, 298) und MMP-13 (299, 300) auf mehreren an der Gewebereparatur beteiligten Zellen steigern können. Auch Krismer et al. zeigten *in vitro*, dass die Expression von MMP-13 in mit PRP rehydrierten Kollagen-*Scaffolds* mit einer zunehmenden Menge des Thrombozytenkonzentrats ansteigt (301). Die in dieser Arbeit in beiden mit i-PRF biofunktionalisierten Materialien beobachtete im Vergleich zu den Kontrollgruppen höhere Expression der Endopeptidase an EDD 11 könnte in Zusammenhang mit der Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch PRF stehen und möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die proteolytische Aktivität von MMP-13 in den bereits früh vaskularisierten Matrices an den späteren EDD nicht mehr erforderlich ist. Demgegenüber steht die Erkenntnis, dass die Expression des proinflammatorischen Markers NOS2 durch die beiden Wachstumsfaktoren reduziert wird (302, 303). Diese Ergebnisse

lassen sich durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigen, zumal mittels qPCR weder an EDD 11 noch an EDD 14 signifikante Unterschiede zwischen den mit i-PRF biofunktionalisierten und den Matrices der Kontrollgruppe festgestellt wurden.

5.3.2 Einfluss von Schmelz-Matrix-Proteinen auf die Neovaskularisation und Inflammation

Die Kombination von SMP mit CM und SFM zeigte in dieser Arbeit je nach Matrixmaterial unterschiedliche Ergebnisse. Während in der mit SMP behandelten SFM bereits ab EDD 12 Gefäße auf der Matrix nachgewiesen wurden und an EDD 14 93 Prozent der Matrices vaskularisiert waren, konnte in der CM+SMP-Gruppe bis zu dem Versuchsende keine Gefäßeinsprossung und Adhäsion an die CAM beobachtet werden. Dementsprechend zeigte die SF+SMP-Gruppe gegenüber der mit SMP biofunktionalisierten CM sowohl an EDD 12 als auch an EDD 14 höhere Werte für den Anteil vaskularisierter Matrices, die Gefäßdichte und die Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten. Im Vergleich zu der SF-Kontrollgruppe konnte für die drei fluoreszenzmikroskopischen Parameter weder an EDD 12 noch an EDD 14 ein signifikanter Unterschied zu der mit SMP biofunktionalisierte SFM festgestellt werden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Möglichkeiten und Verfahren für den Einsatz von SMP in der Zahnmedizin. Die Proteine scheinen einen positiven Effekt auf die Angiogenese (185) und die Wundheilung (188, 189) zu haben und die Expression von Wachstumsfaktoren zu beeinflussen (171). Auch in dem CAM-Assay konnte eine Stimulation der Angiogenese auf mit SMP behandelten Gelatine-*Scaffolds* beobachtet werden (184). Interessanterweise wurde festgestellt, dass der proangiogene Effekt lediglich bei geringen SMP-Konzentrationen auftritt und mit zunehmender Massenkonzentration von 3 ng/µl auf 25 ng/µl abnimmt. Bei höheren Konzentrationen ließ sich daher kaum noch ein Unterschied zu der mit NaCl rehydrierten Kontrollgruppe feststellen. In dieser Arbeit wurde SMP mit NaCl verdünnt und entsprechend den an der Mucoderm®-CM durchgeführten Voruntersuchungen von Park et al. in einer niedrigeren Massenkonzentration von 0,025 ng/µl verwendet (190). Dies könnte den kaum messbaren Effekt der biofunktionalisierten Matrices auf die Neovaskularisation in SFM und CM erklären.

In Kombination mit CM konnten in mehreren Studien die Präsenz von Gefäßen in den Randbereichen der Matrix nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Studien, die sich auch auf den die Matrix umgebenden Bereich beziehen, wurden in dieser Arbeit jedoch lediglich Matrices als vaskularisiert gewertet, sofern diese auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweislich Gefäße auf, in oder unter der Matrix selbst aufwiesen. Die unterschiedliche Auswertung und Interpretation der Messwerte könnte erklären, weshalb in anderen Studien eine Vaskularisation der mit SMP rehydrierten CM Mucograft® und der von der Firma BioCore Medical Technologies hergestellten CM beobachtet wurde (40, 191). Yuan et al. wiesen in Mäusen mittels histologischer Färbungen eine höhere

Anzahl an Blutgefäßen und Endothelzellen in den Übergangsbereichen der mit SMP rehydrierten und subkutan implantierten CM zu dem Bindegewebe nach (191). Die Blutgefäße in dem Randbereich infiltrierten jedoch, wie auch in dieser Studie beobachtet, nicht die CM selbst. Des Weiteren konnte in mehreren Studien ein ausgeprägter Saum aus mononukleären Zellen um die bereits erwähnten mit SMP behandelten CM beobachtet werden, der in den unbehandelten Matrices je nach Studie nicht oder nur in geringerem Ausmaß auftrat und als Anzeichen einer inflammatorischen Reaktion auf die bioaktive Substanz gewertet werden könnte (40, 191). Vokurka et al. stellten bei in Kaninchen implantierten, mit SMP rehydrierten Mucograft®-CM eine im Vergleich zu den unbehandelten Matrices verlangsamte Vaskularisation fest (40). Die beobachtete inflammatorische Reaktion auf die Kombination von CM mit SMP ist möglicherweise auf die durch SMP beschleunigte Degradation von Kollagen Typ 1 zurückzuführen (304). Der Abbau der Matrix könnte eine Inflammation verursachen, welche die mangelnde Neovaskularisation in der CM+SMP-Gruppe erklären würde.

Um die Wirkung von SMP auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse für die an der Angiogenese und Inflammation beteiligten Faktoren durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei den mit SMP biofunktionalisierten CM an EDD 11 und EDD 14 tendenziell eine leicht niedrigere Expression von VEGF und HIF-1 α als in der Kontrollgruppe. Bei den SFM wurde an beiden Tagen in der SF+SMP-Gruppe eine leicht niedrigere Expression von VEGF festgestellt als in der SF-Kontrollgruppe. Für HIF-1 α , MMP-13 und NOS2 konnte an EDD 14 hingegen eine höhere Expression als in der SF-Kontrollgruppe beobachtet werden. Zwischen den biologisierten Matrices und der jeweiligen Kontrollgruppe wurde an keinem der beiden EDD signifikante Expressionsunterschiede für die proangiogenen Marker VEGF, HIF-1 α und MMP-13 sowie den Inflammationsmarker NOS2 festgestellt. Da sich auch histologisch keine Anzeichen von Entzündung zeigten, wurde in dieser Arbeit von einer immunologischen Toleranz der mit SMP behandelten Matrices ausgegangen.

Bisher wurden der Einfluss von SMP auf die Expression von Wachstumsfaktoren lediglich in wenigen Studien untersucht (40). *In vitro* konnten Jung et al. durch die Anwendung des Gels an Parodontalligamentzellen (PDL-Zellen) eine Stimulation der VEGF-Expression feststellen (305), die auch in weiteren Studien an Osteoblasten (306, 307) und Fibroblasten (230) bestätigt wurde. Vokurka et al. implantierten mit SMP rehydrierte CM (Mucograft®) in die orale Mukosa von Kaninchen und verglichen die Expression von VEGF mit einer unbehandelten SFM (40). Wie auch in der vorliegenden Arbeit, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Darüber hinaus registrierten Park et al. *in vitro* auf mit SMP behandelten CM eine gesteigerte Proliferation der für die Produktion von VEGF wichtigen Endothelzellen im Vergleich zu unbehandelten Mucoderm®-CM (190). Song et al. konnten *in vitro* nachweisen, dass auch die Expression von

HIF-1 α durch SMP stimuliert wird (308). Dies könnte erklären, weshalb die Expression von HIF-1 α zwischen EDD 11 und EDD 14 im Gegensatz zu den anderen Gruppen leicht anstieg. In mehreren *in vitro*-Studien wurde festgestellt, dass die Expression von MMP-13 hingegen nicht durch SMP beeinflusst wird (179, 304, 309), was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden konnte. In Bezug auf den proinflammatorisch wirkenden Faktor NOS2 konnten Yamamichi et al. *in vitro* zeigen, dass Amelogenin, welches 90 Prozent der SMP in Emdogain® ausmacht, die Expression des Faktors reduziert und somit antiinflammatorisch wirken könnte (310). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verhältnismäßig niedrige NOS2-Expression in der mit SMP biologisierten CM steht im Einklang mit den Ergebnissen von Yamamichi et al.. Die Hypothese, dass eine inflammatorische Reaktion die Vaskularisation in der CM+SMP-Gruppe verhindert, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Studie nicht bestätigen.

5.4 Ausblick auf mögliche therapeutische Anwendungen

Die in dieser Studie untersuchten SFM stellen eine mögliche Alternative zu autologen Transplantaten in der Weichgeweberegeneration dar. Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, weisen sie, unabhängig von ihrer Biofunktionalisierung, gegenüber herkömmlichen, unbehandelten CM den Vorteil einer konstant starken Vaskularisation auf. Darüber hinaus scheinen sie immunologisch inert zu sein. In diesem Zusammenhang verglichen Smeets et al. bereits SFM und die CM Bio-Gide®, die im Rahmen der GBR in Kaninchen implantiert wurden, und konnten feststellen, dass die CM bereits 10 Wochen nach dem Einbringen vollständig resorbiert war (105). In Abhängigkeit von der Struktur, der Zusammensetzung und dem Herstellungsprozess der Matrix variiert die Resorptionsdauer von nativen SFM zwischen 2 und 6 Monaten (107, 311). Diese Dauer kann durch Biofunktionalisierung mit unterschiedlichen bioaktiven Substanzen verkürzt oder verlängert werden (105, 304). Die im Vergleich zu der verwendeten Mucoderm®-CM deutlich dünnere SFM könnten klinisch vor allem in der GBR von Nutzen sein (242, 312). Gegenüber CM weisen SFM den Vorteil einer langsameren Resorption auf, wodurch sie Knochenersatzmaterialien länger in dem Defekt stabil halten und vor äußeren Einflüssen schützen können (105). Für die Verbreiterung der keratinisierten Gingiva, die Deckung von Rezessionen und die Verdickung des Weichgewebes scheint die Matrix in ihrer derzeitigen Form jedoch zu instabil und dünn zu sein. Darüber hinaus lässt sich anhand dieser Arbeit ableiten, dass die Biofunktionalisierung der verwendeten dünnen SFM nahezu keinen Einfluss auf die Neovaskularisation besitzt. Eine voluminösere Matrix könnte größere Mengen an proliferationsfördernden Substanzen speichern und an das umliegende Gewebe abgeben.

In zukünftigen Studien wäre daher der Vergleich von SFM und CM mit einem ähnlichen Volumen und mit entsprechend gleichem Indikationsrahmen sinnvoll. Seok et al. konnten

bereits zeigen, dass eine Verbreiterung der SFM von 0,01 mm auf 0,5 mm mit einer verbesserten Stabilität einhergeht und in der GBR zu einem vermehrten Knochenaufbau in dem Scheitelbein von Kaninchen führt (313). Um die Problematik der Biofunktionalisierung von SFM mit i-PRF zu umgehen, wäre außerdem die Verwendung von stabileren Formen des Thrombozytenkonzentrats wie A-PRF/PRP denkbar, die in Kombination mit CM bereits gute Ergebnisse zeigten (246). Des Weiteren sollten verschiedene Modifikationen der 3D-druckbaren Matrices vorgenommen werden, um deren Stabilität zu erhöhen und die Resorptionsdauer zu verlängern. Smeets et al. erzielten diesbezüglich bereits vielversprechende Ergebnisse für die Kombination von SF mit Magnesium (314) und die Modifikation der Matrices mit β -Tricalciumphosphat und Hydroxyapatit (105). Auch durch die Verwendung von Spinnenseide könnte die mechanische Belastbarkeit und Elastizität der Matrices verbessert werden (315, 316). Diese Anpassungen könnten insbesondere für die Anwendung von SFM in der GBR und der Rezessionsdeckung von großem Nutzen sein.

Die in dieser Studie untersuchten CM gelten in der Weichgewebechirurgie als vielversprechende Alternative zu autologen Transplantaten. In Bezug auf die Verbreiterung der keratinisierten Gingiva erzielten sie bereits vergleichbare ästhetische und funktionelle Ergebnisse zu freien Schleimhauttransplantaten und werden darüber hinaus auch in anderen Indikationen eingesetzt (18). Durch die Biofunktionalisierung des Materials lassen sich die biologischen Eigenschaften der Matrix optimieren. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, kann die Kombination der Matrices mit i-PRF zu einer gesteigerten Neovaskularisation führen, was wiederum eine verbesserte Integration des Materials bedingt. Die schnelle Resorption und die damit einhergehende Schrumpfung der Matrices limitieren jedoch den klinischen Einsatz. Um sowohl eine suffiziente Integration des Fremdmaterials als auch eine ausreichende und langfristige Volumenstabilität zu ermöglichen, könnten speziell hierfür entwickelte volumenstabile CM (26, 27) dienen, die im Gegensatz zu der in dieser Arbeit verwendeten Mucoderm®-CM aus quervernetzten Kollagenfasern bestehen. Diese Matrices können insbesondere bei der Weichgewebeverdrückung (317) eingesetzt werden und zeigten in Kombination mit i-PRF bereits vielversprechende klinische Ergebnisse in der Deckung von Rezessionen (318, 319). Für die Verbreiterung der keratinisierten Gingiva und die Verdickung des Weichgewebes könnten auch Matrices aus kollagenbeschichteten Seidenfibroinfasern von Nutzen sein, da sie die Vorteile beider Materialien vereinen und die Wundheilung positiv beeinflussen können (320, 321).

Während die Biofunktionalisierung mit i-PRF einen deutlichen positiven Einfluss auf die Neovaskularisation zeigte, konnte ein solcher Effekt bei der Applikation von SMP nicht beobachtet werden. Trotz der erfolgreichen Anwendung des Gels Emdogain® in der regenerativen Parodontalchirurgie (182) kann, auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen präklinischen Daten, die Kombination mit CM zur Verbesserung der Vaskularisation nicht

empfohlen werden. In zukünftigen Studien sollten daher auch andere Formen von SMP zur Biofunktionalisierung untersucht werden. Die hohe Viskosität des Gels, welche eine Verdünnung desselben im Rahmen dieser Studie erforderlich machte, könnten die Wirkung der Substanz abgeschwächt haben. In einer durch Jung et al. durchgeführten Studie wurde eine Flüssigkeit entwickelt, bei der die Trägersubstanz des Gels durch Essigsäure ersetzt wurde (322). Im Vergleich zu der Gelform konnte in Ratten eine erhöhte Anzahl an eingewachsenen Gefäßen in der mit der SMP-Flüssigkeit rehydrierten und subkutan implantierten Mucoderm®-CM nachgewiesen werden. Auch das flüssige SMP-Trägersystem Osteogain® zeigte in Kombination mit Kollagenschwämmen *in vitro* bereits vielversprechende Ergebnisse (323) und könnte eine Alternative zu dem in dieser Studie verwendeten Emdogain® darstellen.

6 Zusammenfassung

Bei einer zunehmenden Zahl oraler regenerativer Eingriffe in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde steigt auch die Nachfrage nach Ersatzmaterialien zur Hart- und Weichgewebeaugmentation. Gegenüber autologen Transplantaten entbehren Fremdmaterialien der Notwendigkeit einer Transplantatentnahme, womit eine entsprechende Morbidität für den Patienten reduziert werden kann. Zudem ist die Anwendung solcher Matrices mit einer kürzeren Operationsdauer verbunden. Für eine optimale Integration des Fremdmaterials in das umgebende Gewebe sind eine ausreichende Vaskularisation und die immunologische Toleranz von entscheidender Bedeutung. Zurzeit erhältliche Ersatzmaterialien weisen jedoch häufig eine unzureichende Ästhetik, immunologische Toleranz oder starke Schrumpfung auf. Insofern besteht der Bedarf an einem Material, welches den hohen Anforderungen in der Weichgewebschirurgie gerecht wird. In diesem Zusammenhang scheint Seidenfibroin eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Materialien darzustellen.

Im Rahmen des *Tissue Engineering* werden die biologischen Eigenschaften von Ersatzmaterialien durch die Biofunktionalisierung mit proliferationsfördernden Substanzen optimiert. Als besonders vielversprechend haben sich in den letzten Jahren autologe Thrombozytenkonzentrate und Schmelz-Matrix-Proteine herausgestellt. Beide Materialien haben in Tierversuchen bereits einen positiven Einfluss auf die Wundheilung gezeigt. Ziel dieser Arbeit war es daher die Neovaskularisation und immunologischen Toleranz von CM und SFM zu vergleichen und, in einem zweiten Schritt, den Einfluss der Biologisierung mit den Substanzen i-PRF und SMP zu untersuchen.

Hierzu wurde das bereits für diese Fragestellung etablierte CAM-Assay genutzt. Nach Bildung von insgesamt sechs Versuchsgruppen (SFM und CM jeweils rehydriert in Kochsalz, i-PRF

und SMP) wurden mittels *in-vivo* Fluoreszenzmikroskopie der vaskularisierte Anteil der Matrices, die Gefäßdichte und die Anzahl an Gefäßverzweigungsstellen bestimmt. Ergänzt wurde das visuelle Messverfahren durch die Quantifizierung der Genexpression der proangiogenen Faktoren VEGF, HIF-1 α und MMP-13, sowie des Inflammationsfaktors NOS2 mittels qPCR. Die histologische Aufarbeitung der Proben erfolgte zudem zur exemplarischen Darstellung der in die Matrices eingewachsenen Gefäße.

Während bei den CM ausschließlich in der mit i-PRF biofunktionalisierten Gruppe Gefäße auf der Matrix detektiert wurden, zeigten SFM unabhängig von ihrer Biofunktionalisierung eine konstant starke Vaskularisation. Die Biofunktionalisierung der SFM mit i-PRF und SMP besaß demnach weder einen wesentlichen Einfluss auf die Gefäßeinsprossung noch auf die immunologische Toleranz. Dementgegen führte die Rehydrierung der CM mit SMP und Kochsalz zu einer deutlich reduzierten Vaskularisation. Es wurden keine Anzeichen von Inflammation oder andere relevante Unterschiede der Expression der Gene HIF-1 α , VEGF, MMP-13 und NOS2 zwischen den Versuchsgruppen beobachtet.

In Übereinstimmung mit den bisherigen Studien bestätigen die Ergebnisse das hohe angiogene Potential und die gute immunologische Toleranz von SFM wie auch die positive biologische Wirkung des autologen Thrombozytenkonzentrats i-PRF. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die 3D-gedruckten Matrices eine sinnvolle Erweiterung des bisherigen Spektrums möglicher Ersatzmaterialien in der Hart- und Weichgeweberegeneration darstellen. Es bedarf jedoch weiterführender Studien um den Einfluss des Matrixvolumens auf die Biofunktionalisierung sowie den möglichen Einsatz in verschiedenen Indikationen der oralen Regeneration eruieren zu können.

Literaturverzeichnis

1. Pabst A, Kämmerer PW. Membrananwendungen in der ZMK-Heilkunde: Georg Thieme Verlag KG; 2020 2020/07/16. 199-210 p.
2. Jung RE, Ioannidis A, Hämmerle CHF, Thoma DS. Alveolar ridge preservation in the esthetic zone. *Periodontol 2000*. 2018;77(1):165-75.
3. Bassetti RG, Stähli A, Bassetti MA, Sculean A. Soft tissue augmentation procedures at second-stage surgery: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2016;20(7):1369-87.
4. Wolff J, Farré-Guasch E, Sándor GK, Gibbs S, Jager DJ, Forouzanfar T. Soft Tissue Augmentation Techniques and Materials Used in the Oral Cavity: An Overview. *Implant Dentistry*. 2016;25(3):427-34.
5. Tavelli L, Barootchi S, Avila-Ortiz G, Urban IA, Giannobile WV, Wang HL. Peri-implant soft tissue phenotype modification and its impact on peri-implant health: A systematic review and network meta-analysis. *J Periodontol*. 2021;92(1):21-44.
6. Thoma DS, Naenni N, Figuero E, Hämmerle CHF, Schwarz F, Jung RE, et al. Effects of soft tissue augmentation procedures on peri-implant health or disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29 Suppl 15:32-49.
7. Rocuzzo M, Sculean A. Das periimplantäre Weichgewebe: Integration und Behandlung. Donos N, Barter S, Wismeijer D, editors. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH; 2022.
8. Lin GH, Chan HL, Wang HL. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review. *J Periodontol*. 2013;84(12):1755-67.
9. Grischke J, Karch A, Wenzlaff A, Foitzik MM, Stiesch M, Eberhard J. Keratinized mucosa width is associated with severity of peri-implant mucositis. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2019;30(5):457-65.
10. Schwarz F, Ramanauskaite A. It is all about peri-implant tissue health. *Periodontol 2000*. 2022;88(1):9-12.
11. Zigdon H, Machtei EE. The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(4):387-92.
12. Zafiropoulos GG, Al-Asfour AA, Abuzayeda M, Kačarević ZP, Murray CA, Trajkovski B. Peri-Implant Mucosa Augmentation with an Acellular Collagen Matrix. *Membranes (Basel)*. 2021;11(9).
13. S3-Leitlinie (Langfassung) Periimplantäre Weichgewebsaugmentation [Internet]. Letzte Aktualisierung: 31.05.2021. Version 1. Zitiert am 05.10.2023: Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde e.V. (DGZMK), Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich e.V. (DGI); 2021.
14. Schmitt CM, Tudor C, Kiener K, Wehrhan F, Schmitt J, Eitner S, et al. Vestibuloplasty: porcine collagen matrix versus free gingival graft: a clinical and histologic study. *J Periodontol*. 2013;84(7):914-23.
15. Zucchelli G, Tavelli L, McGuire MK, Rasperini G, Feinberg SE, Wang HL, et al. Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction. *J Periodontol*. 2020;91(1):9-16.
16. de Resende DRB, Greggi SLA, Siqueira AF, Benfatti CAM, Damante CA, Ragghianti Zangrando MS. Acellular dermal matrix allograft versus free gingival graft: a histological evaluation and split-mouth randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2019;23(2):539-50.
17. Lim HC, An SC, Lee DW. A retrospective comparison of three modalities for vestibuloplasty in the posterior mandible: apically positioned flap only vs. free gingival graft vs. collagen matrix. *Clin Oral Investig*. 2018;22(5):2121-8.
18. Schmitt CM, Moest T, Lutz R, Wehrhan F, Neukam FW, Schlegel KA. Long-term outcomes after vestibuloplasty with a porcine collagen matrix (Mucograft®) versus the free gingival graft: a comparative prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(11):e125-e33.
19. Sanz M, Lorenzo R, Aranda JJ, Martin C, Orsini M. Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: a randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009;36(10):868-76.

20. Suárez-López Del Amo F, Lin GH, Monje A, Galindo-Moreno P, Wang HL. Influence of Soft Tissue Thickness on Peri-Implant Marginal Bone Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol*. 2016;87(6):690-9.
21. Schlee M. Periimplantäres Weichgewebemanagement. *Zahnmedizin up2date*. 2018;12(02):123-31.
22. Linkevicius T, Puisys A, Linkeviciene L, Peculiene V, Schlee M. Crestal Bone Stability around Implants with Horizontally Matching Connection after Soft Tissue Thickening: A Prospective Clinical Trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(3):497-508.
23. Wolf H, Rateitschak K. *Parodontologie*. 3 ed. Stuttgart: Thieme; 2012.
24. Thoma DS, Benić GI, Zwahlen M, Hämmerle CH, Jung RE. A systematic review assessing soft tissue augmentation techniques. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20 Suppl 4:146-65.
25. Thoma DS, Buranawat B, Hämmerle CH, Held U, Jung RE. Efficacy of soft tissue augmentation around dental implants and in partially edentulous areas: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2014;41 Suppl 15:S77-91.
26. Zeltner M, Jung RE, Hämmerle CH, Hüsler J, Thoma DS. Randomized controlled clinical study comparing a volume-stable collagen matrix to autogenous connective tissue grafts for soft tissue augmentation at implant sites: linear volumetric soft tissue changes up to 3 months. *J Clin Periodontol*. 2017;44(4):446-53.
27. Tavelli L, McGuire MK, Zucchelli G, Rasperini G, Feinberg SE, Wang HL, et al. Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration. *J Periodontol*. 2020;91(1):17-25.
28. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017;125(5):315-37.
29. Kuchler U, von Arx T. Horizontal ridge augmentation in conjunction with or prior to implant placement in the anterior maxilla: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29 Suppl:14-24.
30. Bee SL, Hamid ZAA. Asymmetric resorbable-based dental barrier membrane for periodontal guided tissue regeneration and guided bone regeneration: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022;110(9):2157-82.
31. S2k-Leitlinie (Langfassung) Implantologische Indikationen für die Anwendung von Knochenersatzmaterialien [Internet]. Letzte Aktualisierung: Juli 2020. Zitiert am 05.10.2023: Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde e.V. (DGZMK), Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich e.V. (DGI); 2020.
32. Troeltzsch M, Troeltzsch M, Kauffmann P, Gruber R, Brockmeyer P, Moser N, et al. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(10):1618-29.
33. Ren Y, Fan L, Alkildani S, Liu L, Emmert S, Najman S, et al. Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR): A Focus on Recent Advances in Collagen Membranes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23).
34. Raetzke PB. Covering localized areas of root exposure employing the "envelope" technique. *J Periodontol*. 1985;56(7):397-402.
35. Tatakis DN, Chambrone L, Allen EP, Langer B, McGuire MK, Richardson CR, et al. Periodontal soft tissue root coverage procedures: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015;86(2 Suppl):S52-5.
36. Cairo F, Nieri M, Pagliaro U. Efficacy of periodontal plastic surgery procedures in the treatment of localized facial gingival recessions. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2014;41 Suppl 15:S44-62.
37. Rothamel D, Benner M, Fienitz T, Happe A, Kreppel M, Nickenig HJ, et al. Biodegradation pattern and tissue integration of native and cross-linked porcine collagen soft tissue augmentation matrices - an experimental study in the rat. *Head Face Med*. 2014;10:10.
38. Tavelli L, Barootchi S, Cairo F, Rasperini G, Shedden K, Wang HL. The Effect of Time on Root Coverage Outcomes: A Network Meta-analysis. *J Dent Res*. 2019;98(11):1195-203.

39. Sangiorgio JPM, Neves F, Rocha Dos Santos M, França-Grohmann IL, Casarin RCV, Casati MZ, et al. Xenogenous Collagen Matrix and/or Enamel Matrix Derivative for Treatment of Localized Gingival Recessions: A Randomized Clinical Trial. Part I: Clinical Outcomes. *J Periodontol*. 2017;88(12):1309-18.
40. Vokurka J, Hromcik F, Faldyna M, Gopfert E, Vicensova M, Pozarova L, et al. Platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and enamel matrix derivative for oral mucosal wound healing. *Pol J Vet Sci*. 2020;23(2):169-76.
41. Rupp M, Kerschbaum M, Klute L, Frank L, Alt V. [Bone transplantation or biomaterials? : An analysis of 99,863 surgical procedures in orthopedic and trauma surgery in Germany from 2018]. *Unfallchirurg*. 2021;124(2):146-52.
42. Smeets R, Kolk A. Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien. *ZMK Zahnheilkunde | Management | Kultur*. 2010:328-40.
43. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
44. Ermer M. Präklinische Evaluation des Integrationsmodus einer dreidimensionalen Kollagenmatrix (Mucograft®) im Vergleich zum autologen Bindegewebestransplantat. Eine histologische und immunhistologische tierexperimentelle Vergleichsstudie [Dissertation]. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg 2022.
45. Wessel JR, Tatakis DN. Patient outcomes following subepithelial connective tissue graft and free gingival graft procedures. *J Periodontol*. 2008;79(3):425-30.
46. Tavelli L, Barootchi S, Stefanini M, Zucchelli G, Giannobile WV, Wang HL. Wound healing dynamics, morbidity, and complications of palatal soft-tissue harvesting. *Periodontol 2000*. 2022.
47. Reiser GM, Bruno JF, Mahan PE, Larkin LH. The subepithelial connective tissue graft palatal donor site: anatomic considerations for surgeons. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1996;16(2):130-7.
48. Stimmelmayer M, Stangl M, Edelhoff D, Beuer F. Clinical prospective study of a modified technique to extend the keratinized gingiva around implants in combination with ridge augmentation: one-year results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(5):1094-101.
49. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218404.
50. Harris RJ. A short-term and long-term comparison of root coverage with an acellular dermal matrix and a subepithelial graft. *J Periodontol*. 2004;75(5):734-43.
51. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen: an overview. *Implant Dent*. 2002;11(3):280-5.
52. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2012;8(9):3191-200.
53. Kleinheinz J, Jung S, Wermker K, Fischer C, Joos U. Release kinetics of VEGF165 from a collagen matrix and structural matrix changes in a circulation model. *Head Face Med*. 2010;6:17.
54. Heimes D, Wiesmann N, Eckrich J, Brieger J, Mattyasovszky S, Proff P, et al. In Vivo Modulation of Angiogenesis and Immune Response on a Collagen Matrix via Extracorporeal Shockwaves. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
55. Burkhardt V. Effekte auf die Angiogenese verschiedener mittels autologem Platelet-Rich Fibrin bioaktiverter Kollagenmatrices [Dissertation]. Mainz 2022.
56. Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(4):403-9.
57. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(3):369-78.
58. Heinrich S, Schwitalla A. Das Potenzial von KEM. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie*. 2022:38-9.

59. Barbeck M, Lorenz J, Kubesch A, Böhm N, Booms P, Choukroun J, et al. Porcine Dermis-Derived Collagen Membranes Induce Implantation Bed Vascularization Via Multinucleated Giant Cells: A Physiological Reaction? *J Oral Implantol*. 2015;41(6):e238-51.
60. Kasaj A, Levin L, Stratul SI, Götz H, Schlee M, Rütters CB, et al. The influence of various rehydration protocols on biomechanical properties of different acellular tissue matrices. *Clin Oral Investig*. 2016;20(6):1303-15.
61. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials*. 1997;18(7):535-8.
62. Nocini PF, Castellani R, Zanotti G, Gelpi F, Covani U, Marconcini S, et al. Extensive keratinized tissue augmentation during implant rehabilitation after Le Fort I osteotomy: using a new porcine collagen membrane (Mucoderm). *J Craniofac Surg*. 2014;25(3):799-803.
63. Rhee S, Grinnell F. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(13):1299-305.
64. Pabst AM, Happe A, Callaway A, Ziebart T, Stratul SI, Ackermann M, et al. In vitro and in vivo characterization of porcine acellular dermal matrix for gingival augmentation procedures. *J Periodontal Res*. 2014;49(3):371-81.
65. Puisys A, Zukauskas S, Kubilius R, Barbeck M, Razukevicius D, Linkeviciene L, et al. Clinical and Histologic Evaluations of Porcine-Derived Collagen Matrix Membrane Used for Vertical Soft Tissue Augmentation: A Case Series. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019;39(3):341-7.
66. Papi P, Pompa G. The Use of a Novel Porcine Derived Acellular Dermal Matrix (Mucoderm) in Peri-Implant Soft Tissue Augmentation: Preliminary Results of a Prospective Pilot Cohort Study. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6406051.
67. Zafiropoulos GG, Deli G, Hoffmann O, John G. Changes of the peri-implant soft tissue thickness after grafting with a collagen matrix. *J Indian Soc Periodontol*. 2016;20(4):441-5.
68. Puisys A, Deikuvienė J, Vindasiute-Narbutė E, Razukevicius D, Zvirblis T, Linkevicius T. Connective tissue graft vs porcine collagen matrix after immediate implant placement in esthetic area: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2022;24(2):141-50.
69. Selvaras T, Alshamrani SA, Gopal R, Jaganathan SK, Sivalingam S, Kadiman S, et al. Biodegradable and antithrombogenic chitosan/elastin blended polyurethane electrospun membrane for vascular tissue integration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2023;111(6):1171-81.
70. Hafemann B, Ensslen S, Erdmann C, Niedballa R, Zühlke A, Ghofrani K, et al. Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis. *Burns*. 1999;25(5):373-84.
71. Caballé-Serrano J, Zhang S, Sculean A, Staehli A, Bosshardt DD. Tissue Integration and Degradation of a Porous Collagen-Based Scaffold Used for Soft Tissue Augmentation. *Materials (Basel)*. 2020;13(10).
72. Lenselink EA. Role of fibronectin in normal wound healing. *Int Wound J*. 2015;12(3):313-6.
73. Kim SG, Lee DS, Lee S, Jang JH. Osteocalcin/fibronectin-functionalized collagen matrices for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(6):2133-40.
74. Rashki S, Asgarpour K, Tarahimofrad H, Hashemipour M, Ebrahimi MS, Fathizadeh H, et al. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. *Carbohydr Polym*. 2021;251:117108.
75. Sultankulov B, Berillo D, Sultankulova K, Tokay T, Saparov A. Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomolecules*. 2019;9(9).
76. Xu Y, Zhao S, Weng Z, Zhang W, Wan X, Cui T, et al. Jelly-Inspired Injectable Guided Tissue Regeneration Strategy with Shape Auto-Matched and Dual-Light-Defined Antibacterial/Osteogenic Pattern Switch Properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(49):54497-506.
77. Jayachandran V, Murugan SS, Dalavi PA, Gurushanthappa Vishalakshi YD, Seong GH. Alginate-based Composite Microspheres: Preparations and Applications for Bone Tissue Engineering. *Curr Pharm Des*. 2022;28(13):1067-81.
78. Kohlhaas T, Ariadne L. In-vitro Untersuchung der Biokompatibilität neuartiger Algenmembranen zur Versorgung knöcherner Defekte des Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereiches [Dissertation]: Christian-Albrechts-Universität Kiel; 2022.

79. Araújo LK, Lopes MS, Souza FFP, Melo MM, Paulo AO, Castro S, II. Efficiency analysis of commercial polymeric membranes for bone regeneration in rat cranial defects. *Acta Cir Bras*. 2023;38:e380623.
80. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res*. 2013;57(1):3-14.
81. Terakawa K, Yamauchi H, Lee Y, Ono M. A Novel Knitted Polytetrafluoroethylene Patch for Cardiovascular Surgery. *Int Heart J*. 2022;63(1):122-30.
82. Cho JK, Serna J, Clark TWI, Dagli M, Mondschein JJ, Shlansky-Goldberg RD, et al. Impact of PTFE-covered stent position and extension on TIPS patency. *Abdom Radiol (NY)*. 2020;45(11):3915-22.
83. Sasaki JJ, Abe GL, Li A, Thongthai P, Tsuboi R, Kohno T, et al. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. *Biomater Investig Dent*. 2021;8(1):54-63.
84. Mertens C, Braun S, Krisam J, Hoffmann J. The influence of wound closure on graft stability: An in vitro comparison of different bone grafting techniques for the treatment of one-wall horizontal bone defects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(2):284-91.
85. He Y, Wang X, He Y, Zhao X, Lin J, Feng Y, et al. A bioinspired Janus polyurethane membrane for potential periodontal tissue regeneration. *J Mater Chem B*. 2022;10(14):2602-16.
86. Robert P, Mauduit J, Frank RM, Vert M. Biocompatibility and resorbability of a polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration. *Biomaterials*. 1993;14(5):353-8.
87. Christen MO, Vercesi F. Polycaprolactone: How a Well-Known and Futuristic Polymer Has Become an Innovative Collagen-Stimulator in Esthetics. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13:31-48.
88. Marzec M, Kucińska-Lipka J, Kalaszczyńska I, Janik H. Development of polyurethanes for bone repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;80:736-47.
89. Kim EV, Petronyuk YS, Guseynov NA, Tereshchuk SV, Popov AA, Volkov AV, et al. Biocompatibility and Bioresorption of 3D-Printed Polylactide and Polyglycolide Tissue Membranes. *Bull Exp Biol Med*. 2021;170(3):356-9.
90. Gernhardt C, Bekes H. Kollagen- und synthetische Membranen in der geführten Gewebe- und Knochenregeneration. *Oralchirurgie Journal*. 2005(4/2005):12-8.
91. Plagmann H. *Lehrbuch der Parodontologie*. München u.a.1998.
92. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Bowlin GL, Jhurria D. An assessment of biopolymer- and syntheticpolymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. *Polymer International, Society of Chemical Industry*. 2013;62(4):523-702.
93. Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, Fadaei M, Cowin AJ, Hassanshahi M. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. *Cells*. 2022;11(19).
94. Milella E, Ramires PA, Brescia E, La Sala G, Di Paola L, Bruno V. Physicochemical, mechanical, and biological properties of commercial membranes for GTR. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(4):427-35.
95. Vuddhakanok S, Solt CW, Mitchell JC, Foreman DW, Alger FA. Histologic evaluation of periodontal attachment apparatus following the insertion of a biodegradable copolymer barrier in humans. *J Periodontol*. 1993;64(3):202-10.
96. Rekabgardan M, Rahmani M, Soleimani M, Hossein Zadeh S, Roozafzoon R, Parandakh A, et al. A Bilayered, Electrospun Poly(Glycerol-Sebacate)/Polyurethane-Polyurethane Scaffold for Engineering of Endothelial Basement Membrane. *Asaio j*. 2022;68(1):123-32.
97. Ouyang C, Xu H, Wang W, Yang H, Xu W. In vivo histocompatibility evaluation of polyurethane membrane modified by superfine silk-fibroin powder. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009;29(4):508-11.
98. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 Suppl):106-16.

99. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dental Materials*. 2012;28(7).
100. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401-16.
101. Leal-Egaña A, Scheibel T. Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;55(3):155-67.
102. Jin HJ, Kaplan DL. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*. 2003;424(6952):1057-61.
103. Vollrath F, Knight DP. Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*. 2001;410(6828):541-8.
104. Tsujimoto K, Takagi H, Takahashi M, Yamada H, Nakamori S. Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J Biochem*. 2001;129(6):979-86.
105. Smeets R, Knabe C, Kolk A, Rheinnecker M, Gröbe A, Heiland M, et al. Novel silk protein barrier membranes for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(8):2603-11.
106. Omenetto FG, Kaplan DL. New opportunities for an ancient material. *Science*. 2010;329(5991):528-31.
107. Sun W, Gregory DA, Tomeh MA, Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
108. Huang W, Ling S, Li C, Omenetto FG, Kaplan DL. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chem Soc Rev*. 2018;47(17):6486-504.
109. Sugihara A, Sugiura K, Morita H, Ninagawa T, Tubouchi K, Tobe R, et al. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;225(1):58-64.
110. Shiroud Heidari B, Muiños Lopez E, Harrington E, Ruan R, Chen P, Davachi SM, et al. Novel hybrid biocomposites for tendon grafts: The addition of silk to polydioxanone and poly(lactide-co-caprolactone) enhances material properties, in vitro and in vivo biocompatibility. *Bioact Mater*. 2023;25:291-306.
111. Yi B, Zhang H, Yu Z, Yuan H, Wang X, Zhang Y. Fabrication of high performance silk fibroin fibers via stable jet electrospinning for potential use in anisotropic tissue regeneration. *J Mater Chem B*. 2018;6(23):3934-45.
112. Sun MG, Luo Y, Teng T, Guaiquil V, Zhou Q, McGinn L, et al. Silk Film Stiffness Modulates Corneal Epithelial Cell Mechanosignaling. *Macromol Chem Phys*. 2021;222(7).
113. Cao S, Tang R, Sudlow G, Wang Z, Liu KK, Luan J, et al. Shape-Dependent Biodistribution of Biocompatible Silk Microcapsules. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(5):5499-508.
114. Cao Z, Chen X, Yao J, Huang L, Shao Z. The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter*. 2007;3(7):910-5.
115. Pudkon W, Laomeephol C, Damrongsakkul S, Kanokpanont S, Ratanavaraporn J. Comparative Study of Silk Fibroin-Based Hydrogels and Their Potential as Material for 3-Dimensional (3D) Printing. *Molecules*. 2021;26(13).
116. Shi Q, Qian Z, Liu D, Sun J, Wang X, Liu H, et al. GMSC-Derived Exosomes Combined with a Chitosan/Silk Hydrogel Sponge Accelerates Wound Healing in a Diabetic Rat Skin Defect Model. *Front Physiol*. 2017;8:904.
117. Guo C, Li C, Kaplan DL. Enzymatic Degradation of Bombyx mori Silk Materials: A Review. *Biomacromolecules*. 2020;21(5):1678-86.
118. Kopp A, Smeets R, Gosau M, Kröger N, Fuest S, Köpf M, et al. Effect of process parameters on additive-free electrospinning of regenerated silk fibroin nonwovens. *Bioact Mater*. 2020;5(2):241-52.
119. DeBari MK, Keyser MN, Bai MA, Abbott RD. 3D printing with silk: considerations and applications. *Connect Tissue Res*. 2020;61(2):163-73.
120. Costa JB, Silva-Correia J, Oliveira JM, Reis RL. Fast Setting Silk Fibroin Bioink for Bioprinting of Patient-Specific Memory-Shape Implants. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(22).

121. Mahmoodi NM, Arami M, Mazaheri F, Rahimi S. Degradation of sericin (degumming) of Persian silk by ultrasound and enzymes as a cleaner and environmentally friendly process. *Journal of Cleaner Production*. 2010;18(2):146-51.
122. Freddi G, Mossotti R, Innocenti R. Degumming of silk fabric with several proteases. *J Biotechnol*. 2003;106(1):101-12.
123. Kasoju N, Bora U. Silk fibroin in tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2012;1(4):393-412.
124. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):457-70.
125. Huang W, Begum R, Barber T, Ibba V, Tee NC, Hussain M, et al. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials*. 2012;33(1):59-71.
126. Patra C, Talukdar S, Novoyatleva T, Velagala SR, Mühlfeld C, Kundu B, et al. Silk protein fibroin from *Antheraea mylitta* for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(9):2673-80.
127. She Z, Liu W, Feng Q. Self-assembly model, hepatocytes attachment and inflammatory response for silk fibroin/chitosan scaffolds. *Biomed Mater*. 2009;4(4):045014.
128. Causin F, Pascarella R, Pavesi G, Marasco R, Zambon G, Battaglia R, et al. Acute endovascular treatment (< 48 hours) of uncoilable ruptured aneurysms at non-branching sites using silk flow-diverting devices. *Interv Neuroradiol*. 2011;17(3):357-64.
129. Leonardi M, Cirillo L, Toni F, Dall'olio M, Princiotta C, Stafa A, et al. Treatment of intracranial aneurysms using flow-diverting silk stents (BALT): a single centre experience. *Interv Neuroradiol*. 2011;17(3):306-15.
130. Zhang W, Chen L, Chen J, Wang L, Gui X, Ran J, et al. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(10).
131. Kim JY, Yang BE, Ahn JH, Park SO, Shim HW. Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects. *J Adv Prosthodont*. 2014;6(6):539-46.
132. Cai Y, Guo J, Chen C, Yao C, Chung SM, Yao J, et al. Silk fibroin membrane used for guided bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;70(Pt 1):148-54.
133. Luo Z, Li J, Qu J, Sheng W, Yang J, Li M. Cationized Bombyx mori silk fibroin as a delivery carrier of the VEGF165-Ang-1 coexpression plasmid for dermal tissue regeneration. *J Mater Chem B*. 2019;7(1):80-94.
134. Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller MC, Lang EM, Stark GB. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Engineering*. 2003;9(3):441-50.
135. Watchararat T, Prasongchean W, Thongnuek P. Angiogenic property of silk fibroin scaffolds with adipose-derived stem cells on chick chorioallantoic membrane. *R Soc Open Sci*. 2021;8(3):201618.
136. Kivrak Pfiffner F, Waschkes C, Tian Y, Woloszyk A, Calcagni M, Giovanoli P, et al. A new in vivo magnetic resonance imaging method to noninvasively monitor and quantify the perfusion capacity of three-dimensional biomaterials grown on the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(4):339-46.
137. Woloszyk A, Buschmann J, Waschkes C, Stadlinger B, Mitsiadis TA. Human Dental Pulp Stem Cells and Gingival Fibroblasts Seeded into Silk Fibroin Scaffolds Have the Same Ability in Attracting Vessels. *Front Physiol*. 2016;7:140.
138. Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials*. 2010;31(27):6959-67.
139. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30.
140. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:103-12.

141. Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2021;15(9):747-62.
142. Huang J, Han Q, Cai M, Zhu J, Li L, Yu L, et al. Effect of Angiogenesis in Bone Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng.* 2022;50(8):898-913.
143. Sharma A, Ingole S, Deshpande M, Ranadive P, Sharma S, Kazi N, et al. Influence of platelet-rich fibrin on wound healing and bone regeneration after tooth extraction: A clinical and radiographic study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020;10(4):385-90.
144. Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound Repair Regen.* 2011;19(6):753-66.
145. Choukroun J, Adda F, Schoffler C, Vervelle A. Une opportunit  en parodontologie: Le. *Implantodontie.* 2001;42:55-62.
146. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, 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):e37-44.
147. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol.* 2010;81(4):546-55.
148. Kobayashi E, Fl ckiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20(9):2353-60.
149. Choukroun J, Ghanaati S. 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):87-95.
150. Herrera-Vizca no C, Dohle E, Al-Maawi S, Booms P, Sader R, Kirkpatrick CJ, et al. Platelet-rich fibrin secretome induces three dimensional angiogenic activation in vitro. *Eur Cell Mater.* 2019;37:250-64.
151. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2017;21(6):1913-27.
152. Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, et al. Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence? *J Oral Implantol.* 2018;44(6):471-92.
153. S3-Leitlinie (Langfassung) Einsatz von Platelet-Rich-Fibrin in der dentalen Implantologie [Internet]. Letzte Aktualisierung: 02.12.2022. Version 1.0. Zitiert am 05.10.2023: Deutsche Gesellschaft f r Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde e.V. (DGZMK), Deutsche Gesellschaft f r Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich e.V. (DGI), Deutsche Gesellschaft f r Parodontologie (DG PARO); 2022.
154. de Almeida Barros Mour o CF, de Mello-Machado RC, Javid K, Moraschini V. The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin in the management of soft tissue healing and pain in post-extraction sockets: A randomized clinical trial. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48(4):452-7.
155. Ustaog lu G, G ller Bulut D, G m    K. Evaluation of different platelet-rich concentrates effects on early soft tissue healing and socket preservation after tooth extraction. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020;121(5):539-44.
156. Moraschini V, Barboza Edos S. Use of Platelet-Rich Fibrin Membrane in the Treatment of Gingival Recession: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol.* 2016;87(3):281-90.
157. Girish Kumar N, Chaudhary R, Kumar I, Arora SS, Kumar N, Singh H. To assess the efficacy of socket plug technique using platelet rich fibrin with or without the use of bone substitute in alveolar ridge preservation: a prospective randomised controlled study. *Oral Maxillofac Surg.* 2018;22(2):135-42.
158. Hassan S, Dhadse P, Bajaj P, Sethiya K, Subhadarsanee C, Oza R. Comparative evaluation of platelet rich fibrin matrix (PRFM) membrane and platelet rich fibrin (PRF) membrane using the vestibular incision subperiosteal tunnel access (VISTA) approach technique for the treatment of

multiple gingival recession in humans: A double-blind, parallel-group, randomized controlled clinical trial [version 1; peer review: 1 not approved]. *F1000Research*. 2023;12(872).

159. Ratajczak J, Vanganswinkel T, Gervois P, Merckx G, Hilken P, Quirynen M, et al. Angiogenic Properties of 'Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin'. *Sci Rep*. 2018;8(1):14632.

160. Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. 2012;40(5):323-9.

161. Blatt S, Thiem DGE, Pabst A, Al-Nawas B, Kämmerer PW. Does Platelet-Rich Fibrin Enhance the Early Angiogenetic Potential of Different Bone Substitute Materials? An In Vitro and In Vivo Analysis. *Biomedicine*. 2021;9(1).

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

163. Kyyak S, Blatt S, Pabst A, Thiem D, Al-Nawas B, Kämmerer PW. Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study. *J Biomater Appl*. 2020;35(1):83-96.

164. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):658-68.

165. Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie : 66 Tabellen*. 3., unveränd. Aufl. ed. Gängler P, editor. Stuttgart u.a.: Georg Thieme Verlag; 2010.

166. Klewin-Steinböck S, Adamski Z, Wyganowska-Świątkowska M. Potential usefulness of enamel matrix derivative in skin and mucosal injury treatment. *Postepy Dermatol Alergol*. 2021;38(3):351-8.

167. Institut Straumann AG. Produktinformation Straumann® Emdogain® [Internet]. Zitiert am: 05.04.2024 2017.

168. Hammarström L, Blomlöf L, Myrstuguvägen S, inventors Composition inducing a binding. Sweden 1989.

169. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S, inventors; Bioventures N.V., Curacao, Netherlands Antilles, assignee. Composition containing enamel matrix from tooth germs for inducing binding between living mineralized tissue parts patent 5,418,221. 1995 23.05.1995.

170. Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):669-77.

171. Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *Clinical Periodontology*. 2008;35(8):87-105.

172. Parkar MH, Tonetti M. Gene expression profiles of periodontal ligament cells treated with enamel matrix proteins in vitro: analysis using cDNA arrays. *J Periodontol*. 2004;75(11):1539-46.

173. Kasaj A, Meister J, Lehmann K, Stratul SI, Schlee M, Stein JM, et al. The influence of enamel matrix derivative on the angiogenic activity of primary endothelial cells. *J Periodontal Res*. 2012;47(4):479-87.

174. Schlueter SR, Carnes DL, Cochran DL. In vitro effects of enamel matrix derivative on microvascular cells. *J Periodontol*. 2007;78(1):141-51.

175. Miron RJ, Wei L, Yang S, Caluseru OM, Sculean A, Zhang Y. Effect of enamel matrix derivative on periodontal wound healing and regeneration in an osteoporotic model. *J Periodontol*. 2014;85(11):1603-11.

176. Aspriello SD, Zizzi A, Spazzafumo L, Rubini C, Lorenzi T, Marziani D, et al. Effects of enamel matrix derivative on vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gingival tissues of periodontal pocket: a comparative study. *J Periodontol*. 2011;82(4):606-12.

177. Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN, Agren MS. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004;12(1):100-8.

178. Maymon-Gil T, Weinberg E, Nemcovsky C, Weinreb M. Enamel Matrix Derivative Promotes Healing of a Surgical Wound in the Rat Oral Mucosa. *J Periodontol*. 2016;87(5):601-9.

179. Zeldich E, Koren R, Dard M, Weinberg E, Weinreb M, Nemcovsky CE. Enamel matrix derivative induces the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 in human gingival fibroblasts via extracellular signal-regulated kinase. *J Periodontal Res*. 2010;45(2):200-6.

180. Ardila CM, Pertuz M, Vivares-Builes AM. Clinical Efficacy of Platelet Derivatives in Periodontal Tissue Regeneration: An Umbrella Review. *Int J Dent*. 2023;2023:1099013.
181. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, et al. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. *Journal of Clinical Periodontology*. 2020;47(S22):4-60.
182. S3-Leitlinie (Langversion) Die Behandlung von Parodontitis Stadium I bis III [Internet]. Letzte Aktualisierung: Dezember 2020. Zitiert am 12.10.2023: Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO), Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde e.V. (DGZMK); 2020.
183. Stein J. Der chirurgische Zugang zum parodontalen Defekt – welcher Weg ist der richtige? *Quintessenz Zahnmedizin*. 2019;70(10):1148-59.
184. Kauvar AS, Thoma DS, Carnes DL, Cochran DL. In vivo angiogenic activity of enamel matrix derivative. *J Periodontol*. 2010;81(8):1196-201.
185. Guimarães GF, de Araújo VC, Nery JC, Peruzzo DC, Soares AB. Microvessel Density Evaluation of the Effect of Enamel Matrix Derivative on Soft Tissue After Implant Placement: A Preliminary Study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2015;35(5):733-8.
186. Kashefimehr A, Pourabbas R, Faramarzi M, Zarandi A, Moradi A, Tenenbaum HC, et al. Effects of enamel matrix derivative on non-surgical management of peri-implant mucositis: a double-blind randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2017;21(7):2379-88.
187. Kashefimehr A, Pourabbas R, Faramarzi M, Zarandi A, Moradi A, Tenenbaum HC, et al. Erratum to: Effects of enamel matrix derivative on non-surgical management of peri-implant mucositis: a double-blind randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2017;21(2):725.
188. Jentsch HFR, Rocuzzo M, Pilloni A, Kasaj A, Fimmers R, Jepsen S. Flapless application of enamel matrix derivative in periodontal retreatment: A multicentre randomized feasibility trial. *J Clin Periodontol*. 2021;48(5):659-67.
189. Schallhorn RA, McClain PK, Benhamou V, Doobrow JH, Grandin HM, Kasaj A. Application of enamel matrix derivative in conjunction with non-surgical therapy for treatment of moderate to severe periodontitis: A 12-month, randomized prospective, multicenter study. *J Periodontol*. 2021;92(5):619-28.
190. Park JS, Pabst AM, Ackermann M, Moergel M, Jung J, Kasaj A. 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):909-17.
191. Yuan K, Chen CL, Lin MT. Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model. *J Clin Periodontol*. 2003;30(8):732-8.
192. Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol*. 1974;41(2):391-4.
193. Merckx G, Tay H, Lo Monaco M, van Zandvoort M, De Spiegelaere W, Lambrichts I, et al. Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020;26(6):519-39.
194. Mueller CK, Lee SY, Schultze-Mosgau S. Characterization of interfacial reactions between connective tissue and allogeneous implants used for subdermal soft tissue augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(11):1194-200.
195. Jung S, Kleinheinz J. Angiogenesis — The Key to Regeneration. In: Jose AA, editor. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. Rijeka: IntechOpen; 2013.
196. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2018;21(3):425-532.
197. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*. 2017;70:97-101.
198. Preuß D. Untersuchung der kombinierten Behandlung von Tumoren im Chorionallantoismembran-Modell mit Zinkoxidnanopartikeln und Radiotherapie [Dissertation]. Idstein: Hochschule Fresenius University of Applied Sciences Idstein; 2022.
199. Sys GM, Lapeire L, Stevens N, Favoreel H, Forsyth R, Bracke M, et al. The in ovo CAM-assay as a xenograft model for sarcoma. *J Vis Exp*. 2013(77):e50522.

200. Zijlstra A, Aimes RT, Zhu D, Regazzoni K, Kupriyanova T, Seandel M, et al. Collagenolysis-dependent angiogenesis mediated by matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3). *J Biol Chem*. 2004;279(26):27633-45.
201. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*. 2004;10(1):92-5.
202. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015;54(2):120-32.
203. Sarogni P, Mapanao AK, Marchetti S, Kusmic C, Voliani V. A Standard Protocol for the Production and Bioevaluation of Ethical In Vivo Models of HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021;4(3):1227-34.
204. Rosenbruch M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX*. 1997;14(3):111-3.
205. Kunzi-Rapp K, Rück A, Kaufmann R. Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Archives of Dermatological Research*. 1999;291(5):290-5.
206. München TU. Abschlussbericht Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen (HES 7-14). 2023.
207. Bjørnstad S, Austdal L, Roald B, Glover J, Paulsen R. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2015;355.
208. Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. IS. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist [Internet]. Letzte Aktualisierung: 17.08.2023. Zitiert am 13.04.2024: Bundesministerium der Justiz; 2023.
209. EU. Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rats vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere [Internet]. Letzte Aktualisierung: 26.06.2019. Zitiert am 13.04.2024.
210. Fischer D, Fluegen G, Garcia P, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Gribaldo L, Huang RY, et al. The CAM Model-Q&A with Experts. *Cancers (Basel)*. 2022;15(1).
211. Burggren W, Rojas Antich M. Angiogenesis in the Avian Embryo Chorioallantoic Membrane: A Perspective on Research Trends and a Case Study on Toxicant Vascular Effects. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2020;7(4).
212. Ribatti D. Two new applications in the study of angiogenesis the CAM assay: Acellular scaffolds and organoids. *Microvasc Res*. 2022;140:104304.
213. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. *Developmental Biology*. 1974;38(2):237-48.
214. Bai Y, Bai L, Zhou J, Chen H, Zhang L. Sequential delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis. *Cellular Immunology*. 2018;323:19-32.
215. Sax J, Wiesmann N, Kämmerer PW. Etablierung einer RT-qPCR Methode zur Quantifizierung von ausgewählten Immunmarkern und Neoangiogenesefaktoren im Chorionallantois-Membran-Assay [Dissertation]. Unveröffentlicht. Mainz: Universitätsmedizin Mainz; 2024.
216. Stryker ZI, Rajabi M, Davis PJ, Mousa SA. Evaluation of Angiogenesis Assays. *Biomedicines*. 2019;7(2).
217. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 1996;40(6):1189-97.
218. Markowska M, Majewski PM, Skwarło-Sońta K. Avian biological clock - Immune system relationship. *Dev Comp Immunol*. 2017;66:130-8.
219. Schmieder S. Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten [Dissertation]: Ludwigs-Maximilians-Universität München; 2011.
220. Rast JP, Anderson MK, Strong SJ, Luer C, Litman RT, Litman GW. alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity*. 1997;6(1):1-11.
221. Garcia P, Wang Y, Viallet J, Macek Jilkova Z. The Chicken Embryo Model: A Novel and Relevant Model for Immune-Based Studies. *Frontiers in Immunology*. 2021;12.

222. Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P. Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Mol Immunol*. 2003;40(9):603-10.
223. Mangir N, Dikici S, Claeysens F, MacNeil S. Using ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay To Evaluate the Biocompatibility and Angiogenic Response to Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(7):3190-200.
224. Liu M, Xie S, Zhou J. Use of animal models for the imaging and quantification of angiogenesis. *Exp Anim*. 2018;67(1):1-6.
225. Smith JD, Melhem ME, Magge KT, Waggoner AS, Campbell PG. Improved growth factor directed vascularization into fibrin constructs through inclusion of additional extracellular molecules. *Microvasc Res*. 2007;73(2):84-94.
226. Leong HS, Steinmetz NF, Ablack A, Destito G, Zijlstra A, Stuhlmann H, et al. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles. *Nat Protoc*. 2010;5(8):1406-17.
227. Baum O, Suter F, Gerber B, Tschanz SA, Buerge R, Blank F, et al. VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane. *Microcirculation*. 2010;17(6):447-57.
228. Yue H, Lei XW, Yang FL, Li MY, Tang C. Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. *Virol Sin*. 2010;25(6):425-31.
229. Wang G, Zhang N, Wei YF, Jin YM, Zhang SY, Cheng X, et al. The impact of high-salt exposure on cardiovascular development in the early chick embryo. *J Exp Biol*. 2015;218(Pt 21):3468-77.
230. Sakoda K, Nakajima Y, Noguchi K. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(6):513-9.
231. Ribatti D, De Falco G, Nico B, Ria R, Crivellato E, Vacca A. In vivo time-course of the angiogenic response induced by multiple myeloma plasma cells in the chick embryo chorioallantoic membrane. *J Anat*. 2003;203(3):323-8.
232. Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *Int J Implant Dent*. 2015;1(1):31.
233. Schröger SV, Blatt S, Sagheb K, Al-Nawas B, Kämmerer PW, Sagheb K. Platelet-rich fibrin for rehydration and pre-vascularization of an acellular, collagen membrane of porcine origin. *Clin Oral Investig*. 2024;28(1):99.
234. Janser FA, Ney P, Pinto MT, Langer R, Tschan MP. The Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as a Three-dimensional Model to Study Autophagy in Cancer Cells. *Bio Protoc*. 2019;9(13).
235. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(3):195-221.
236. Rau KM, Huang CC, Chiu TJ, Chen YY, Lu CC, Liu CT, et al. Neovascularization evaluated by CD105 correlates well with prognostic factors in breast cancers. *Exp Ther Med*. 2012;4(2):231-6.
237. Cholemakow-Bodechtel C, Füßl-Grünig E, Geyer S, Hertrampf K, Hoffmann T, Holtfreter B, et al. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) [Internet]. Zitiert am 29.12.2023 (IDZ) IdDZ, editor. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV; 2016 31.03.2021.
238. Heinrich R, John MT, Lenz E, Micheelis W, Potthoff P, Reich E, et al. Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III) [Internet]. Zitiert am 29.12.2023. (IDZ) IdDZ, editor. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 1999.
239. Daubländer M, Müller R, Lipp MD. The incidence of complications associated with local anesthesia in dentistry. *Anesth Prog*. 1997;44(4):132-41.
240. Griffin TJ, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Postoperative complications following gingival augmentation procedures. *J Periodontol*. 2006;77(12):2070-9.
241. Barootchi S, Tavelli L, Majzoub J, Stefanini M, Wang HL, Avila-Ortiz G. Alveolar ridge preservation: Complications and cost-effectiveness. *Periodontol 2000*. 2023;92(1):235-62.
242. Ha Y, Park Y, Kweon H, Jo Y, Kim S. Comparison of the physical properties and in vivo bioactivities of silkworm-cocoon-derived silk membrane, collagen membrane, and

polytetrafluoroethylene membrane for guided bone regeneration. *Macromolecular Research*. 2014;22(9):1018-23.

243. Ge Z, Yang Q, Xiang X, Liu KZ. Assessment of silk fibroin for the repair of buccal mucosa in a rat model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;41(5):673-80.

244. Kohli N, Sawadkar P, Ho S, Sharma V, Snow M, Powell S, et al. Pre-screening the intrinsic angiogenic capacity of biomaterials in an optimised ex ovo chorioallantoic membrane model. *Journal of Tissue Engineering*. 2020;11:2041731420901621.

245. Keshaw H, Thapar N, Burns AJ, Mordan N, Knowles JC, Forbes A, et al. Microporous collagen spheres produced via thermally induced phase separation for tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2010;6(3):1158-66.

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

247. Ghanaati S. Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: a paradigm shift. *Acta Biomater*. 2012;8(8):3061-72.

248. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaíno C, Orlowska A, Willershausen I, Sader R, Miron RJ, et al. Biologization of Collagen-Based Biomaterials Using Liquid-Platelet-Rich Fibrin: New Insights into Clinically Applicable Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2019;12(23).

249. Wang W, Yu Y, Jiang Y, Qu J, Niu L, Yang J, et al. Silk fibroin scaffolds loaded with angiogenic genes in adenovirus vectors for tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(5):715-28.

250. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2005;26(2):147-55.

251. Woloszyk A. The Angiogenic Potential of Human Dental Pulp Stem Cells Cultured on 3D Silk Scaffolds [Dissertation]: Universität Zürich; 2016.

252. Ma L, Dong W, Lai E, Wang J. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024;12.

253. Vishwanath V, Pramanik K, Biswas A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;27(7):657-74.

254. Bhardwaj N, Sow WT, Devi D, Ng KW, Mandal BB, Cho NJ. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering. *Integr Biol (Camb)*. 2015;7(1):53-63.

255. Webb BCW, Glogauer M, Santerre JP. The Structure and Function of Next-Generation Gingival Graft Substitutes-A Perspective on Multilayer Electrospun Constructs with Consideration of Vascularization. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9).

256. Chiu YC, Cheng MH, Engel H, Kao SW, Larson JC, Gupta S, et al. The role of pore size on vascularization and tissue remodeling in PEG hydrogels. *Biomaterials*. 2011;32(26):6045-51.

257. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Miha C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-67.

258. Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *J Biochem*. 2014;156(1):1-10.

259. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*. 2006;10(4):515-27.

260. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163-77.

261. Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaiki Y, Sugihara K, et al. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development*. 2011;138(21):4763-76.

262. Tu F, Liu Y, Li H, Shi P, Hao Y, Wu Y, et al. Vascular Cell Co-Culture on Silk Fibroin Matrix. *Polymers (Basel)*. 2018;10(1).

263. Samal J, Weinandy S, Weinandy A, Helmedag M, Rongen L, Hermanns-Sachweh B, et al. Co-Culture of Human Endothelial Cells and Foreskin Fibroblasts on 3D Silk-Fibrin Scaffolds Supports Vascularization. *Macromol Biosci.* 2015;15(10):1433-46.
264. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 2019;176(6):1248-64.
265. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3(10):721-32.
266. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007;80(2):51-60.
267. Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol.* 1997;108(3):263-8.
268. Wang T, Liu K, Wang J, Xiang G, Hu X, Bai H, et al. Spatiotemporal Regulation of Injectable Heterogeneous Silk Gel Scaffolds for Accelerating Guided Vertebral Repair. *Adv Healthc Mater.* 2023;12(7):e2202210.
269. Arai Y, Lee SH. MMP13-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Enhance Bone Tissue Formation in the Presence of Collagen Hydrogel. *Tissue Eng Regen Med.* 2023;20(3):461-71.
270. Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Tsunematsu T, Kondo T, Subarnbhesaj A, et al. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287(46):38716-28.
271. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, Partridge JJ, Madsen MA, Hahn-Dantona EA, et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood.* 2006;107(1):317-27.
272. Ghanaati S, Schlee M, Webber MJ, Willershausen I, Barbeck M, Balic E, et al. Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix in vivo and its translation to the clinic. *Biomed Mater.* 2011;6(1):015010.
273. Hanjaya-Putra D, Wong KT, Hirotsu K, Khetan S, Burdick JA, Gerecht S. Spatial control of cell-mediated degradation to regulate vasculogenesis and angiogenesis in hyaluronan hydrogels. *Biomaterials.* 2012;33(26):6123-31.
274. Brown J, Lu CL, Coburn J, Kaplan DL. Impact of silk biomaterial structure on proteolysis. *Acta Biomaterialia.* 2015;11:212-21.
275. Jo YY, Kweon H, Kim DW, Kim MK, Kim SG, Kim JY, et al. Accelerated biodegradation of silk sutures through matrix metalloproteinase activation by incorporating 4-hexylresorcinol. *Sci Rep.* 2017;7:42441.
276. Sengupta S, Park SH, Seok GE, Patel A, Numata K, Lu CL, et al. Quantifying osteogenic cell degradation of silk biomaterials. *Biomacromolecules.* 2010;11(12):3592-9.
277. Luttikhuisen DT, van Amerongen MJ, de Feijter PC, Petersen AH, Harmsen MC, van Luyn MJA. The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression. *Biomaterials.* 2006;27(34):5763-70.
278. Hayami T, Kapila YL, Kapila S. MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biology.* 2008;27(8):682-92.
279. Takeda Y, Costa S, Delamarre E, Roncal C, Leite de Oliveira R, Squadrito ML, et al. Macrophage skewing by Phd2 haploinsufficiency prevents ischaemia by inducing arteriogenesis. *Nature.* 2011;479(7371):122-6.
280. Marcinkiewicz E, Marcinkiewicz J, Chłopicki S. Nitric oxide – a pro-inflammatory and anti-inflammatory mediator. *Central European Journal of Immunology.* 2003;28(2):74-8.
281. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2014;35(15):4477-88.
282. Galea E, Feinstein DL. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *Faseb j.* 1999;13(15):2125-37.
283. Jung HJ, Song YS, Lim CJ, Park EH. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *J Ethnopharmacol.* 2009;126(2):355-60.

284. Bliss TW, Dohms JE, Emara MG, Keeler CL. Gene expression profiling of avian macrophage activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005;105(3):289-99.
285. Webb JL, Harvey MW, Holden DW, Evans TJ. Macrophage nitric oxide synthase associates with cortical actin but is not recruited to phagosomes. *Infect Immun*. 2001;69(10):6391-400.
286. Cho YJ, Lee CH, Kim DW, Yoo KY, Eum WS, Shin MJ, et al. Effects of silk solution against laminectomy-induced dural adhesion formation and inflammation in a rat model. *J Neurosurg Spine*. 2018;29(5):599-607.
287. Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, Athanassiadou A, Flordellis C, Maragoudakis ME. Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol*. 2000;129(1):207-13.
288. Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Haralabopoulos G, Andriopoulou P, Peristeris P, Maragoudakis ME. Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator. *Br J Pharmacol*. 1994;111(3):894-902.
289. Kopp A, Schunck L, Gosau M, Smeets R, Burg S, Fuest S, et al. Influence of the Casting Concentration on the Mechanical and Optical Properties of FA/CaCl(2)-Derived Silk Fibroin Membranes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18).
290. Shah R, Thomas R, Gowda TM, Baron TKA, Vemanaradhya GG, Bhagat S. In Vitro Evaluation of Osteoblast Response to the Effect of Injectable Platelet-rich Fibrin Coating on Titanium Disks. *J Contemp Dent Pract*. 2021;22(2):107-10.
291. Kargarpour Z, Nasirzade J, Panahipour L, Miron RJ, Gruber R. Liquid PRF Reduces the Inflammatory Response and Osteoclastogenesis in Murine Macrophages. *Front Immunol*. 2021;12:636427.
292. Blatt S, Schröger SV, Pabst A, Kämmerer PW, Sagheb K, Al-Nawas B. Biofunctionalization of Xenogeneic Collagen Membranes with Autologous Platelet Concentrate-Influence on Rehydration Protocol and Angiogenesis. *Biomedicines*. 2022;10(3).
293. Bai L, Zhang X, Li X, Wang S, Zhang Y, Xu G. Impact of a Novel Hydrogel with Injectable Platelet-Rich Fibrin in Diabetic Wound Healing. *J Diabetes Res*. 2023;2023:7532637.
294. Zhang W, Wang X, Wang S, Zhao J, Xu L, Zhu C, et al. The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF(165) and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials*. 2011;32(35):9415-24.
295. Bienert M, Hoss M, Bartneck M, Weinandy S, Böbel M, Jockenhövel S, et al. Growth factor-functionalized silk membranes support wound healing in vitro. *Biomed Mater*. 2017;12(4):045023.
296. Mubarak R, Adel-Khattab D, Abdel-Ghaffar KA, Gamal AY. Adjunctive effect of collagen membrane coverage to L-PRF in the treatment of periodontal intrabony defects: a randomized controlled clinical trial with biochemical assessment. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):631.
297. Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, Schnaper HW. Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(4):F898-905.
298. Schultz K, Fanburg BL, Beasley D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(6):H2528-34.
299. Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grénman R, Fusenig NE, López-Otín C, et al. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 2:227-35.
300. van Roeyen CR, Ostendorf T, Denecke B, Bokemeyer D, Behrmann I, Strutz F, et al. Biological responses to PDGF-BB versus PDGF-DD in human mesangial cells. *Kidney Int*. 2006;69(8):1393-402.
301. Krismer AM, Cabra RS, May RD, Frauchiger DA, Kohl S, Ahmad SS, et al. Biologic response of human anterior cruciate ligamentocytes on collagen-patches to platelet-rich plasma formulations with and without leucocytes. *J Orthop Res*. 2017;35(12):2733-9.
302. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1993;178(2):605-13.
303. Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Messmer UK, Huwiler A, Pfeilschifter J. Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially regulate interleukin 1 β - and cAMP-

induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(11).

304. Goda S, Inoue H, Kaneshita Y, Nagano Y, Ikeo T, Iida J, et al. Emdogain stimulates matrix degradation by osteoblasts. *J Dent Res*. 2008;87(8):782-7.

305. Jung G, Pang E. Effects of enamel matrix derivatives on the proliferation and the release of growth factors of human periodontal ligament cells. *The Journal of Korean Academy of Prosthodontics*. 2016;45(3).

306. Miron RJ, Bosshardt DD, Zhang Y, Buser D, Sculean A. Gene array of primary human osteoblasts exposed to enamel matrix derivative in combination with a natural bone mineral. *Clin Oral Investig*. 2013;17(2):405-10.

307. Kulakauskienė R, Aukštakalnis R, Šadzevičienė R. Enamel matrix derivate induces periodontal regeneration by activating growth factors: A review. *Stomatologija*. 2020;22(2):49-53.

308. Song ZC, Li S, Dong JC, Sun MJ, Zhang XL, Shu R. Enamel matrix proteins regulate hypoxia-induced cellular biobehavior and osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells. *Biotech Histochem*. 2017;92(8):606-18.

309. Miron RJ, Dard M, Weinreb M. Enamel matrix derivative, inflammation and soft tissue wound healing. *J Periodontal Res*. 2015;50(5):555-69.

310. Yamamichi K, Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Nakao Y, et al. Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway. *Arch Oral Biol*. 2017;83:241-51.

311. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(24-25):3415-28.

312. Chen W, Liu K, Liao X, Wu J, Chen L, Yang Z, et al. Harmonizing Thickness and Permeability in Bone Tissue Engineering: A Novel Silk Fibroin Membrane Inspired by Spider Silk Dynamics. *Adv Mater*. 2024;36(13):e2310697.

313. Seok H, Kim MK, Kim SG, Kweon H. Comparison of silkworm-cocoon-derived silk membranes of two different thicknesses for guided bone regeneration. *J Craniofac Surg*. 2014;25(6):2066-9.

314. Smeets R, Henningsen A, Zernial O, Stürmer E, Fiedler I, Schäfer S, et al. New and innovative biomaterials, techniques and therapy concepts: Biologization in maxillofacial surgery, oral surgery and dentistry is in full swing. PRF, PRGF, PRP, blood plasma-stabilized augmentations, supplementation of micronutrients and vitamins - what opportunities do such "biological" approaches actually offer? We introduce them here. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2022;11:Doc05.

315. Vollrath F, Porter D, Holland C. The science of silks. *MRS Bulletin*. 2013;38(1):73-80.

316. Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. 2015;71:145-57.

317. Thoma DS, Naenni N, Benic GI, Hämmerle CH, Jung RE. Soft tissue volume augmentation at dental implant sites using a volume stable three-dimensional collagen matrix - histological outcomes of a preclinical study. *J Clin Periodontol*. 2017;44(2):185-94.

318. Rossato A, Miguel MMV, Bonafé ACF, Mathias-Santamaria IF, Nunes MP, Santamaria MP. Treatment of single gingival recessions using biofunctionalized collagen matrix: A case series. *Clin Adv Periodontics*. 2023.

319. Santamaria MP, Rossato A, Ferreira Ferraz LF, Bonafé AC, Miguel MMV, Nunes MP. Collagen matrix biofunctionalized with injectable platelet-rich fibrin for the treatment of single gingival recession: A case report. *Clin Adv Periodontics*. 2023;13(2):110-4.

320. Selvaraj S, Inbasekar C, Pandurangan S, Nishter NF. Collagen-coated silk fibroin nanofibers with antioxidants for enhanced wound healing. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2023;34(1):35-52.

321. Cui B, Zhang C, Gan B, Liu W, Liang J, Fan Z, et al. Collagen-tussah silk fibroin hybrid scaffolds loaded with bone mesenchymal stem cells promote skin wound repair in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;109:110611.

322. Jung J, Kwon YD, Park JS. EMD-liquid contributes to tissue thickness gain in soft tissue augmentation using a collagen matrix. *Clin Oral Investig*. 2023.

323. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Zhang Y, Sculean A, Pippenger B, Shirakata Y, et al. Osteogain® loaded onto an absorbable collagen sponge induces attachment and osteoblast differentiation of ST2 cells in vitro. Clin Oral Investig. 2017;21(7):2265-72.

Hilfsmittelverzeichnis

DeepL Write, DeepL SE: <https://www.deepl.com.write>, Neuformulierung von Textstellen

Anhang

Tabelle 19: Protokoll Umschreibung in cDNA.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1	40	-
2	25	5
3	46	20
4	95	1
5	4	bis Entnahme

Tabelle 20: Sequenzen der Primer.

Primer	Beschreibung	NCIB Reference Sequence	Sense	Antisense
cVEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor-A</i>	NM_205042.2	AGAAAGGCCG GTACAAACCA	GCAAGTGCCTCG TTTAACT
cHIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor-1α	NM_204297.1	CCAGCAGTTC CTCATGCAAT	AAATGCTGCTAGCC CTTCCC
cMMP-13	Matrix-Metalloproteinase 13	NM_001293090.1	TTTGGGCTAT GAATGGCTAT	TAGTATGCAGGATG CGGACA
cNOS2	<i>Nitrox Oxide Synthase 2</i>	NM_204961.1	GGCATGATGA GACCCGTAGG	GCCCAATAGCCAC CTTCAGT
RPL4	Ribosomales Protein L4	NM_001007479.1	-	-

Tabelle 21: Protokoll qPCR für RPL4 und VEGF

Schritt	Wiederholungen	Temperatur (°C)	Dauer (min:sek)
Initiale Denaturierung & Aktivierung der Taq-Polymerase	1x	95	10:00
Denaturierung, Annealing, Elongation	39x	95	0:15
		60	1:00
Erstellung der Schmelzkurve	1x	65-95 +0,5	Jeweils 0:05

Tabelle 22: Protokoll qPCR für HIF-1 α , MMP-13, NOS2

Schritt	Wiederholungen	Temperatur (°C)	Dauer (min:sek)
Initiale Denaturierung & Aktivierung der Taq-Polymerase	1x	95	3:00
Denaturierung,	39x	95	0:10
Annealing		58	0:30
Elongation		72	0:20
Erstellung der Schmelzkurve	1x	65-95 +0,5	Jeweils 0:05

Tabelle 23: Zusammensetzung PCR-Bestandteile-Mix

Bestandteil	Volumen (µl)
RT²SYBR®Green Mastermix	12,5
Primer sense	0,5
Primer antisense	0,5
RNase-freies Wasser	10,5

Tabelle 24: Protokoll Einbettautomat Histologie

Schritt	Reagenz	Dauer (h:min)
1	Formaldehyd 4%	1:00
2	70% Ethanol	1:00
3	96 % Ethanol	1:00
4	96% Ethanol	1:00
5	100% Ethanol	1:00
6	100% Ethanol	1:00
7	100% Ethanol	1:30
8	ROTI®Histol	1:00
9	ROTI®Histol	1:00
10	ROTI®Histol	1:30
11	Paraffin	1:00
12	Paraffin	1:00
13	Paraffin	1:00
14	Paraffin	0:30

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich dem stellvertretenden Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die Überlassung des Promotionsthemas und die wertvolle Betreuung während der gesamten Promotionszeit danken.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Betreuerinnen, die mich in allen Phasen dieser Arbeit durch persönliche Beratung und zeitnahe Korrekturen sehr unterstützt haben. Ihre konstruktiven Hinweise und fachlichen Ratschläge haben maßgeblich zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herzlich danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Labors für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz für die Unterstützung bei der Anleitung und Durchführung der labortechnischen Untersuchungen und ihr stets offenes Ohr.

Auch den Mitarbeitern der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik möchte ich für die fachlichen Diskussionen und die Bereitstellung der Laborkapazitäten einen großen Dank aussprechen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die nie an mir gezweifelt und mich immer wieder ermutigt hat, weiterzumachen. Ihre unermüdliche Unterstützung hat wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Timpe Nordby Heidebrecht

Geburtsdatum: 20.03.2001

Geburtsort: Frankfurt am Main

Ausbildung:

06/2011-31/2019 Gymnasium Riedberg Frankfurt; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/2019-11/2024 Studium der Zahnmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; Abschluss: Staatsexamen

Seit 12/2024 Zahnarzt in Weiterbildung in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik an der Universitätsmedizin Mainz

Außercurriculäre Tätigkeiten:

04/2021-09/2022 Hilfwissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie der Universitätsmedizin Mainz

10/2021-03/2022 Hilfwissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Funktionelle und Klinische Anatomie der Universitätsmedizin Mainz

12/2023-03/2024 Pflegehelfer im Zahnärztlichen Notdienst der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz

03/2024-04/2024 Famulatur in der zahnärztlichen Abteilung des Dhulikhel Hospital, Kathmandu University Hospital, Nepal

Forschung:

Seit 04/2022 Doktorand in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz

Sprachkenntnisse:

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (fließend)

Spanisch (Grundkenntnisse)