

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

**Einfluss der Biologisierung mit autologen Thrombozytenkonzentraten und
Hyaluronsäure auf die Vaskularisation und Angiogenese in ovo**

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

Vorgelegt von

Johanna Becker
aus Lahnstein

Mainz, 2025

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

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 24.04.2025

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Ziel der Dissertation	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Ziele der Dissertation	2
2	Literaturdiskussion	3
2.1	Blutgefäße.....	3
2.1.1	Anatomie	3
2.1.2	Vaskulogenese	3
2.1.3	Angiogenese	4
2.2	IKOSA®	5
2.3	Thrombozytenkonzentrate	6
2.3.1	Thrombozyten	6
2.3.2	Geschichte der Thrombozytenkonzentrate	7
2.3.3	Platelet-Rich-Fibrin	8
2.4	Zentrifugationsprotokolle.....	9
2.5	Hyaluronsäure.....	10
2.6	Guide Bone/Tissue Regeneration.....	12
2.7	Kollagenmembranen.....	13
2.8	Biofunktionalisierung von Kollagenmembranen.....	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Material-, Geräte- und Softwareliste	17
3.2	Kollagenmembranen.....	20
3.3	Methoden	21
3.3.1	Herstellung platelet-rich-fibrin und Biologisierung.....	21
3.3.2	Chorio-allantois membrane Assay	22
3.3.3	Entnahme der Membranen und histologische Vorbereitung.....	24
3.3.4	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	25
3.3.5	Alpha-smooth-muscle actin (SMA) Färbung.....	26
3.3.6	CD105 Färbung	27
3.3.7	Auswertung der histologischen Schnitte	28

3.3.8	Auswertung mit IKOSA®.....	29
3.3.9	Statistische Analyse.....	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Mucoderm® Versuchsreihe	31
4.1.1	Immunhistochemische Analyse	31
4.1.2	IKOSA®-Analyse	33
4.2	Bio-Gide® und Smartbrane Versuchsreihe	36
4.2.1	Immunhistochemische Analyse	36
4.2.2	IKOSA®-Analyse	39
4.3	Vergleich Mucoderm®, Bio-Gide® und Smartbrane.....	42
4.3.1	IKOSA®-Analyse	44
5	Diskussion	48
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
5.1.1	Vergleich der Membranen.....	48
5.1.2	Vergleich innerhalb des Zeitverlaufs.....	49
5.2	Evaluation der Studienergebnisse im Vergleich zur bestehenden Literatur	49
5.2.1	Biofunktionalisierung von KM mittels Platelet-Rich-Fibrin.....	49
5.2.2	Biofunktionalisierung von KM mittels Hyaluronsäure.....	52
5.2.3	Native Membranen.....	53
5.3	Limitationen der Studie	54
6	Zusammenfassung	55
7	Literaturverzeichnis.....	56
8	Anhang	63
9	Danksagung.....	79
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	80

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
%	Prozent
3D	dreidimensional
α-SMA	anti-alpha smooth muscle Actin antibody (1A4)
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
API	approximal plaque index
A-PRF	advanced platelet rich fibrin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BM	Bio-Gide® -Membran
Bspw.	beispielsweise
Bzw.	beziehungsweise
CAM	Chorio-allantois membrane
CD105	Immunofluorescence anti-chicken Antikörper
CD40L	CD40-Ligand
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
Dako	marked polymer-HRP anti mouse
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
EPC	endothelial progenitor cell
FGF	fibroblast growth factor
GBR/GTR	guided bone- and tissue regeneration
GCF	gingival crevicular fluid
ggf.	gegebenenfalls
GI	gingival index
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HE	Hematoxylin-eosin
HGF	hepatocyte growth factor
IGF	insulin-like growth factor
Ihh	indian hedgehog

IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
i-PRF	injectable platelet-rich fibrin
i.v.	intravenös
kDA	Kilodalton
KI	Künstliche Intelligenz
KM	Kollagenmembran
LSCC	low speed centrifugation concept (Niedriggeschwindigkeitszentrifugation)
L-PRF	Leukozyten-PRF
MM	Mucoderm®-Membran
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	messenger RNA
N	Fallzahl
NO	Stickstoffmonoxid
NaCl	Natriumchlorid
P-selectin	platelet-selectin
p	Wahrscheinlichkeit
PBI	papillary bleeding index
PDGF	platelet derived growth factor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PF4	platelet factor 4
PGA	polyglycolic acid
PGI2	Prostaglandin I2
pH	pH-Wert
PRF	platelet rich fibrin
PRGF	plasma rich in growth factors
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDF-1	stromal-derived growth factor 1
SM	Smartbrane-Membran

S-PRF	standard platelet rich fibrin
TGF- β	transforming growth factor β
TGF- β R I	transforming growth factor β receptor type I
TGF- β R II	transforming growth factor β receptor type II
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
YSM	yolk sac membrane
z.B	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lagerung der Hühnerembryonen im Brutkasten nach abgeschlossener Vorbereitung.....	23
Abbildung 2: Digitales Mikroskop (KEYENCE, Neu-Isenburg, Germany).....	24
Abbildung 3: Fotodokumentation einer Membran	24
Abbildung 4: Auswertung eines α -SMA-Schnitts, (A) fotografiertes Schnitt, (B) ausgeschnitten, (C) Auswertung mittels BZII-Analyser.....	29
Abbildung 5: Beispielanalyse der IKOSA® CAM Assay Software; (A) ausgewählte ROI (B) links: Eingangsbild; rechts: Ausgangsbild; rote Punkte: Branchingpoints; blau schraffiert: erkannte Gefäße; grüne Linien: Gefäßpfade.....	30
Abbildung 6: Analyse der (A) α -SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung, (C) HE-Färbung für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF) nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.....	33
Abbildung 7: IKOSA®-Analyse der Parameter (A) total area in pixel ² [Px. ²], (B) length in pixels [Px], (C) thickness in pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF) nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.....	36
Abbildung 8: Analyse der (A) α -SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung, (C) HE-Färbung für die jeweilige Membran (BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.	38
Abbildung 9: IKOSA®-Analyse der Parameter (A) total area in pixel ² [Px. ²], (B) length in pixels [Px], (C) thickness in pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints für die jeweilige Membran (BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.	41
Abbildung 10: Analyse der (A) α -SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung, (C) HE-Färbung für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF, BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.	44

Abbildung 11: IKOSA®-Analyse der Parameter (A) total area in pixel ² [Px. ²], (B) length in pixels [Px], (C) thickness in pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF, BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.....	47
Abbildung 12: Tests auf Normalverteilung für die MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF (jeweils α-SMA-Färbung, CD105-Färbung und HE-Färbung) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h, (D), 96 h, (E) 120 h.....	65
Abbildung 13: Mittelwerte, Standard-Abweichung (±) und Vergleich zu 24 h (p) für die MM nativ, A-PRF nativ und MM + A-PRF (jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) für die (A) α-SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung und (C) HE-Färbung. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) % (B) % (C) Anzahl der Gefäße.....	66
Abbildung 14: Tests auf Normalverteilung für die MM nativ, A-PRF nativ und MM + A-PRF (jeweils für die Parameter total area, length, thickness, branchingpoints) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h, (D) 96 h, (E) 120 h.....	69
Abbildung 15: Mittelwerte, Standard-Abweichung (±) und Vergleich zu 24 h (p) für die MM nativ, A-PRF nativ und MM + A-PRF (jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) für die Parameter (A) total area, (B) length, (C) thickness, (D) branchingpoints. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) pixel ² [Px. ²], (B) pixels [Px], (C) pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints.....	71
Abbildung 16: Tests auf Normalverteilung für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils α-SMA-Färbung, CD105-Färbung und HE-Färbung) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h.	73
Abbildung 17: Mittelwerte, Standard-Abweichung (±) und Vergleich zu 24 h (p) für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils α-SMA-Färbung, CD105-Färbung und HE-Färbung) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) % (B) % (C) Anzahl der Gefäße.....	74
Abbildung 18: Tests auf Normalverteilung für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils für die Parameter total area, length, thickness, branchingpoints) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h.	76
Abbildung 19: Mittelwerte, Standard-Abweichung (±) und Vergleich zu 24 h (p) für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h) für die Parameter (A) total area, (B) length,	

(C) thickness, (D) branchingpoints. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) pixel² [Px.²], (B) pixels [Px], (C) pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints. 78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien	19
Tabelle 2: Geräte.....	20
Tabelle 3: Software	20

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

1.1 Einleitung

Biokompatible Kollagenmembranen (KM) werden heutzutage häufig im Bereich der regenerativen Zahnmedizin verwendet. Insbesondere bei der gesteuerten Gewebe- und Knochenregeneration (Guided Tissue Regeneration, GTR; Guided Bone Regeneration, GBR) wird ihnen eine zentrale Rolle zugeschrieben (1). Der für die Geweberegeneration benötigte Raum wird dabei erhalten und ermöglicht das Einwandern parodontaler und osteogener Vorläuferzellen (2). Wesentlich wichtiger ist jedoch die Platzhalter- und Stabilisierungsfunktion, wodurch das Kollabieren von Weichgewebe in den Defekt verhindert und die Akkumulation von Wachstumsfaktoren ermöglicht wird (3). Darüber hinaus müssen die verwendeten Membranen verschiedene biologische und mechanische Qualitäten erfüllen, wie beispielsweise eine hohe Biokompatibilität, bioaktive und antibakterielle Eigenschaften sowie eine einfache Handhabung (4).

Eine der größten Einschränkungen im Rahmen des Tissue Engineering stellt die Barrierefunktion der Membran dar, wodurch das Einsprossen von Gefäßen verhindert werden kann. Es resultiert eine mangelnde oder verzögerte Blutversorgung, was letztlich zum Verlust des Transplantats führen kann (5-7). Folglich ist eine effiziente Vaskularisierung der verwendeten Biomaterialien von zentraler Bedeutung um ein langfristiges Überleben und Funktion zu gewährleisten (8). Möglichkeiten zur Optimierung der Vaskularisierung sind daher Gegenstand zahlreicher Studien. Vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf die Verstärkung pro-angiogener Effekte zeigt die Biofunktionalisierung von KM mittels platelet-rich-fibrin (PRF) (9, 10).

PRF ist ein autologes Thrombozytenkonzentrat und wird am häufigsten in der Zahnmedizin angewandt (11). Es enthält aus Thrombozyten gewonnene Wachstumsfaktoren sowie zahlreiche Botenstoffe wie Zytokine und Hormone. Diese Substanzen tragen maßgeblich zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen bei und können somit die Angiogenese und Geweberegeneration während des gesamten Wundheilungsprozesses positiv beeinflussen (12). Es existieren verschiedene Zentrifugationsprotokolle, welche unter anderem zur Bildung von advanced-PRF (A-PRF) oder injectable-PRF (i-PRF) verwendet werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass A-PRF eine signifikant größere Menge an Wachstumsfaktoren freisetzt als Leukozyten-PRF (L-PRF) (13). Die flüssige i-PRF hingegen enthält im Vergleich zur A-PRF eine gesteigerte Konzentration an Thrombozyten und Leukozyten (14).

Eine wachsende Bedeutung in Hinblick auf die Beeinflussung des Wundheilungsprozesses wird dem Polysaccharid Hyaluronsäure zugeschrieben. Dazu zählen die Verstärkung der Angiogenese, die Verminderung von Entzündungsprozessen sowie die Regulierung des

Kollagenumbaus (15). Studien zeigen bspw. den positiven Einfluss von Hyaluronsäure in der postoperativen Versorgung von Patienten bei zahnärztlichen Eingriffen, wobei unter anderem das Auftreten von Schwellungen und Kieferklemmen minimiert werden konnte (16, 17). Ein weiterer Nutzen wurde im generellen Umgang mit chronisch entzündlichen Gingival- und Parodontalerkrankungen beobachtet (18-20).

1.2 Ziele der Dissertation

Die vorliegende, experimentelle Studie untersucht die Biologisierung von Kollagenmembranen und dessen Einfluss auf die Vaskularisierung und Angiogenese in ovo. Ziel dieser Forschungsarbeit ist die weiterführende Darstellung und Bewertung der Einflüsse der Biologisierung von Kollagenmembranen (KM) mittels A-PRF auf die Vaskularisierung und die Angiogenese der Chorio-allantois membrane (CAM) von Hühner-Embryonen über einen Zeitraum von bis zu 120 h nach Insertion der Membran. Dabei steht die Langzeitbeobachtung bis zu 120 h im Fokus. In einer zweiten Versuchsreihe wird die Vaskularisierung der CAM nach Einlage biologisierter KM mittels i-PRF oder Hyaluronsäure über einen Zeitraum von bis zu 72 h untersucht. Die Quantifizierung angiogener Prozesse erfolgt mit Hilfe der IKOSA® CAM Assay Software (©KML Vision GmbH, Graz, Austria) sowie dem BZII-Viewer und BZII-Analyzer (KEYENCE, Neu-Isenburg, Germany). Die Ergebnisse dieser Studie sollen im klinischen Alltag dabei helfen, fundierte Entscheidungen über die Art der Biofunktionalisierung von KM zu treffen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Blutgefäße

2.1.1 Anatomie

Histologisch betrachtet zeigen Blutgefäße drei Wandschichten – Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia, welche sich jeweils in ihrer Morphologie und Funktion unterscheiden. Die Tunica intima bildet die innerste Schicht und ist aus einer Endothelzellschicht, einer Basallamina sowie einem zellfreien, subendothelialeem Raum aufgebaut. Bei Erwachsenen lassen sich in der Intima von großen Arterien zudem glatte Muskelzellen und gelegentlich Lymphozyten oder Monozyten finden (21). Die Intima fungiert dabei als natürliche Barriere. Sie verhindert sowohl das Eindringen schädlicher Moleküle in die Gefäßwand als auch die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten. Zudem setzen die Endothelzellen bioaktive Substanzen wie bspw. Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandin I₂ (PGI₂) frei. Auf diese Weise können sie den vaskulären Tonus modulieren (22). Angrenzend liegt die Tunica media, deren Hauptbestandteile glatte Muskelzellen und elastische Fasern sind. Abhängig von der Zusammensetzung dieser Bestandteile kann zwischen elastischen oder muskulären Arterien unterschieden werden (23). Die elastischen Fasern erhalten die Struktur der Media und ermöglichen eine Kontraktion. Zudem exprimieren ausgereifte glatte Muskelzellen spezielle kontraktile Proteine, Signalmoleküle und Botenmoleküle, die für die Kontraktion erforderlich sind. Im Zuge der Vaskulogenese produzieren diese Zellen große Mengen an extrazellulärer Matrix wie bspw. Kollagen, Elastin und Integrine (22, 24). Die Tunica adventitia besteht aus Bindegewebe, das die Vasa vasorum, adrenerge Nerven und Lymphgefäße beinhaltet. Der größte zelluläre Anteil wird von Fibroblasten gebildet, begleitet von Vorläuferzellen und Immunzellen wie Makrophagen, B- oder T-Zellen sowie dendritischen Zellen (25). Die Adventitia übernimmt ursprünglich eine Barriere- und Stützfunktion und dient als Gerüst für sympathische Nervenendigungen und Mikrogefäße (26). Heutzutage wird der Tunica adventitia außerdem eine zentrale Rolle bei der vaskulären Entwicklung, Homöostase und Regeneration sowie der Entstehung von Gefäßkrankheiten zugeschrieben (27).

2.1.2 Vaskulogenese

Die Entwicklung des vaskulären Systems im Embryo basiert auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, der Vaskulogenese und Angiogenese. Die Vaskulogenese umfasst die de novo Bildung von Blutgefäßen aus Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs, den Hämangioblasten. Diese bilden sogenannte Blutinseln und differenzieren sich unter anderem zu hämatopoetischen Stammzellen, die im Gefäßlumen lokalisiert sind. Weiterhin entwickeln sich endotheliale Vorläuferzellen, die auch als Angioblasten bezeichnet werden. Diese sind hauptsächlich in der Gefäßwand aufzufinden. Im Verlauf fusionieren die Blutinseln und bilden

den primären Gefäßplexus. Es kommt zur Ausbildung des Endokards des Herzens, der dorsalen und ventralen Aorten sowie der Umbilicalgefäße. Die Vaskularisierung von Organen endodermal-mesodermalen Ursprungs wie bspw. der Lunge oder Milz folgt ebenfalls diesem Prinzip (28-30). Aktuelle Studien belegen zudem die Existenz von endothelial progenitor cells (EPCs) bei Erwachsenen, die aus dem Knochenmark stammen. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Mechanismus der Vaskulogenese nicht nur auf die embryonale Entwicklung beschränkt ist, sondern auch nach der Geburt zur Neovaskularisierung beitragen kann (31, 32). Die molekulare Regulierung erfolgt über verschiedene Signalproteine, wobei anfänglich insbesondere der vascular endothelial growth factor (VEGF) sowie vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) aktiviert sind. Weitere wichtige Regulatoren sind das Tie-1 und Tie-2 Rezeptor-Liganden-System (33), „cloche“ und „spadetail“ Gene (34) sowie das indian hedgehog (Ihh) Signalprotein (35). Zudem wurde der Einfluss von transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) und seinen Rezeptoren (TGF- β R I, TGF- β R II, Endoglin) bei der Vaskulogenese beschrieben (36).

2.1.3 Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt die Bildung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen und ermöglicht eine Modifizierung des bestehenden Gefäßsystems. Die Vaskularisierung von Organen ektodermal-mesodermalen Ursprungs wie bspw. des Gehirns folgt diesem Prinzip (28, 29). Die Angiogenese basiert dabei auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Einerseits erfolgt die Sprossung von neuen Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen, wobei es zur Proliferation und Migration endothelialer Tip-Zellen kommt. Diese befinden sich an den Spitzen der Kapillaren und geben die Wachstumsrichtung der sprossenden Gefäße vor. Zum anderen wird bei der intussuszeptiven Angiogenese eine Gewebesäule im Gefäßlumen bestehender Gefäße gebildet, wodurch diese in zwei neue Gefäße aufgeteilt werden (37, 38). Die Regulierung dieser Prozesse auf molekularer Ebene erfolgt unter anderem durch angiogene Wachstumsfaktoren, darunter fibroblast growth factor 1 und 2 (FGF-1, acidic und FGF-2, basic), transforming growth factor alpha (TGF- α), platelet derived growth factor (PDGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C sowie Interleukin 8 (IL-8). Darüber hinaus wird dem tie/Angiopietin-System und Eph-B/ephrin-B System eine entscheidende Rolle in der Steuerung dieser Mechanismen zugeschrieben (28).

Die Angiogenese ist sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Vorgängen beteiligt (39). Beispielsweise ist die Entwicklung eines funktionalen Blutgefäßsystems während der Wundheilung essenziell. Es ermöglicht den suffizienten Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Beseitigung von Abfallprodukten des Stoffwechsels (40). Die Angiogenese gilt zudem als wichtiger Bestandteil des Ovarialzyklus und des Wachstums von Organen (32). Eine fehlerhafte Angiogenese kann jedoch auch zur Entstehung von

Krankheiten wie Neoplasien, Diabetes, Ischämie oder Hypertonie beitragen. Die Erforschung der zu Grunde liegenden Mechanismen und Regulierungsmöglichkeiten ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse (32, 39).

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Angiogenese bietet der Chorio-allantois membrane Assay (CAM-Assay). Er wird zudem in der Tumorforschung, Pharmakologie, Toxikologie sowie zur Analyse von Gewebetransplantaten angewandt. Die CAM bildet sich bei Vögeln am 4. Tag der Embryonalentwicklung aus der Allantois und dem Chorion und zeigt eine rapide Größenzunahme bis Tag 14. Dabei bildet die Membran ein breites Gefäßsystem aus, wodurch der Gasaustausch sowie die Entsorgung von Abbauprodukten ermöglicht wird. Der CAM-Assay gilt als kostengünstige, einfache und reproduzierbare Methode zur Untersuchung von großen Probenzahlen (29, 41). Auf Grund der fehlenden Innervation der CAM wird angenommen, dass der Embryo bis Tag 12 kein Schmerzempfinden aufweist. In der EU wird der CAM-Assay daher gesetzlich nicht als Tierversuch eingestuft (42, 43).

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Angiogenese in vivo stellt der Yolk sac membrane Assay (YSM-Assay) dar (44). Die YSM entwickelt sich zu Beginn der Embryonalentwicklung aus dem Enddarm und gilt ebenfalls als stark vaskularisiert. An Tag 5 der Inkubation umgibt die YSM den Dottersack vollständig (45, 46). Gleichzeitig beginnt die CAM zunehmend die Atmungsfunktion des YSM-Blutgefäßnetzwerks zu ersetzen (47). Folglich erstreckt sich der YSM-Assay im Vergleich zum CAM-Assay über einen kürzeren Zeitraum und ermöglicht die Untersuchung von früheren Entwicklungsstadien des Hühnerembryos (44).

2.2 IKOSA[®]

Die IKOSA[®] CAM Assay Software (©KML Vision GmbH, Graz, Austria) bietet eine Möglichkeit zur reproduzierbaren Quantifizierung angiogener und anti-angiogener Prozesse. Es handelt sich um eine Deep Learning Anwendung, die auf der IKOSA Plattform (<http://www.ikosa.ai>) verfügbar ist. Mit Hilfe von künstlicher Intelligenz (KI) erfolgt eine schnelle, präzise und automatisierte Analyse des Gefäßnetzwerks ohne vorherige Bildbearbeitung. Zudem können einzelne oder mehrere Regions of Interest (ROIs) ausgewählt und analysiert werden. Als Parameter können die Gesamtanzahl der erkannten Gefäße, Gesamtfläche, Gesamtlänge, durchschnittliche Dicke sowie die Anzahl der Branchingpoints objektiviert werden (48).

Die IKOSA[®] CAM Assay Anwendung erwies sich bspw. als effektive Methode zur Quantifizierung der tumorinduzierten Angiogenese im 3D-in-vivo-Tumormodell (49). Zudem wurde in einer Studie von Salvante et al. (2024) mittels IKOSA[®] CAM Assay die Vaskularisierung von Polymer- und Kollagenscaffolds analysiert (50). Faihs et al. (2022) bezeichneten den Assay als zuverlässiges und praktikables Werkzeug in der

Angiogeneseforschung. Er könnte möglicherweise die Entwicklung neuer anti-angiogener Strategien in der Tumorthherapie unterstützen (51).

2.3 Thrombozytenkonzentrate

2.3.1 Thrombozyten

Thrombozyten stellen nach den Erythrozyten den zweithäufigsten Bestandteil im Blut dar (52) und entstammen von Megakaryozyten aus dem Knochenmark. Die Blutplättchen spielen eine wichtige Rolle in der ersten Phase der primären Hämostase, in der es zur Anheftung, Aktivierung und Aggregation der Zellfragmente kommt. Dieser komplexe Prozess bewirkt eine Blutstillung und bietet die Grundlage für eine Wundheilung. Thrombozyten bilden allerdings nicht nur einen Bestandteil des hämostatischen Systems, sondern beeinflussen auch die Angiogenese, Entzündungsprozesse, virale und bakterielle Abwehrmechanismen sowie die Geweberegeneration (53).

Die Regulierung angiogener Prozesse erfolgt auf vielfältige Weise. Blutplättchen sezernieren α -Granula, die wiederum pro- und anti-angiogene Proteine enthalten (54). Zu den wichtigsten pro-angiogenen Proteinen gehören VEGF, FGF, PDGF, epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) sowie TGF- β (55). Beispielsweise reguliert VEGF-A die Proliferation, Migration und Sekretion endothelialer Zellen (56), während TGF- β das Wachstum von Fibroblasten anregt und somit die Produktion von Kollagen I und III fördert (55, 57). Darüber hinaus können Thrombozyten mit bereits differenzierten Zellen wie Leukozyten, aber auch mit Stammzellen interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass angeheftete Blutplättchen möglicherweise die chemotaktische Stimulation und Ansiedlung endothelialer Vorläuferzellen bewirken und mit hämatopoetischen Stammzellen über PF4 kommunizieren (55). Außerdem sezernieren Thrombozyten Mikropartikel, welche die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördern und zur Ausbildung von Röhrenstrukturen führen (58). Blutplättchen regulieren zudem grundlegende Mechanismen der Geweberegeneration und Reparatur. Die Steuerung der Angiogenese im geschädigten Gewebe spielt dabei eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus setzen Thrombozyten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie bspw. stromal-derived growth factor 1 (SDF-1) und hepatocyte growth factor (HGF) frei, welche die Migration und Proliferation von Fibroblasten, Leukozyten, glatten Muskelzellen und mesenchymalen Stammzellen fördern. Diese Zelltypen sind wesentlich an den Vorgängen der Wundheilung beteiligt. Weiterhin können Blutplättchen das Verhältnis zwischen Apoptose und Zellüberleben beeinflussen und somit die Pathogenese des geschädigten Gewebes steuern (59). Thrombozyten beeinflussen aktiv das Entzündungsgeschehen, indem sie pro-inflammatorische Moleküle wie zum Beispiel P-selectin, CD40L oder Metalloproteinasen

sezernieren. Zusätzlich fördern Thrombozyten die Immunabwehr, indem sie mit Viren und Bakterien interagieren und diese aufnehmen. Die Blutplättchen setzen antimykotische und antimikrobielle Proteine frei und modulieren die Produktion entzündlicher Zytokine (60).

Aktuelle Studien belegen zudem einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und der Entstehung von Neoplasien, Diabetes, Entzündungen, neurologischen Erkrankungen oder kardiovaskulären Erkrankungen (61, 62).

2.3.2 Geschichte der Thrombozytenkonzentrate

Die Anwendung von Thrombozytenkonzentraten geht auf die Entwicklung des Fibrinklebers zurück, welcher die Hämostase und Wundheilung unter Zugabe von Thrombin und Calcium auf natürliche Weise fördert (63). Die adhäsiven Eigenschaften von Fibrin wurden bereits im Jahr 1909 von Bergel beschrieben (64). 1972 dokumentierten Matras et al. erstmalig die Anwendung von Fibrinklebern zur Regeneration von peripheren Nervenfasern im Menschen (65). Diese waren jedoch auf Grund ihrer Herkunft aus großen Plasmabanken oder Krankenhäusern mit einem erhöhten Risiko für die Übertragung viraler Infektionen verbunden. Aus diesem Grund rückte die Anwendung autologer Fibrinkleber in den Vordergrund. Diese brachten jedoch weiterhin die Problematik eines komplexen und teuren Herstellungs- und Verwaltungsprozesses mit sich (63, 66). So musste bspw. die Blutspende der Patienten mindestens drei Tage vor dem geplanten Eingriff vorliegen. Zudem waren strenge Kriterien hinsichtlich Alter, Gewicht, Hämoglobin- und Gesundheitsstatus des Spenders zu erfüllen (67).

In der weiteren Entwicklung entstand Platelet-Rich-Plasma (PRP), eine autologe Modifikation des Fibrinklebers (68). PRP ist ein Plättchenkonzentrat der ersten Generation, das mit bis zu 95 % einen großen Anteil an Thrombozyten aufweist (52). Der Begriff PRP wurde erstmals in der Transfusionsmedizin eingeführt, als Kingsley im Jahr 1954 die Anwendung von PRP zur Behandlung von schweren Thrombopenien beschrieb (69). Im Jahr 1997 dokumentierten Whitman et al. die erfolgreiche Anwendung eines autologen Thrombozytengels in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Dies erforderte die Entnahme von 450 ml Vollblut unmittelbar vor der Operation, ein zweistufiges Zentrifugationsverfahren sowie die Zugabe von Aktivatoren wie bspw. Thrombin (67). Von besonderem Interesse war eine Studie von Marx et al. aus dem Jahr 1998, in der gezeigt werden konnte, dass die Anwendung von PRP das Wachstum und die Dichte von Knochentransplantaten im Vergleich zur Kontrollgruppe fördern konnte (70). Die Verwendung von PRP ging jedoch auch mit Risiken einher. So umfasste die Herstellung unter anderem die Aktivierung mittels Thrombin oder Calciumchlorid, wodurch die Freisetzung der Granula sowie die Quervernetzung von Fibrin induziert wurde. Das häufig zugesetzte Rinderthrombin konnte jedoch einen Anstieg der Antikörper gegen die menschlichen Gerinnungsfaktoren V und XI bewirken und somit Gerinnungsstörungen oder allergische Reaktionen verursachen (52, 63). Weitere Nachteile waren hohe Kosten, lange

Verarbeitungszeiten sowie mangelhafte mechanische Eigenschaften. Dazu zählten bspw. ein niedriges Elastizitätsmodul sowie eine schnelle Fibrinolyse und Auflösung nach Applikation im Gewebe (68). Im Jahr 1999 beschrieb Anitua die Vorteile der Anwendung von plasma rich in growth factors (PRGF) bei der Regeneration von Knochen und Weichgewebe (71). Die Blutplättchen wurden dabei allerdings nur unvollständig aktiviert und es wurden niedrige Level an Wachstumsfaktoren freigesetzt (72).

2.3.3 Platelet-Rich-Fibrin

Im Jahr 2001 entwickelten Choukroun et al. ein autologes Plättchenkonzentrat der zweiten Generation, das als Platelet-Rich-Fibrin (PRF) oder Leukozyten-PRF (L-PRF) bezeichnet wird (66, 73). Im Gegensatz zu PRP wird bei der Herstellung von PRF auf die Zugabe von Antikoagulantien wie bspw. Rinderthrombin verzichtet. PRF gilt somit als rein autologes Thrombozytenkonzentrat. Folglich kann das Risiko einer Immunreaktion und die Übertragung von Krankheiten minimiert werden. Es kommt zur Ausbildung eines gelartigen Fibrinclots (74), der als dreidimensionales Gerüst für Leukozyten und Thrombozyten fungiert (53). Die Sekretion von Wachstumsfaktoren aus den Alpha-Granula der Thrombozyten bildet den grundlegenden Mechanismus der PRF-Therapie (74). Deren förderliche Eigenschaften in Hinblick auf die Wundheilung, Angiogenese und Geweberegeneration wurden bereits in Kapitel 2.3.1 erläutert. Kobayashi et al. (2016) zeigten, dass PRF konstant Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von zehn Tagen freisetzt (13). Daraus ergibt sich ein wesentlicher Vorteil gegenüber PRP, welches bereits innerhalb der ersten Stunde den größten Anteil an Wachstumsfaktoren sezerniert (72). Darüber hinaus weist PRF im Vergleich zu PRP höhere Konzentrationen an Leukozyten auf (53). Leukozyten setzen lymphogene und angiogene Faktoren frei, die an der zellulären Kommunikation während der Geweberegeneration beteiligt sind. Zudem beeinflussen Leukozyten die Interaktion zwischen Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen während der Knochenbildung (75). Zu den weiteren Vorteilen der PRF-Anwendung zählen reduzierte Kosten sowie ein vereinfachtes, standardisiertes Herstellungsprotokoll (siehe Kapitel 2.4) (76).

PRF wird unter anderem in der Dermatologie, Sportmedizin, plastischen Chirurgie, Schmerzmedizin sowie Urologie eingesetzt. In der Mund- und Kieferchirurgie ist die Anwendung von PRF ebenfalls weit verbreitet (53). Dabei steht der positive Effekt von PRF-Membranen auf die weichgewebliche Regeneration im Fokus (77). Roy et al. (2011) zeigten bspw., dass die Anwendung einer PRF-Matrix die Proliferation endothelialer Zellen induzieren und die Angiogenese in chronischen Wunden fördern konnte (78). Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von Titanium-PRF (T-PRF) im Mausmodell während der Wundheilung. Dabei induzierten T-PRF-Membranen die Bildung von neuem Bindegewebe innerhalb eines Zeitraums von 30 Tagen (79). Weiterhin dokumentierten Pathak et al. (2015),

dass die Abdeckung von oberflächlichen Wunden der Mundschleimhaut mit PRF den Wundheilungsprozess fördern konnte (80, 81). Die Anwendung von PRF nach Zahnextraktionen erwies sich ebenfalls als vorteilhaft. Nach der Entfernung der Weisheitszähne konnte bspw. die Häufigkeit einer alveolären Ostitis sowie das Auftreten postoperativer Schmerzen im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert werden. Darüber hinaus kann PRF in der Implantologie zur maxillären Sinusbodenaugmentation genutzt werden (53). In einer Studie von Mazar et al. (2009) wurde PRF als alleiniges Füllmaterial bei lateralen Sinuslift-Operationen mit gleichzeitiger Implantation eingesetzt. Nach 6 Monaten zeigten sowohl radiologische als auch histologische Untersuchungen ein hohes Volumen an natürlich regeneriertem Knochen (82). Zudem wurde die Anwendung von PRF bei der Rekonstruktion von alveolären Spalten untersucht. Die Kombination von PRF mit autologem Knochen führte dabei zu einer signifikant höheren Knochenneubildung als in der Kontrollgruppe (83). In einer Studie von Assad et al. (2017) konnten Mund-Antrum-Verbindungen erfolgreich mit PRF verschlossen werden (84). Außerdem erwies sich PRF bei der Behandlung von Medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen als vorteilhaft. PRF-Membranen könnten demnach als effektive Methode zur Abdeckung von freiliegendem Kieferknochen angesehen werden (85-87). Bei der Rezessionsdeckung hingegen zeigten PRF-Membranen nicht die gleiche Wirksamkeit wie porcine Kollagenmembranen oder Bindegewebs-Transplantate (77). Die Kombination von PRF mit Biomaterialien wie Fibrinklebern, Gelatine-Nanopartikeln oder Kollagenmembranen wird daher in zahlreichen Studien untersucht und zeigt vielversprechende Ergebnisse (88-90).

2.4 Zentrifugationsprotokolle

Das klassische Protokoll zur Herstellung von PRF nach Choukroun et al. erfordert die Entnahme von etwa 10 ml venösem Blut, das in sterilen Glasröhrchen ohne Zugabe von Antikoagulantien gesammelt wird. Die Zentrifugation des Bluts erfolgt bei 2700 Umdrehungen(U)/Minute für eine Dauer von 12 Minuten. Anschließend lassen sich im Glasröhrchen drei verschiedene Schichten erkennen: Oben befindet sich plättchenarmes Plasma, mittig ein PRF-Clot und unten eine Basis aus roten Blutkörperchen. Der Fibrinclot kann entweder direkt verwendet oder bspw. mit Hilfe einer PRF-Box zu einer Membran geformt werden (72).

Im Verlauf wurden verschiedene Modifikationen des ursprünglichen Protokolls entwickelt, um die Eigenschaften von PRF zu optimieren. Ghanaati et al. (2014) beschrieben erstmalig die Herstellung von advanced-PRF (A-PRF). Dabei erfolgt die Zentrifugation in sterilen, glasbasierten Vakuumröhrchen bei 1500 U/Minute für eine Dauer von 14 Minuten. In der Studie wurde unter anderem gezeigt, dass A-PRF im Vergleich zu Standard-PRF (S-PRF) (2700 U/Minute, 12 Minuten) eine höhere Anzahl an Thrombozyten aufweist. Weiterhin konnte

im distalen Teil des Fibrinclots eine höhere Präsenz von neutrophilen Granulozyten festgestellt werden, welche zur Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beitragen. Demensprechend könnte A-PRF im Vergleich zu S-PRF eine bessere Wirkung auf die Regeneration von Hart- und Weichgewebe aufweisen (91). A-PRF setzte zudem eine signifikant größere Menge an Wachstumsfaktoren und Proteinen frei als PRF und PRP, gemessen über einen Zeitraum von bis zu zehn Tagen (13). Fujioka-Kobayashi et al. (2017) entwickelten eine weitere Modifikation, bekannt als A-PRF+ (1300 U/Minute, 8 Minuten). Es konnte gezeigt werden, dass A-PRF+ im Vergleich zu L-PRF und A-PRF signifikant höhere Mengen an Wachstumsfaktoren freisetzt, darunter TGF- β 1, epidermal growth factor sowie insulin-like growth factor. Darüber hinaus wiesen sowohl A-PRF+ als auch A-PRF signifikant höhere Niveaus bei der Proliferation und Migration menschlicher Fibroblasten auf. Gingivale Fibroblasten, die mit A-PRF+ kultiviert wurden, zeigten zudem signifikant höhere Level von PDGF, TGF- β und collagen1 messenger RNA (mRNA) nach drei und sieben Tagen (92). Injectable-PRF (i-PRF) gilt als eine der neusten Entwicklungen im Bereich von PRF-Technologien und wurde erstmals von Mourão et al. im Jahr 2015 beschrieben (93). Das Blut wird in Plastikröhrchen gesammelt, deren hydrophobe Oberfläche eine effiziente Aktivierung von Gerinnungsprozessen verhindert. Nach der Zentrifugation (700 U/Minute, 3 Minuten) zeigt sich i-PRF als gelbliche Schicht im oberen Bereich des Plastikröhrchens und kann anschließend aspiriert werden. Die Möglichkeit zur Injektion stellt einen wichtigen Unterschied im Vergleich zur klassischen PRF dar, die in Form eines Gels vorliegt. I-PRF kommt unter anderem bei Kniegelenksoperationen, Osteoarthritis, Sehnen- und Bandverletzungen, Akne, Haarausfall sowie Facelift-Operationen zum Einsatz. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Biologisierung von Membranen mittels i-PRF oder die Kombination mit Knochentransplantaten. Diese weisen folglich sowohl osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften auf. Es können Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, was eine effizientere Knochenbildung bewirken kann. Zudem kann das Abschwemmen der Transplantate im Gewebe verringert werden, da sie fest in der Fibrinmatrix eingebettet sind (72). Eine Studie von Miron et al. (2017) zeigte, dass i-PRF im Vergleich zu PRP signifikant höhere Level an Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von zehn Tagen freisetzte. I-PRF induzierte zudem eine höhere Fibroblastenmigration und wies höhere Level an PDGF, TGF- β und collagen1 mRNA auf (94). Darüber hinaus zeigte i-PRF im Vergleich zu L-PRF und A-PRF die höchsten Konzentrationen an Thrombozyten und Leukozyten (14).

2.5 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid und gehört zu der Gruppe der Glykosaminoglykane (95). Es besteht aus einer Kette von sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten, die aus den Glucosederivaten β -D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-

Glucosamin gebildet werden (96). HA bildet einen wichtigen Bestandteil des menschlichen Körpers. Sie macht bei einem Erwachsenen mit einem Körpergewicht von 70 kg einen Anteil von etwa 15 g aus (97). HA lässt sich sowohl in der Haut und im Bindegewebe als auch in der Gelenkflüssigkeit, im Glaskörper des Auges oder in der Nabelschnur finden (96). Zu den positiven Eigenschaften zählen bspw. eine hohe Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit und Hydrophilie. Zudem gilt HA als leicht modifizierbar und nicht-immunogen (98). HA kann den Wundheilungsprozess positiv beeinflussen, indem sie die Migration, Proliferation und Adhäsion von Fibroblasten fördert und die Kollagenproduktion stimuliert (99). Studien belegen zudem förderliche Eigenschaften in Hinblick auf die Angiogenese, die einen wichtigen Bestandteil der Proliferationsphase während der Wundheilung darstellt (100, 101). HA wird daher in topischen Formulierungen bei der Behandlung von Hautreizungen, Schürfwunden, Schnitten, Verbrennungen oder Geschwüren eingesetzt (99, 102). Während der Wundheilung nach zahnärztlichen Eingriffen hat sich die Anwendung von HA ebenfalls als vorteilhaft erwiesen. Koray M. et al. (2014) dokumentierten, dass die Anwendung eines Hyaluronsprays nach Entfernung der Weisheitszähne das postoperative Auftreten von Schwellungen und Kieferklemmen minimieren konnte, verglichen mit der Anwendung eines 0,15 % Benzylamin hydrochlorid Sprays (16). Araújo Nobre et al. (2007) untersuchten die Anwendung eines CHX- und HA-Gels nach Implantation und betrachten dabei die Blutungsindizes des umgebenden Hart- und Weichgewebes. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von HA-Gel signifikant niedrigere Blutungsindizes bewirkte, als dies bei der Kontrollgruppe mit CHX-Gel der Fall war. Eine Anwendung von HA in den ersten zwei Monaten der Wundheilungsphase wurde als möglicherweise vorteilhaft angesehen (17). HA gilt außerdem als nützliche adjuvante Therapieoption bei der Behandlung von Gingivitis und Parodontitis. Jentsch et al. (2003) berichteten, dass die topische Anwendung eines 0,2 % HA-Gels den approximal plaque index (API), den papillary bleeding index (PBI) oder Variablen des gingival crevicular fluid (GCF)-Index positiv beeinflussen konnte (19). Weiterhin zeigten Sahayata et al. (2014), dass sich die Applikation eines 0,2 % HA-Gels in Kombination mit Scaling und täglicher Zahnpflege positiv auf den PBI sowie den gingival index (GI) bei der Behandlung von entzündeter Gingiva auswirkte (103). Die topische Anwendung von HA zur Behandlung oraler Ulzera wird ebenfalls diskutiert (20). HA und ihre synthetischen Derivate werden zudem eingesetzt, um Wirkstofftransporte von Arzneimitteln zu optimieren. Die Konjugation von aktiven Wirkstoffen mit HA wird unter anderem zur Entwicklung von Pro-Drugs mit verbesserten chemischen und physikalischen Eigenschaften, erhöhter Stabilität sowie therapeutischer Breite genutzt (99). HA gilt ebenfalls als wichtiger Bestandteil der Tumorforschung. Parashar et al. (2018) beschrieben, dass mit HA modifizierte Naringenin-Polycaprolacton (PCL)-Nanopartikel besser durch die Krebszellen *in vitro* aufgenommen werden konnten. Die Freisetzung von Medikamenten und die Chemoprävention konnte demnach durch die Beschichtung mittels HA

positiv beeinflusst werden (99, 104). Zudem wird HA in kosmetischen Formulierungen wie Gels, Seren oder Emulsionen eingesetzt und gilt als beliebte Methode zur Faltenunterspritzung (99).

2.6 Guide Bone/Tissue Regeneration

Die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration (Guided Tissue Regeneration, GTR; Guided Bone Regeneration, GBR) beschreibt ein weit verbreitetes Verfahren in der Zahnmedizin. Dabei wird unter Anwendung von Leitstrukturen wie bspw. biokompatiblen Kollagenmembranen die Regeneration von geschädigtem Knochen und Gewebe angestrebt (105). In der Theorie fungiert die Membran als physikalische Barriere, welche das Eindringen von Weichgewebe in den Defekt verhindert, während osteogene Vorläuferzellen aus dem angrenzenden Gewebe einwandern können (106). Im Fokus aktueller Studien steht jedoch vielmehr die durch die Barriermembran gegebene Stabilität, wodurch das Kollabieren von Weichgewebe und das Einwandern nicht-osteogener Zellen in den Defekt verhindert wird. Zudem wird die Akkumulation von Wachstumsfaktoren begünstigt (3).

Die Techniken der GBR und GTR basieren ursprünglich auf Studien aus dem Bereich der Parodontologie aus den frühen 1980er-Jahren. So zeigten Nyman S. et al. (1982), dass unter Verwendung eines Millipore-Filters die Regeneration von zuvor verloren gegangenen Gewebe wie Kollagenfasern oder Knochen möglich ist (107). In der Mitte bis Ende der 1980er-Jahre wurde die GTR unter Verwendung von expandierten Polytetrafluorethylen (ePTFE)-Membranen beschrieben (108-110). Diese etablierten sich als Standardmembranen in der weiteren Entwicklung von GTR- und GBR-Techniken (111). Nyman S. et al. (1990) beschrieben erstmals die Technik der GTR zur Regeneration von Alveolarknochen im Zusammenhang mit der Platzierung von Titan-Zahnimplantaten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Platzierung von Teflon-Membranen über Implantaten eine Besiedlung des Defekts mit Zellen, welche nicht aus dem umliegenden Knochengewebe stammen, verhindern konnte (112). Während die GBR zunächst nur bei horizontalen Knochenaugmentationen angewandt wurde, kam sie einige Jahre später auch bei der vertikalen Kammaugmentation (vertical ridge augmentation) zum Einsatz (111, 113).

Bei der Anwendung dieser Techniken traten jedoch auch Komplikationen auf. Dazu zählte die Exposition der Membranen, was ein erhöhtes Infektionsrisiko mit sich brachte. Zudem konnten die Membranen in die Knochendefekte kollabieren. Die Techniken der GBR und GTR sowie die Eigenschaften der verwendeten Membranen wurden daher fortlaufend optimiert (111). So ist bspw. das Spektrum an Membranen, das heutzutage bei der GBR zum Einsatz kommt, sehr umfangreich. Dazu gehören resorbierbare und nicht-resorbierbare synthetische Membranen aus Polyglycolic acid (PGA) und Trimethylencarbonat oder Polytetrafluorethylen

(PTFE). Zudem existieren Membranen xenogenen Ursprungs, wobei die derzeit am häufigsten verwendeten Membranen aus Kollagen bestehen (3). Dabei lassen sich native und kreuzvernetzte Kollagenmembranen unterscheiden. In den nativen Kollagenmembranen bleibt die natürliche Kollagenstruktur des ursprünglichen Gewebes erhalten, was unter anderem eine hohe Zug- und Reißfestigkeit gewährleistet. Der wesentliche Nachteil besteht darin, dass sie im Gewebe schneller abgebaut werden und somit die Knochenregeneration beeinträchtigt werden kann. Um die Widerstandsfähigkeit gegen Abbauprozesse und die Effektivität der Kollagenmembranen zu optimieren, kann eine Vernetzung der vorhandenen Kollagenfasern erfolgen. Dies geschieht bspw. mit Hilfe von ultraviolettem Licht, Glutaraldehyd oder enzymatischer Ribosevernetzung (114).

2.7 Kollagenmembranen

Kollagene sind Proteine, welche mit etwa 30 % den Hauptanteil der Gesamtproteinmasse bei Säugetieren darstellen (115) und einen wesentlichen Bestandteil der Struktur von Haut, Sehnen, Knorpel, Knochen und Blutgefäßen bilden (116). In der Literatur werden 29 verschiedene Kollagentypen unterschieden, welche mit römischen Ziffern von I bis XXIX gekennzeichnet sind (117). Dabei spielen im medizinischen Kontext insbesondere die Kollagentypen I bis V eine wichtige Rolle. Während Typ I Kollagen in der Skelettstruktur, Bändern, Sehnen und der Haut aufzufinden ist, weisen Knorpel- und Augengewebe einen hohen Anteil an Kollagen Typ II auf. Typ III Kollagen stammt von Leber- und Lungengewebe sowie arteriellen Blutgefäßen. Typ IV lässt sich im Nierengewebe auffinden und Typ V ist insbesondere auf der Oberfläche von Zellen und Haaren lokalisiert (118).

Das wichtigste gemeinsame Strukturmerkmal der Kollagene ist eine rechtsgängige Triplehelix, welche aus drei Polypeptidketten aufgebaut ist. Diese sogenannten α -Ketten können je nach Kollagentyp aus 662 bis 3152 Aminosäuren zusammengesetzt sein und bilden Homo- oder Heterotrimere aus. Die α -Ketten weisen repetitive Gly-X-Y Sequenzen auf, wobei die Aminosäuren Prolin und 4-Hydroxyprolin häufig an Position X und Y lokalisiert sind (115). Die Anwesenheit von Glycin an jeder 3. Position ermöglicht eine kompakte Anordnung (119) und ist gemeinsam mit dem hohen Gehalt an Prolin, 4-Hydroxyprolin, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen essentiell für die Stabilität des Kollagenkomplexes (115). Die Anordnung benachbarter Kollagenmoleküle führt zur Ausbildung von Kollagenfibrillen, welche sich abhängig vom jeweiligen Gewebe in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. So sind bspw. vergleichsweise schmale Kollagenfibrillen im Bereich der Cornea in Form eines orthogonalen Gitters angeordnet. Somit kann sowohl ausreichend Stabilität als auch Transparenz gewährleistet werden. Als Bestandteil von Sehnen hingegen sind die Kollagenfibrillen als parallele Bündel aufzufinden und spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Kräften zwischen Muskeln und Knochen (120). Die

Gewinnung von Kollagen erfolgt insbesondere aus natürlichen Tier- oder Pflanzenquellen (118). Dabei stellen Rinderhäute und -sehnen, Schweinehäute oder Rattenschwänze die gängigsten Quellen dar. Darüber hinaus kann Kollagen auch aus maritimen Lebensformen wie Schwämmen oder Fischen gewonnen werden (119). Die Produktion von synthetischem Kollagen bietet eine zusätzliche Perspektive, wobei rekombinante Technologien unter Einsatz von bspw. Bakterien, Hefen oder Insekten verwendet werden (118).

Kollagene weisen eine Vielzahl vorteilhafter Eigenschaften auf, wie bspw. eine hohe Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit, Hydrophilie, eine geringe Immunaktivität, ausgezeichnete mechanische Qualitäten sowie die Fähigkeit, die Geweberegeneration positiv zu beeinflussen. Weiterhin werden den Kollagenen förderliche Eigenschaften hinsichtlich Zelladhäsion, -wachstum, -differenzierung und -migration zugeschrieben. Die Anwendung kollagenbasierter Materialien erfährt daher insbesondere im Bereich der Biomedizin großen Zuspruch. Dort werden sie bspw. in Form von Gels in der Kosmetik, bei Wirkstofftransporten von Medikamenten oder als Glasersatz im Auge eingesetzt. Kollagen-Schwämme finden Anwendung als Wundauflagen, hämostatische Mittel, Hautersatz oder in der starren Knochenreparatur. Als Kollagenmembranen werden sie unter anderem bei der Dialyse, als Hautklebstoffe oder im Bereich der Geweberegeneration genutzt (117). In der regenerativen Zahnmedizin, insbesondere bei Techniken wie der GBR, ist die Anwendung resorbierbarer Kollagenmembranen weit verbreitet (1), weshalb diese im Folgenden genauer beleuchtet werden sollen.

Ein erheblicher Vorteil der resorbierbaren Kollagenmembranen besteht darin, dass auf einen zweiten operativen Eingriff zur Entfernung der Membranen verzichtet werden kann. Dies trägt zur Verringerung der Morbiditätsrate der Patienten bei. Zudem können Kollagenmembranen im Fall einer Exposition zügig resorbiert werden, wodurch das Risiko einer bakteriellen Kontamination und Infektion minimiert wird (114). Ein weiterer Vorteil liegt in ihrer Fähigkeit, den Wundheilungsprozess positiv zu beeinflussen. Dabei fördern sie die Anlagerung von Thrombozyten sowie die Bildung des Fibrinnetzes. Außerdem können sie die chemotaktische Stimulation von Fibroblasten bewirken. Kollagenmembranen verstärken die Verbindung und Anlagerung von Epithel- und Bindegewebszellen auf ihrer Oberfläche und unterstützen somit den Wundverschluss (121). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Kollagenmembranen von Zellen und Knochen freigesetzte Wachstumsfaktoren wie bspw. Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) aufnehmen können und somit die Knochenregeneration fördern.

Resorbierbare Biomaterialien stellen gleichzeitig eine große Herausforderung dar, da die Zeitspanne für die Geweberegeneration mit der Resorptionsdauer der Membran übereinstimmen muss, um eine erfolgreiche Anwendung zu gewährleisten (122). Die Resorptionsdauer kann jedoch in Abhängigkeit von der verwendeten Membran variieren und

ist klinisch nur schwer vorhersehbar (123), was zu Misserfolgen bei der GBR führen kann (122, 124). Darüber hinaus besteht das Risiko, dass die Membranen nicht ausreichend stabil sind und infolgedessen in den Knochendefekt kollabieren. Aus diesem Grund wird in der klinischen Praxis die gleichzeitige Anwendung mit einem autologen, allogenen oder xenogenen Knochentransplantat empfohlen. In Hinblick auf die Knochenregeneration gelten insbesondere autologe Transplantate als vorteilhaft, da sie sowohl osteokonduktive, osteoinduktive als auch osteogenetische Eigenschaften aufweisen. Nachteile sind jedoch eine erhöhte Morbidität sowie ein schneller Abbau im Gewebe (114).

2.8 Biofunktionalisierung von Kollagenmembranen

Eine unzureichende oder verzögerte Blutversorgung nach Transplantation gilt als zentrale Herausforderung im Rahmen des Tissue engineering. Die eingesetzten Biomaterialien fungieren als Gerüste für Zellen, deren Nährstoff- und Sauerstoffbedarf nicht ausschließlich durch Diffusionsprozesse gedeckt werden kann. Folglich ist eine suffiziente Vaskularisierung erforderlich, um ein langfristiges Überleben und Funktion zu gewährleisten (5, 8). Dies gilt ebenfalls für die Anwendung von Kollagenmembranen zur oralen Geweberegeneration (10). Dabei existieren verschiedene Ansätze, um das Einwachsen von Blutgefäßen in die Transplantate zu fördern. So kann bspw. die chemische Struktur der Gerüstmaterialien modifiziert werden oder eine Besiedlung des Transplantats mit Stammzellen erfolgen (8). Eine weitere vielversprechende Methode zur Optimierung pro-angiogener Eigenschaften stellt die Biofunktionalisierung von Kollagenmembranen mittels PRF dar. Eine Studie unserer Forschungsgruppe zeigte, dass PRF die Angiogenese von Kollagenmembranen (Mucoderm®, Jason®, Collprotect®) in vivo und vitro fördern konnte. Dabei wiesen nach 24 Stunden alle biologisierten Membranen ein signifikant erhöhtes pro-angiogenes Potential in vivo auf. Als Parameter wurden die Anzahl der Gefäße pro mm², die Gefäßdichte, die Anzahl der Branchingpoints pro mm² sowie die immunhistochemischen Färbungen CD105 und α -SMA einbezogen (10). Blatt et al. (2022) zeigten zudem, dass die Biofunktionalisierung von Kollagenmembranen mit PRF die Anzahl der Gefäße und Branchingpoints nach 72 Stunden im Vergleich zur nativen YSM signifikant erhöhen konnte (9). In der vorliegenden Studie sollen daher weiterführend die späteren Zeitpunkte (96 Stunden und 120 Stunden) miteinander verglichen werden. Al-Maawi et al. (2019) beschrieben, dass die biologische Aktivität kollagenbasierter Biomaterialien durch die Biofunktionalisierung mit i-PRF gesteigert werden könnte. Die Biofunktionalisierung könnte demnach als effektive Methode betrachtet werden, um die Techniken der GBR und GTR zu optimieren (125) und ist daher ebenfalls Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

Die Kombination von Kollagenmembranen und HA könnte eine weitere Methode zur Optimierung pro-angiogener Eigenschaften darstellen. In einer Studie von Silva et al. (2017)

wurde festgestellt, dass HA keine nachteiligen Auswirkungen auf die Struktur und den Abbau von Kollagenmembranen (BioGide®, OsseoGuard™) aufweist. Dafür wurden Knochendefekte in Ratten mit 1 %-igem Hyaluronsäuregel oder mit Blut (Kontrollgruppe) aufgefüllt und anschließend mit Kollagenmembranen abgedeckt. Es zeigte sich weiterhin, dass die Kombination von BioGide® mit HA nach 60 Tagen zu einer höheren Zellbesiedlung führte als in der Kontrollgruppe (126). Shirakata et al. (2021) dokumentierten, dass vernetzte HA allein oder in Kombination mit Kollagenmatrices die Wundheilung in zweiwandigen Knochendefekten bei Hunden fördern konnte (127). Eine Studie von Kyyak et al. (2022) zeigte, dass die Kombination eines xenogenen Knochenersatzmaterials mit HA eine signifikante Steigerung der Angiogenese in vivo bewirkte (128). Zudem führte die Biofunktionalisierung boviner Knochenersatzmaterialien mit HA zu einer erhöhten Aktivität humaner Osteoblasten und könnte demnach eine vielversprechende Möglichkeit zur Förderung der oralen Knochenregeneration darstellen (129).

3 Material und Methoden

3.1 Material-, Geräte- und Softwareliste

Materialien

Material	Hersteller, Ort
Alpha rabbit 488 (1:100)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Antikörper A2547 Mouse (1:1000)	Firma Sigma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa Spüllösung 1000 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Germany
Bio-Gide®-Membran	Geistlich Biomaterials Vertriebsgesellschaft mbH, Baden-Baden, Germany
CD105 Anti chicken 1.750 Antikörper	Biorbyt, Cambridge, Großbritannien
Dako REAL Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako Denmark 3A/S, Glostrup, Dänemark
Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-mouse	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)(1:1000)	ThermoFischer, Waltham, MA, USA
Deckgläser 24 x 32 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Eosin-Lösung 1%	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, Mainz
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96% vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96,5% vergällt	Martin und Werner Mundo OHG, Mainz, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Eukitt Quick-hardening mountig medium	Firma Sigma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluorescence Mount Medium	Dako, Santa Clara, USA
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
HyaDENT	Regedent AG, Zürich, Schweiz
21G-Kanüle	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
0,9% Kochsalzlösung (NaCl)	Merck, Darmstadt, Germany
Leghorn-Hühnereier	LSL Rhein-Main, Dieburg, Deutschland
Leukosilk S	BSN medical, Hamburg, Deutschland
Leukotape	BSN Medical, Hamburg, Germany
Mucoderm®	Botiss, Zossen, Germany
Objektträger	Diagonal GmbH&Co. KG, Münster
Parafilm	Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland
Paraffin	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany
PBS/BSA 5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS/Goat NS	Dako, Jena, Germany
Peroxidase-Block 5	Dako, Jena, Germany
Polymer-HRP anti-Mouse	Dako, Jena, Germany
Roti®-Histofix 4,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

Smartbrane-Membran	Regedent AG, Zürich, Schweiz
Spritze 10 mL	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Tissue embedding cassettes	Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland
Tissue embedding sponge	Deltalab, S.L., Barcelona, Spanien
Triton-X-100 0,1 %	10ml PBS + 10 µl Triton-X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vacutainersysteme	A-PRF+/i-PRF9, Process for PRF, Nizza, Frankreich
Wasserbad 40° C	Firma Grünewald
weighing paper	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
XyloI (ROTI [®] Histol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

Tabelle 1: Materialien

Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Brutmaschine Modell 3000, Type /d	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg, Deutschland
Duo-Zentrifuge	Process for PRF, Nizza, Frankreich
Einbettautomat "Tissue-Tek VIP 5Jr"	Sakura Finetek, Europe
HistoCare-Autocut	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Mikroskopie und Histologie, Germany
Keyence Biorevo BZ-9000 Mikroskop	Keyence, Neu-Isenburg, Germany
Keyence Digital Microscope VHX-1000 HDR	Keyence, Neu-Isenburg, Germany
Mikrotom 2030	Reichert-Jung, Wien, Österreich

PRF-Box	Process for PRF, Nizza, Frankreich
Sicherheitswerkbank von Heaeus Instruments, Typ HS12	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Tabelle 2: Geräte**Software**

Software	Hersteller
BZ-II Analyzer 1.0	Keyence, Osaka, Japan
BZ-II Viewer	Keyence, Osaka, Japan
Hybrid Cell Count	Keyence, Osaka, Japan
IKOSA® CAM Assay Software	©KML Vision GmbH, Graz, Austria
EndNote X7	Alfasoft GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
SPSS 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
VHX-1000	Keyence, Osaka, Japan

Tabelle 3: Software**3.2 Kollagenmembranen**

Die Mucoderm®-Membran (Botiss, Zossen, Germany) ist eine ca. 1,2 – 1,7 mm dicke Kollagenmembran, die aus Typ I und Typ III Kollagen besteht. Die Kollagenmatrix wird aus porciner Dermis gewonnen, weist keine künstliche Quervernetzung auf und besitzt große Ähnlichkeit zur Kollagenstruktur menschlicher Haut. Die raue und poröse Beschaffenheit der Mucoderm® erleichtert das Einwachsen von Blutgefäßen und Gewebezellen und begünstigt somit eine schnelle Vaskularisierung und Integration. Zur Optimierung der mechanischen Eigenschaften der Mucoderm® wird vom Hersteller eine Rehydrierung für fünf bis zwanzig Minuten in Kochsalzlösung oder Blut empfohlen (130). Aus diesem Grund wurde die Membran für die Versuchsreihen dieser Studie kurz vor Versuchsbeginn für 10 Minuten in 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Merck, Darmstadt, Germany) rehydriert.

Die Bio-Gide® (Geistlich, Baden-Baden, Germany) ist eine Bilayer-Kollagenmembran, die aus porcinem Kollagen Typ I und III gewonnen wird und keine künstliche Quervernetzung aufweist. Während die glatte Seite der Bio-Gide® dem Einwachsen von Weichgewebszellen in den Defekt entgegen wirkt, dient die raue Oberfläche als Leitstruktur für das Einwachsen von Blutgefäßen und Knochenzellen. Die Bio-Gide®-Kollagenmembran kommt unter anderem bei der Ridge Preservation nach Zahnextraktion, bei kleinen und großen Knochenaugmentationen oder Sinusboden-Elevationen zum Einsatz. Dabei wirkt sie sich positiv auf die Knochenregeneration und Gewebeintegration aus (131, 132).

Die Smartbrane-Membran (Regedent AG, Zürich, Schweiz) ist eine native Kollagenmembran, die aus porcinem Perikard hergestellt wird. Das schonende Reinigungsverfahren erhält die natürliche Kollagenmatrix sowie die Kreuzvernetzung der Kollagenfasern. Die Membran weist eine Dicke von < 0,4 mm auf und zeichnet sich durch eine hohe Reißfestigkeit aus. Sie kann im Rahmen der GBR und GTR beim Kieferkammaufbau, Sinuslift, Alveolarkammerhalt nach Zahnextraktion oder zur Behandlung parodontaler Knochendefekte eingesetzt werden (133).

Die Membranen wurden jeweils unter sterilen Bedingungen mit einem sterilen Skalpell in Quadrate der Größe 20 mm² (\pm 0,1 mm) zugeschnitten. Die Messwerte wurden mit Hilfe einer Schieblehre überprüft.

3.3 Methoden

3.3.1 Herstellung platelet-rich-fibrin und Biologisierung

Für die Herstellung von A-PRF wurde einer gesunden Versuchsperson nach Aufklärung und Zustimmung venöses Blut mittels eines speziellen Vacutainer-Systems (A-PRF+, Process for PRF, Nizza, Frankreich) entnommen. Pro Versuchsreihe wurden ungefähr 6 Röhrchen (je 10 ml) benötigt, was einem Blutvolumen von insgesamt 60 ml entsprach. Anschließend erfolgte die Zentrifugation nach Protokoll bei 1300 Umdrehungen/Minute und einer Dauer von 8 Minuten (Duo-Zentrifuge, Process for PRF, Nizza, Frankreich). Im Folgenden konnte der PRF-Clot mit einer sterilen Schere vom übrigen Teil des zentrifugierten Bluts abgetrennt werden. Die A-PRF wurde mit Hilfe eines sterilen PRF-Sets (Process for PRF, Nizza, Frankreich) für 60 Sekunden manuell gepresst und anschließend unter sterilen Bedingungen mit einem sterilen Skalpell in 20 mm² (\pm 0,1 mm) große Stücke geschnitten. Die Vorgehensweise der Blutentnahme für die Herstellung von i-PRF erfolgte analog, allerdings wurden in diesem Fall i-PRF Röhrchen (i-PRF9, Process for PRF, Nizza, Frankreich) verwendet. Die Zentrifugation erfolgte nach Herstellerangaben bei 700 Umdrehungen/Minute und einer Dauer von 3 Minuten (Duo-Zentrifuge, Process for PRF, Nizza, Frankreich). Im Anschluss konnte die i-PRF unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer sterilen Spritze mit 21G-Kanüle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) aspiriert werden.

Die Mucoderm®-Membran wurden zusammen mit der A-PRF mit Hilfe des PRF-Sets (Process for PRF, Nizza, Frankreich) für eine Dauer von 30 Sekunden gepresst. Für die Biologisierung der Bio-Gide® und der Smartbrane-Membran wurde jeweils kurz vor der Auflage ein konstanter Teil Hyaluronsäure (HyaDENT, Regedent AG, Zürich, Schweiz) auf die Membranen gegeben. Zudem wurde die Bio-Gide® mit i-PRF biologisiert.

Die Untersuchungen in dieser Studie erfolgten gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Es wird sich auf die Genehmigung der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Nr. 2019-14705_1) berufen.

3.3.2 Chorio-allantois membrane Assay

Für diese Versuchsreihen wurden befruchtete Leghorn-Hühnereier (LSL Rhein-Main, Dieburg, Deutschland) verwendet. Die Fallzahl in der Mucoderm® Versuchsreihe betrug N = 135 befruchtete Hühnereier insgesamt. Pro Gruppe (native Mucoderm®-Membran (MM nativ), Mucoderm® biologisiert mit A-PRF (MM+A-PRF), native A-PRF (A-PRF nativ)) wurden neun Proben eingeschlossen. Die Fallzahl in der Bio-Gide®/Smartbrane Versuchsreihe betrug N = 60 befruchtete Hühnereier insgesamt und pro Gruppe (native Bio-Gide® (BM nativ), Bio-Gide® biologisiert mit i-PRF (BM+i-PRF), BioGide® biologisiert mit Hyaluronsäure (BM+HA), Smartbrane-Membrane biologisiert mit Hyaluronsäure (SM+HA)) konnten fünf Proben eingeschlossen werden. Die Hühnereier wurden mit destilliertem Wasser (Aquadest) desinfiziert, beschriftet und anschließend in einen Brutkasten (Janeschitz, Hammelburg, Germany) gelegt. Das Gehäuse aus isolierendem Thermalschaumplastik gewährleistete eine konstante Temperatur von 38,3 ° C im Inneren des Inkubators. In dem Brutkasten befand sich ein Gittereinsatz, auf dem die Eier platziert werden konnten. Die Wasserrinnen mussten für den Zeitraum der Inkubation mit destilliertem Wasser befüllt sein, um eine relative Luftfeuchtigkeit von 65 % zu erhalten. Die Kontrolle dieser Parameter erfolgte über eine automatische Temperatur- und Feuchtigkeitsanzeige auf der Oberseite des Inkubators. Der Brutkasten wurde zudem so positioniert, dass er keiner direkten Sonneneinstrahlung oder anderen Wärmequellen ausgesetzt war. Nach jedem beendeten Brutvorgang wurde der Inkubator gründlich gereinigt und desinfiziert.

Die Durchführung der folgenden Schritte erfolgte unter einer sterilen Werkbank (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Nach 72 Stunden wurden die Eier an ihrem spitzen Ende mit einem Klebestreifen beklebt. Dort wurde anschließend mit Hilfe einer Einmalspritze (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) 8-10 ml Eiweiß entnommen und ein weiterer Klebestreifen zum Abdichten angebracht. Auf die Oberseite der Eier wurden jeweils zwei Streifen Leukosilk (BSN medical, Hamburg, Deutschland) aufgeklebt. Somit konnte mit Hilfe einer sterilen Schere eine oval-rundliche Öffnung in die Eierschale geschnitten werden, ohne, dass das Ei zerbricht. Die Schere wurde nach jedem präparierten Ei gründlich desinfiziert.

Abschließend wurde die Öffnung mit einem Stück Parafilm (Cole-Parmer, Wertheim, Deutschland) verschlossen, um den Hühnerembryo vor äußeren Noxen zu schützen. Die Eier verblieben nun zur weiteren Bebrütung im Inkubator.



Abbildung 1: Lagerung der Hühnerembryonen im Brutkasten nach abgeschlossener Vorbereitung

Am 8. Tag der Inkubation wurden die Membranen mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf die CAM aufgelegt. Die Membranen wurden in Gefäßnähe und embryofern positioniert. In der Mucoderm® Versuchsreihe wurden Mucoderm® nativ, A-PRF nativ sowie Mucoderm® biologisiert mit nativer A-PRF verglichen. In der Bio-Gide®/Smartbrane Versuchsreihe erfolgte die Auflage von biologisierter Bio-Gide® mittels i-PRF oder Hyaluronsäure, biologisierter Smartbrane-Membran mittels Hyaluronsäure sowie Bio-Gide® nativ. Anschließend wurde die Öffnung in der Eierschale mit Parafilm verschlossen und die Eier in den Brutkasten platziert.

Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe eines digitalen Mikroskops (KEYENCE, Neu-Isenburg, Germany). Die Aufnahmen in der Mucoderm® Versuchsreihe erfolgten zu den Zeitpunkten 0 h, was jeweils dem Tag der Auflage entsprach, sowie nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. In der Bio-Gide®/Smartbrane Versuchsreihe wurden die Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h sowie 72 h nach Auflage dokumentiert. Auf den Aufnahmebildschirm wurde ein gleichmäßiges Raster aus Quadraten mit einer Seitenlänge von 500 µm gelegt. Die zu untersuchende Membran wurde im Zentrum des Rasters positioniert. Nachdem sowohl die Schärfe als auch die Helligkeit korrekt eingestellt wurden, erfolgten die Aufnahmen in 30-, 50-, und 100-facher Vergrößerung.

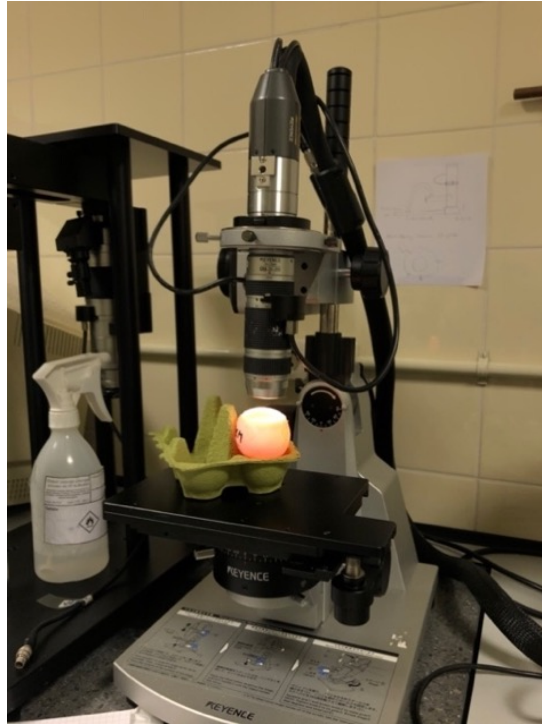


Abbildung 2: Digitales Mikroskop (KEYENCE, Neu-Isenburg, Germany)

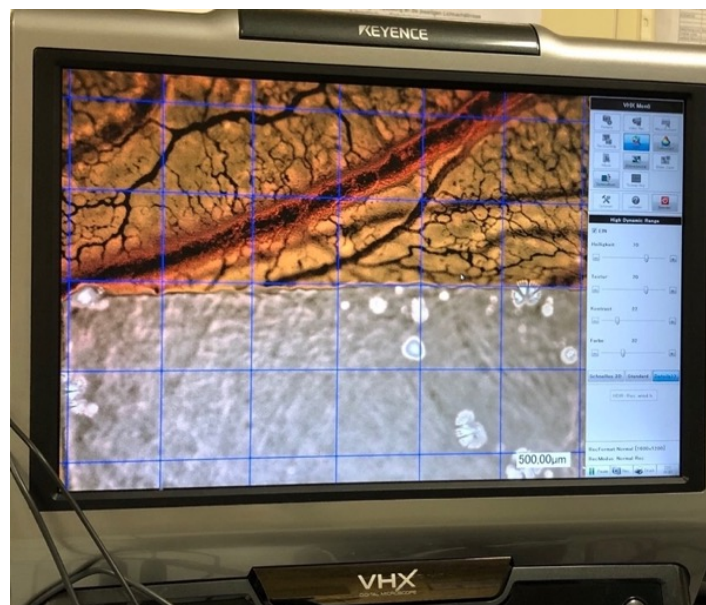


Abbildung 3: Fotodokumentation einer Membran

3.3.3 Entnahme der Membranen und histologische Vorbereitung

Die Membranen wurden gemeinsam mit der CAM mit Hilfe einer sterilen Schere entnommen, auf weighing paper (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) gelegt und in einer Kassette (Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland) eingebettet. Im direkten Anschluss wurden die größten Blutgefäße embryonal durchtrennt. Die Einbettkassetten wurden ab dem

Entnahmezeitpunkt für mindestens 24 Stunden in Roti-Histofix 4,5 % fixiert. Das fixierte Gewebe wurde im histologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universitätsmedizin Mainz geschnitten, in Einbettkapseln positioniert und im Anschluss in den Einbettautomaten („Tissue-Tek VIP 5Jr“, Sakura Finetek Europe) eingefügt. Die folgenden Schritte wurden durchgeführt:

Entwässerung:

- 1x 4,5 % Formaldehyd Roti Histofix 40 Minuten bei Raumtemperatur
- 1x Ethanol 70 % für 60 Minuten bei Raumtemperatur
- 2x Ethanol 96 % für 2x60 Minuten bei Raumtemperatur
- 1x Ethanol 100 % für 2x90 Minuten bei Raumtemperatur
- 3x Ethanol 100 % für 1x90 Minuten bei Raumtemperatur

Intermedium:

- Xylol für 2x60 Minuten bei Raumtemperatur
- Xylol für 1x90 Minuten bei 45 ° C

Einbettung

- Paraffin (3x60 Minuten, 1x30 Minuten bei 65 ° C)

Im Folgenden konnten die Präparate in Blöcken gegossen werden. Diese wurden mit Hilfe des HistoCare-Autocut (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Mikroskopie und Histologie, Germany) in Scheiben mit einer Dicke von 5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend in ein kaltes Wasserbad (Aqua dest.) und in einem weiteren Schritt in ein 40 ° C heißes Wasserbad (Firma Grünwald) überführt. Im nächsten Schritt konnten die Schnitte auf Objektträgern (Diagonal GmbH&Co. KG, Münster) aufgebracht werden. Dabei wurden unbeschichtete Objektträger für die SMA- und HE-Färbungen und beschichtete Objektträger für die CD105-Färbungen verwendet. Im Anschluss wurden die Präparate beschriftet, um eine spätere Zuordnung zu ermöglichen.

3.3.4 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ermöglicht die Darstellung unterschiedlicher Strukturen eines histologischen Schnitts. Hämatoxylin färbt saure Strukturen wie bspw. DNA blau, während Eosin für die rötliche Färbung basophiler Strukturen verantwortlich ist. Dies führt dazu, dass in der Regel die Zellkerne rot und die extrazelluläre Matrix blau dargestellt werden (134). Die Vorbereitung und Färbung der Schnitte erfolgten laut Protokoll wie folgt:

Entparaffinierung:

- 3x 5 Minuten Xylol

- 2x 5 Minuten 100 % Alkohol
- 5 Minuten 96 % Alkohol
- 5 Minuten 70 % Alkohol
- 5 Minuten 50 % Alkohol
- ca. 20 Minuten PBS oder Aqua dest.

HE-Färbung:

- 5 Min Hämalaun 1:10 verdünnt
- 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser
- 1-2 Minuten Eosin
- kurzes Einwirken von Aqua dest.
- 70 % Alkohol kurz
- 96 % Alkohol kurz
- mindestens 5 Minuten 100 % Alkohol
- 5-10 Minuten Xylol
- Eindecken mittels Eukitt

3.3.5 Alpha-smooth-muscle actin (SMA) Färbung

Alpha-smooth-muscle actin ist ein Aktin-Protein, das hauptsächlich von vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird (135) und mittels dieser Färbung nachgewiesen werden kann. Glatte Muskelzellen bilden einen Bestandteil der Tunica Media in Gefäßwänden und gelten daher als Indikator für Blutgefäße (25). Für diese Färbung wurden folgende Schritte durchgeführt:

Entparaffinierung:

- 3x 15 Minuten Xylol
- je 5-10 Minuten absteigende Alkoholreihe: 2x100 %, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol
- 20 Minuten PBS (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Demaskierung:

- 20-40 Minuten im Dampftopf in Na- Citratpuffer pH 6

Färbung:

- 10 Minuten waschen in PBS (Küvette)
- 5 Minuten Peroxidase Block (Dako, Jena, Germany)
- 10 Minuten waschen in PBS
- 10 Minuten DAKO Protein Block (Dako, Jena, Germany)
- nicht abspülen, sondern abtropfen lassen

Primär-Antikörper:

- 1 Stunde bei RT -> ansetzen mit PBS/BSA 1 %

- 3x 10 Minuten waschen in PBS

30 Minuten markiertes Polymer- HRP anti-Mouse (Dako, Jena, Germany)

- 3x 10 Minuten waschen in PBS

5-10 Minuten DAB (1ml DAB Substrat Fl. 3a + 20 µl Liquid DAB + Chromogen)

- 1x 10 Minuten waschen in PBS

5-10 Minuten Hämalaun

- 5 Minuten fließendes Leitungswasser bläuen
- aufsteigende Alkoholreihe 70 %, 96 %
- 5 Minuten Ethanol
- mindestens 5 Minuten Xylol

Eindecken: Eukitt

3.3.6 CD105 Färbung

CD105, auch als Endoglin bekannt, ist ein 180 kDA schweres transmembranes Glykoprotein, das unter anderem auf proliferierenden Endothelzellen exprimiert wird (136). Da der Anteil von Endoglin mit der Bildung neuer Blutgefäße zunimmt, gibt das Protein Aufschluss darüber, ob und in welchem Ausmaß Gewebe einer aktiven Angiogenese unterliegen (137). Für diese Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Schnitte:

- 3x 5 Minuten Xylol
- 2x 5 Minuten 100 % Alkohol
- 5 Minuten 96 % Alkohol
- 5 Minuten 70 % Alkohol
- 5 Minuten 50 % Alkohol
- ca. 20 Minuten PBS oder aqua dest

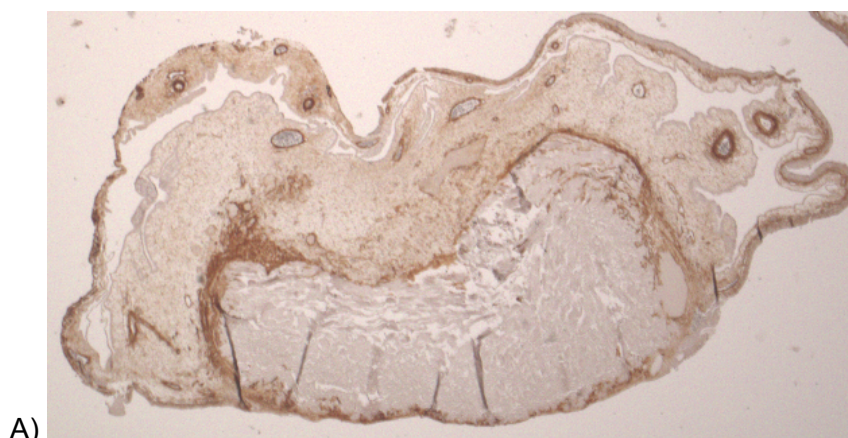
Anschließend wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 3x 5 Minuten PBS waschen
- 5 Minuten Triton-X-100 0,1 % (10ml PBS + 10µl Triton-X-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2x5 Minuten PBS
- 5 Minuten PBS/BSA 5 % blockieren (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2x5 Minuten PBS
- 10 Minuten PBS/Goat NS blockieren (Dako, Jena, Germany)
- 5 Minuten PBS
- CD105 Anti chicken 1:750 Antikörper (Biorbyt, Cambridge, England) 1h RT (verdünnt mit PBS/BSA 1 %)
- 3x 5 Minuten PBS

- 60 Minuten Alpha rabbit 488 1:100 (verdünnt mit PBS/BSA 1 %; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 3x 5 Minuten PBS
- 5 Minuten DAPI (1:1000; ThermoFischer, Waltham, MA, USA)
- 3x 5 Minuten PBS
- Eindecken: Fluoreszenz Mount Medium (Dako S3023; Dako, Jena, Germany)

3.3.7 Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der histologischen Schnitte der α -SMA- und CD105-Färbungen erfolgte mit Hilfe des Keyence Biorevo BZ-9000 Mikroskops (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) und der BZII-Viewer und BZII-Analyzer Anwendung (KEYENCE, Neu-Isenburg, Germany). Die Schnitte wurden zunächst so platziert, dass das Deckglas nach unten ausgerichtet war. Anschließend wurden die Schnitte fotografiert und ausgeschnitten. Die Analyse erfolgte mittels der BZII-Analyzer Anwendung. Über die Funktionen „Hybrid Cell Count“ und „Brightfield & Single extraction“ konnte der Anteil des angefärbten Gewebes als Area ratio in % dargestellt werden. Weiterhin erfolgte eine händische Auszählung der Gefäße im HE-Schnitt. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert.



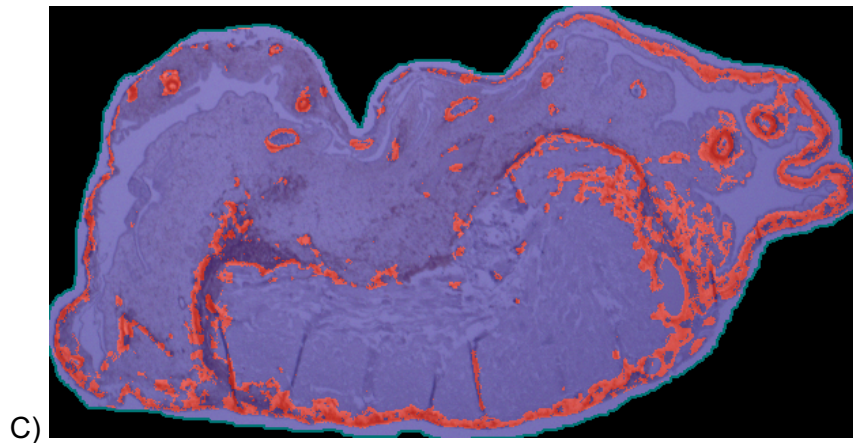
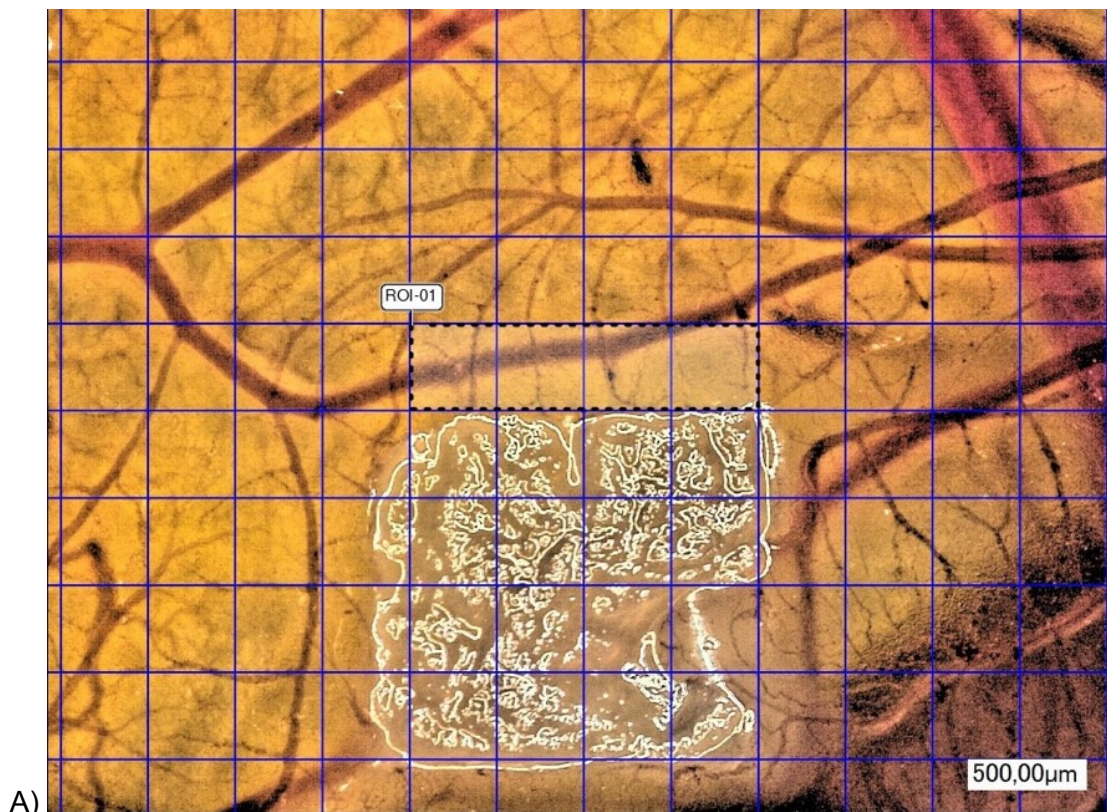


Abbildung 4: Auswertung eines α -SMA-Schnitts, (A) fotografiertes Schnitt, (B) ausgeschnitten, (C) Auswertung mittels BZII-Analyzer

3.3.8 Auswertung mit IKOSA®

Die mit dem digitalen Mikroskop aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe der IKOSA® CAM Assay Software (©KML Vision GmbH) analysiert. Die Bilder wurden zunächst in die entsprechende IKOSA® Datenbank eingefügt und standardmäßig die gleiche Region of Interest (ROI) von $4 \times (500 \times 500) \mu\text{m}$ ausgewählt. Im Anschluss wurden die Gesamtfläche, Länge und Dicke der erkannten Gefäße sowie die Anzahl der Branchingpoints analysiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte in einer Excel-Tabelle.



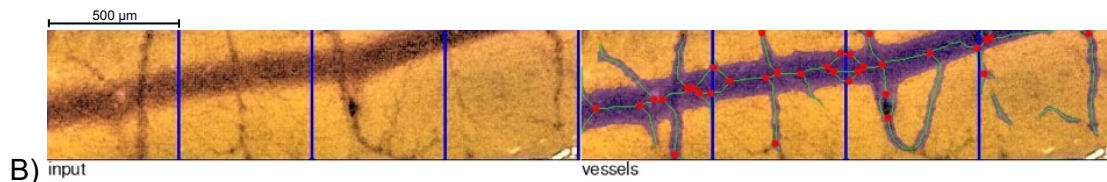


Abbildung 5: Beispielanalyse der IKOSA® CAM Assay Software; (A) ausgewählte ROI (B) links: Eingangsbild; rechts: Ausgangsbild; rote Punkte: Branchingpoints; blau schraffiert: erkannte Gefäße; grüne Linien: Gefäßpfade

3.3.9 Statistische Analyse

Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Version 27; IBM, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Angesichts des explorativen Charakters dieser Studie wurden die zentralen Fragestellungen nicht an die statistischen Anforderungen des multiplen Testens adjustiert. P-Werte $<0,05$ galten als statistisch signifikant. Es wurde zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnov-Test auf ihre Normalverteilung getestet (siehe Anhang). Werte $p>0,05$ galten dabei als signifikant und normalverteilt. Normalverteilte Datensätze wurden im Anschluss mit Hilfe des t-Tests analysiert. Im Falle nicht normalverteilter Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte in Form von Boxplots.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wird für die folgenden Analysen von einer Normalverteilung der Datensätze ausgegangen. Die angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf die Ergebnisse eines t-Tests.

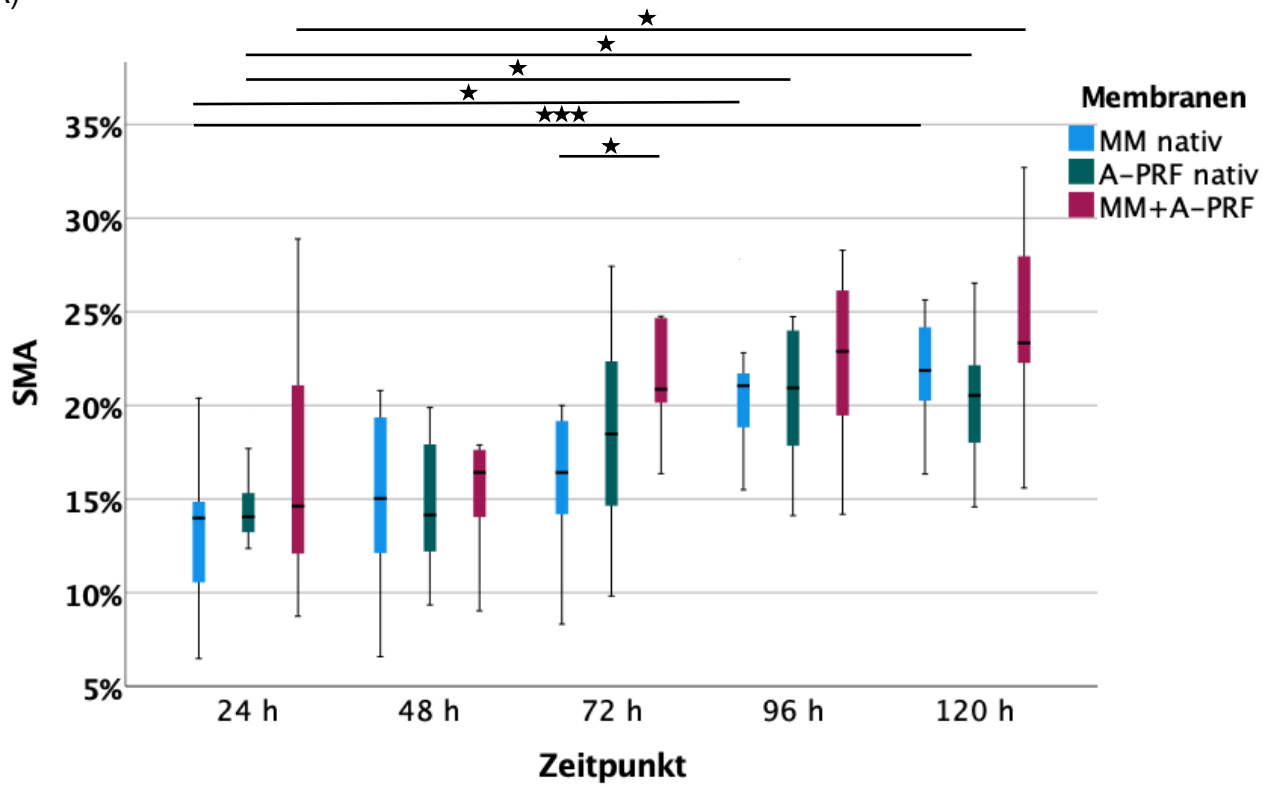
4.1 Mucoderm® Versuchsreihe

4.1.1 Immunhistochemische Analyse

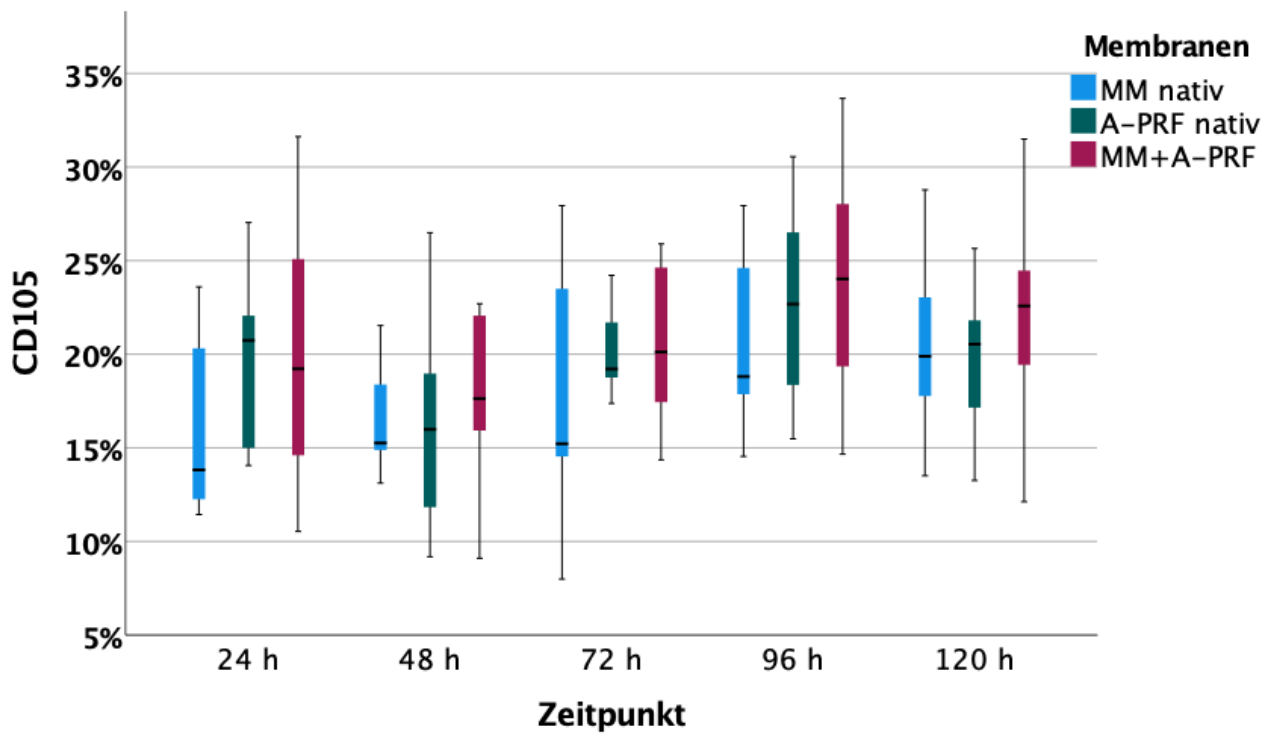
Zwischen den drei Gruppen konnte bei der immunhistochemischen α -SMA-Färbung bei der biologisierten MM zu allen Zeitpunkten ein deskriptiver Anstieg der Gefäßzahl im Vergleich zur nativen MM und A-PRF festgestellt werden. Innerhalb der einzelnen Reihen zeigte die biologisierte MM nach 72 h im Vergleich zur nativen MM ein statistisch signifikant erhöhtes angiogenetisches Potenzial ($p=0,044$). Die CD105-Färbung ließ nach 24 h innerhalb der untersuchten Gruppen den deskriptiv höchsten Anstieg der Gefäßbildung bei der nativen A-PRF erkennen, während nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h die biologisierte MM die höchsten Werte aufwies. In der HE-Färbung zeigten nach 24 h die native A-PRF und biologisierte MM deskriptiv einen höheren Gefäßzuwachs, verglichen mit nativer MM. Nach 48 h verzeichneten die native A-PRF ($p=0,030$) und biologisierte MM ($p=0,045$) einen signifikant größeren proangiogenen Effekt, verglichen mit nativer MM. Gleiches gilt für die native A-PRF ($p=0,005$) und die biologisierte MM ($p<0,001$) zum Zeitpunkt 72 h, verglichen mit nativer MM. Nach 96 h war bei der biologisierten MM eine statistisch signifikant erhöhte Gefäßzahl im Vergleich zu nativer A-PRF ($p=0,048$) sowie nativer MM erkennbar ($p=0,002$). Nach 120 h wies die biologisierte MM deskriptiv die meisten Gefäße auf, verglichen mit den anderen Membranen zum Zeitpunkt 120 h.

Im Zeitverlauf zeigte die biologisierte MM in der α -SMA-Färbung eine statistisch erhöhte Gefäßbildung nach 120 h, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der gleichen Membran ($p=0,016$). Native MM verzeichnete nach 96 h ($p=0,003$) sowie 120 h ($p<0,001$) ein statistisch höheres angiogenetisches Potenzial im Vergleich zum Zeitpunkt 24 h der nativen MM. Native A-PRF zeigte ebenfalls einen signifikant höheren Gefäßzuwachs nach 96 h ($p=0,003$) sowie 120 h ($p=0,002$), verglichen mit Zeitpunkt 24 h der gleichen Membran. In der CD105-Färbung wiesen die biologisierte MM und native A-PRF nach 120 h deskriptiv mehr Gefäße auf, jeweils verglichen mit Zeitpunkt 24 h. Native A-PRF zeigte nach 96 h deskriptiv eine höhere Gefäßzahl als nach 24 h. In der HE-Färbung verzeichnete die native A-PRF nach 72 h ($p=0,004$), 96 h ($p=0,003$) sowie 120 h ($p=0,011$) einen statistisch erhöhten Gefäßzuwachs, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der gleichen Membran. Biologisierte MM wies zu den Zeitpunkten 72 h ($p=0,011$) und 96 h ($p=0,009$) eine erhöhte Gefäßbildung im Vergleich zu 24 h auf. Gleiches gilt für die native MM zu 120 h, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der nativen MM ($p=0,049$).

A)



B)



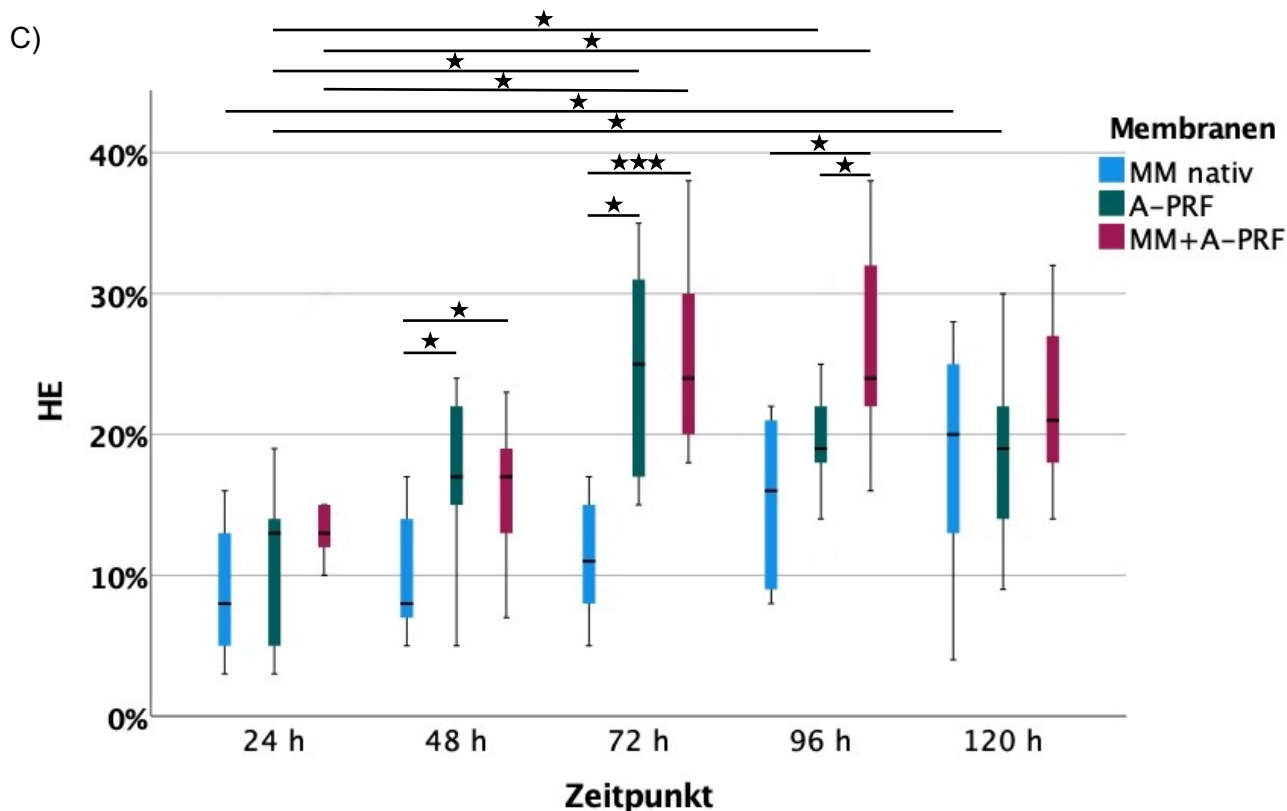


Abbildung 6: Analyse der (A) α -SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung, (C) HE-Färbung für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF) nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.1.2 IKOSA®-Analyse

Bei der IKOSA®-Analyse wurden die Parameter total area, length, thickness sowie Anzahl der branchingpoints bewertet. Dabei ergab sich für die total area nach 24 h der deskriptiv höchste Wert bei der nativen A-PRF, verglichen mit den anderen Membranen. Nach 48 h, 72 h und 96 h wies die biologisierte MM die deskriptiv höchsten Werte für die total area auf. Zudem zeigte die biologisierte MM nach 72 h im Vergleich zur nativen MM eine statistisch größere total area ($p=0,0497$). Zum Zeitpunkt 120 h verzeichnete die native MM den deskriptiv höchsten Wert, verglichen mit nativer A-PRF und biologisierter MM.

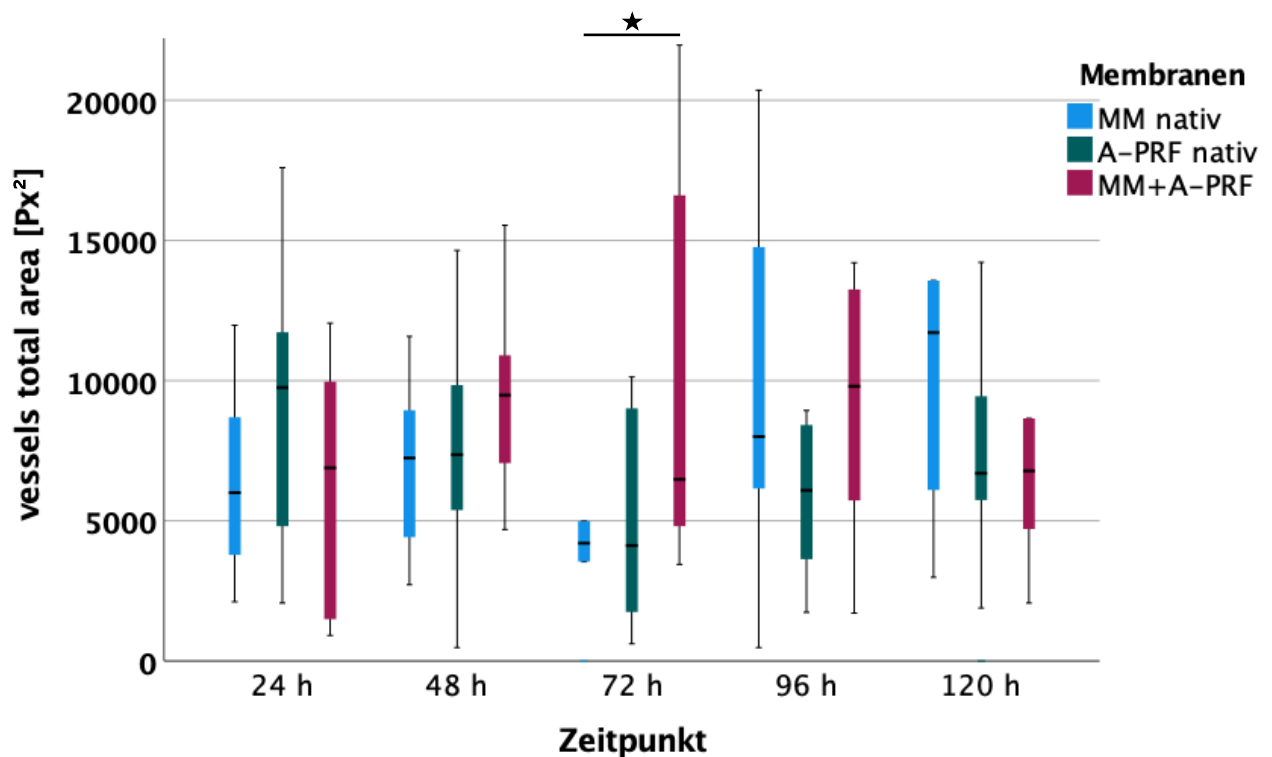
Nach 24 h, 48 h sowie 72 h zeigte die biologisierte MM die deskriptiv höchsten Werte für den Parameter length, verglichen mit nativer A-PRF und nativer MM zu den jeweiligen Zeitpunkten. Nach 96 h und 120 h wies innerhalb der untersuchten Membranen die native MM deskriptiv die größte length auf.

Für den Parameter thickness ließ sich nach 24 h und 120 h der deskriptiv höchste Wert bei der nativen MM feststellen, verglichen mit den anderen Membranen. Zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h zeigte die biologisierte MM im Gruppenvergleich die höchsten Werte.

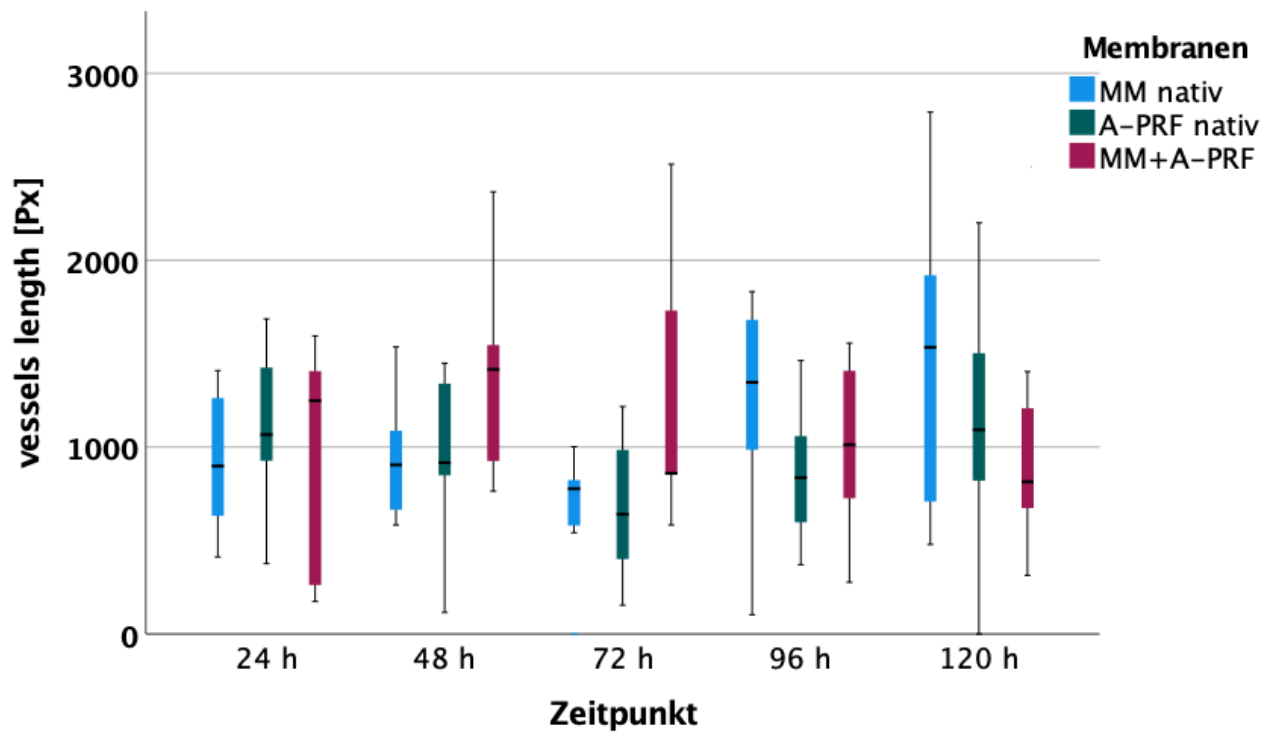
Zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h ließ sich deskriptiv die höchste Anzahl der branchingpoints bei der biologisierten MM feststellen, verglichen mit nativer MM und nativer A-PRF. Nach 96 h und 120 h wies die native MM die höchsten Werte auf, verglichen mit den anderen beiden Gruppen.

Im Zeitverlauf zeigte die native MM nach 120 h deskriptiv höhere Werte für die Parameter total area, length, thickness und branchingpoints, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der gleichen Membran. Native A-PRF zeigte im Zeitverlauf keine deskriptive Zunahme der Werte für die untersuchten Parameter. Biologisierte MM zeigte einen statistisch signifikant erhöhten Wert für den Parameter thickness zum Zeitpunkt 96 h, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der biologisierten MM ($p=0,035$).

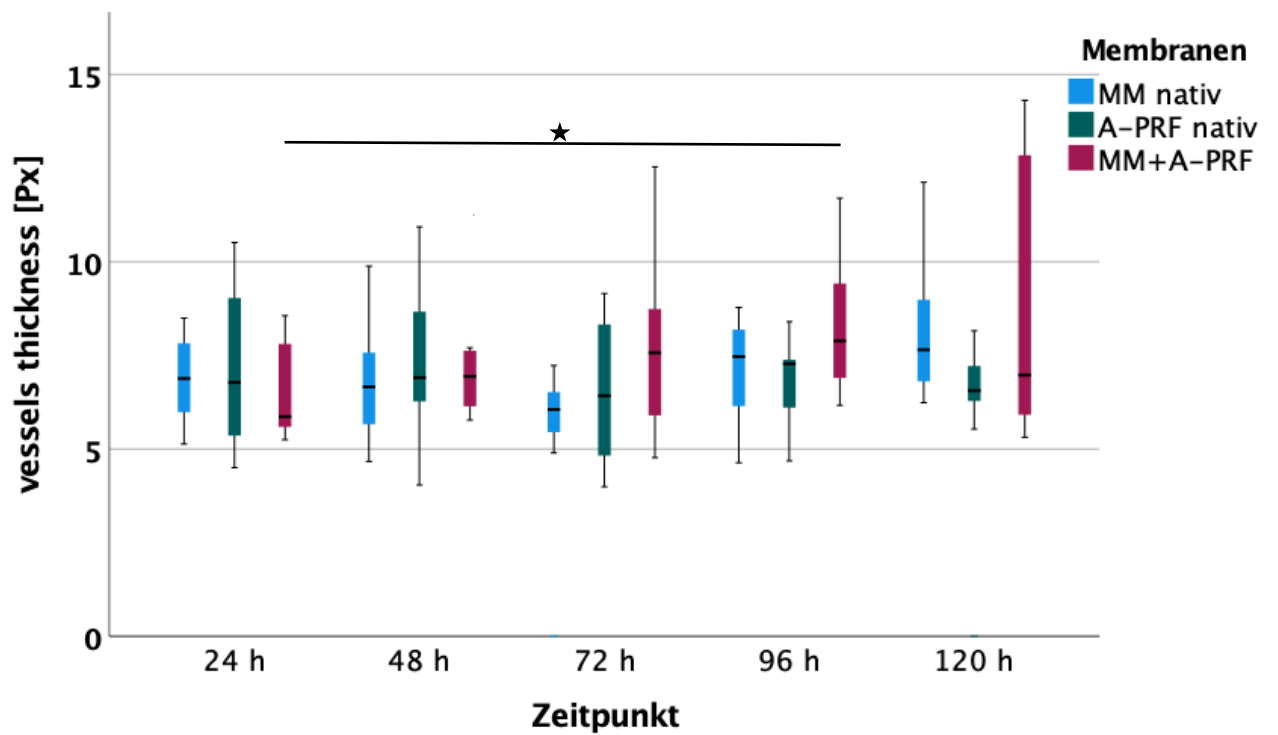
A)



B)



C)



D)

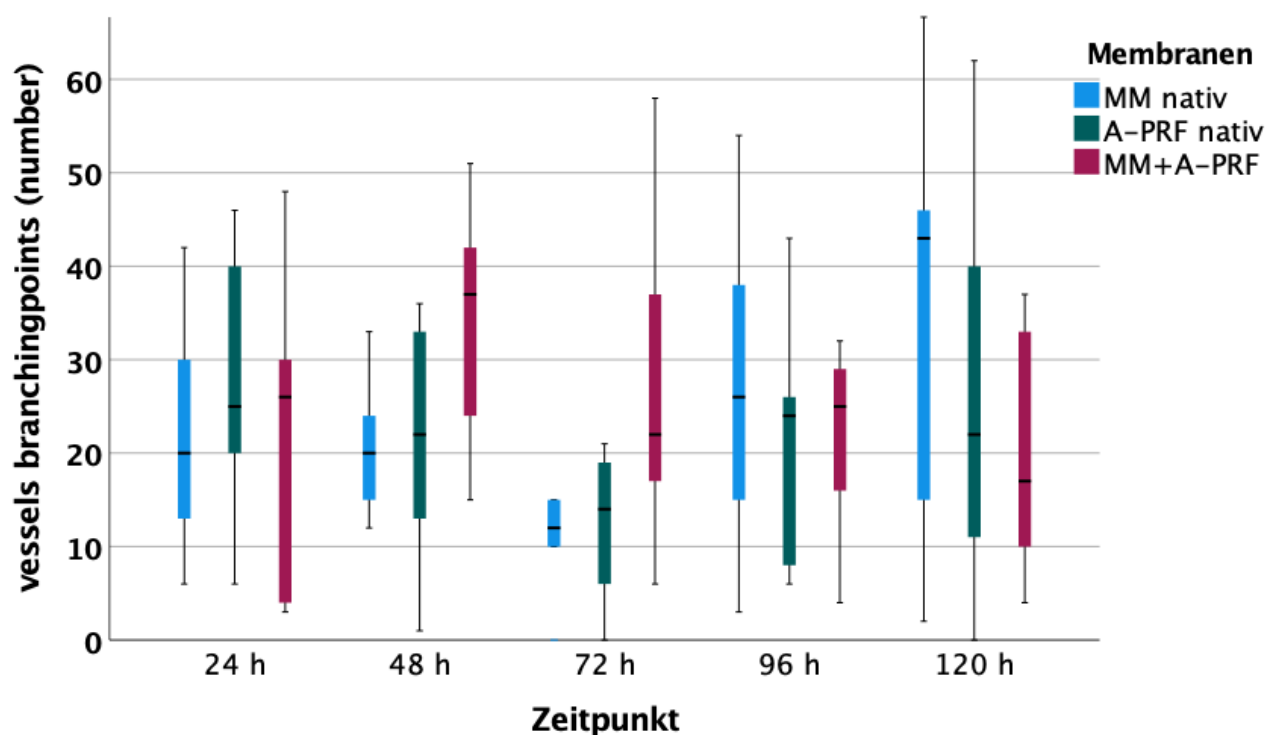


Abbildung 7: IKOSA®-Analyse der Parameter (A) total area in pixel² [Px.²], (B) length in pixels [Px], (C) thickness in pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF) nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <math>p<0,05</math>, ** <math>p<0,01</math>, *** <math>p<0,001</math>.

4.2 Bio-Gide® und Smartbrane Versuchsreihe

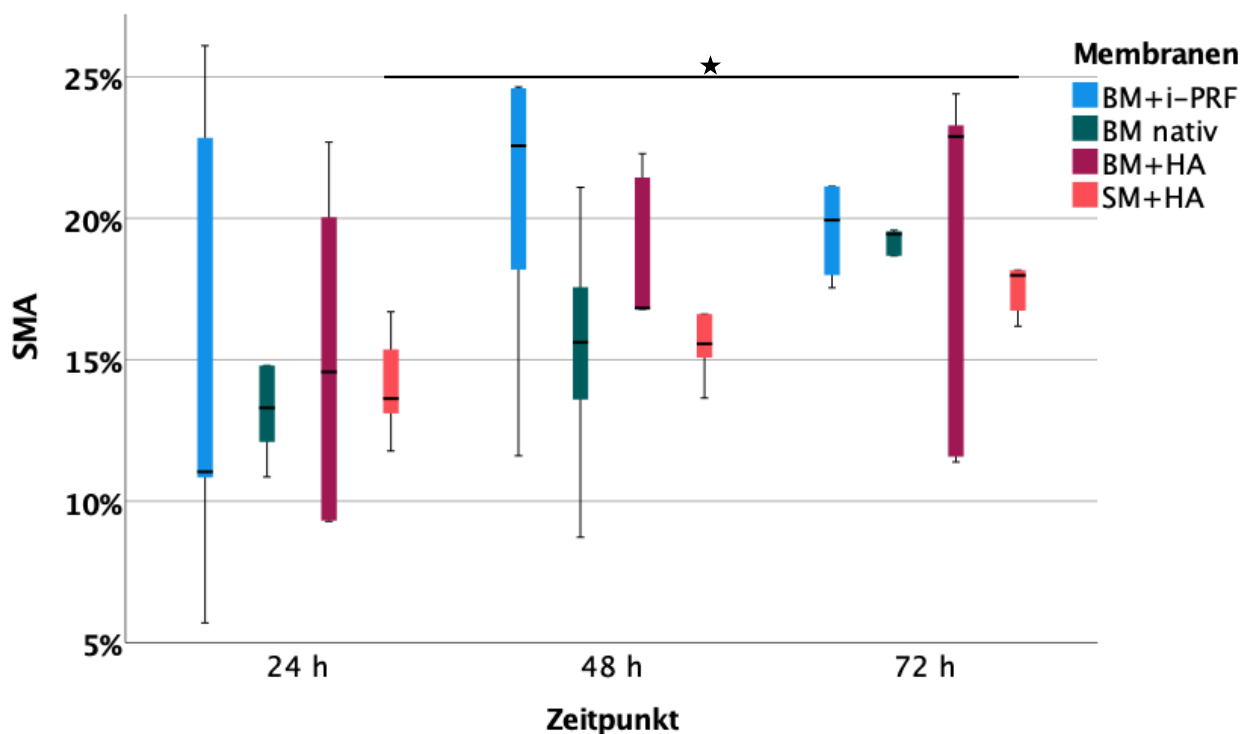
4.2.1 Immunhistochemische Analyse

In der α -SMA-Färbung zeigte sich innerhalb der vier Gruppen nach 24 h und 72 h deskriptiv das höchste angiogenetische Potenzial bei der biologisierten BM mit HA. Nach 48 h wies die BM mit i-PRF deskriptiv die höchste Gefäßbildung auf, verglichen mit den anderen Membranen zum selben Zeitpunkt. Die CD105-Färbung zeigte nach 24 h für die native Bio-Gide® deskriptiv den höchsten Anstieg der Gefäße, verglichen mit BM mit HA und BM mit i-PRF. Im Vergleich zu biologisierter SM wies die native BM nach 24 h eine signifikant höhere Gefäßzahl auf ($p=0,034$). Im Gruppenvergleich verzeichnete nach 48 h und 72 h die BM mit i-PRF den deskriptiv höchsten Gefäßzuwachs. In der HE-Färbung zeigte sich nach 24 h die deskriptiv größte Gefäßzahl bei der BM biologisiert mit i-PRF, verglichen mit den anderen Gruppen. BM mit i-PRF ($p=0,018$) und native BM ($p<0,001$) wiesen nach 24 h einen signifikant höheren Gefäßzuwachs als BM mit HA auf. Nach 48 h und 72 h verzeichnete die SM mit HA die deskriptiv höchste Gefäßzahl im Vergleich zu den anderen Membranen. Zudem zeigte die SM

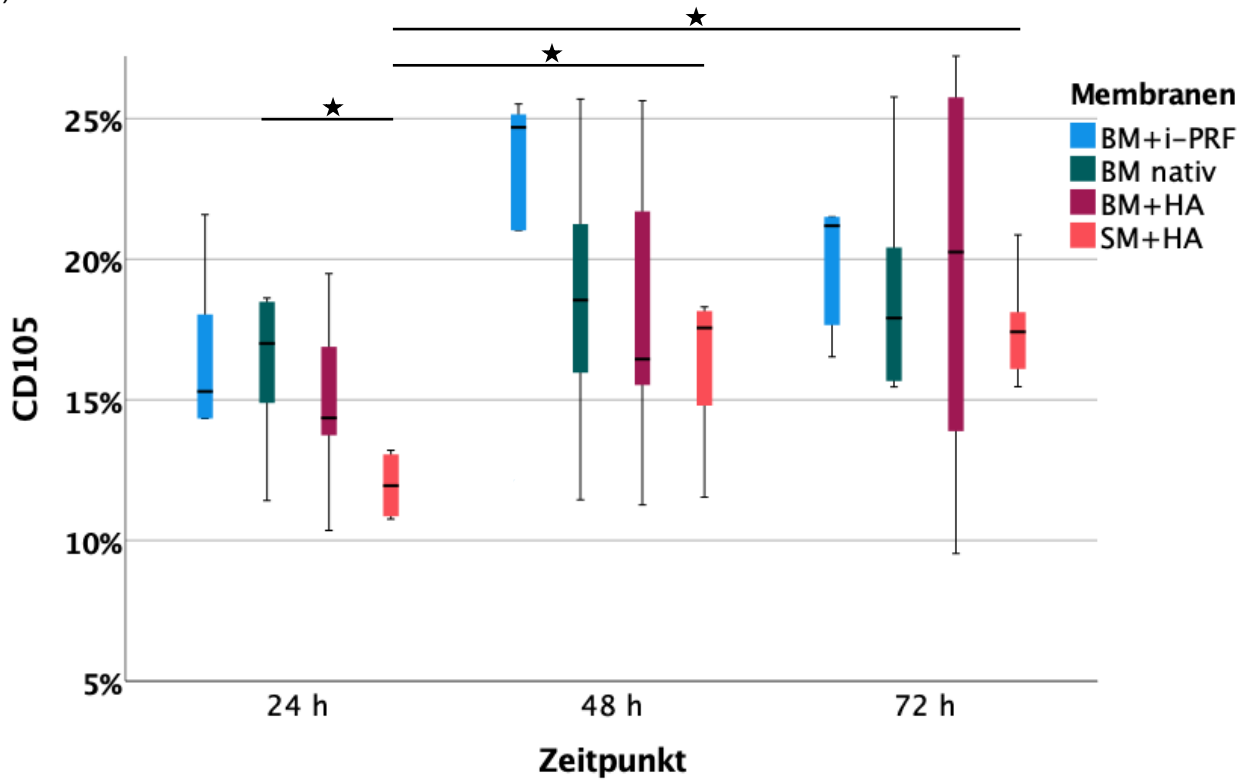
mit HA nach 72 h eine statistisch signifikant erhöhte Gefäßbildung im Vergleich zur nativen BM ($p=0,034$).

Im Zeitverlauf zeigte sich bei der α -SMA-Färbung für die native BM, BM mit i-PRF sowie BM mit HA ein deskriptiver Anstieg der Gefäßzahl zum Zeitpunkt 72 h, jeweils verglichen mit Zeitpunkt 24 h der gleichen Membran. Biologisierte SM verzeichnete nach 72 h einen signifikant größeren proangiogenen Effekt im Vergleich zu 24 h ($p=0,024$). Die CD105-Färbung zeigte jeweils für BM mit i-PRF, BM mit HA sowie SM mit HA einen deskriptiven Anstieg der Gefäße zum Zeitpunkt 72 h, verglichen mit 24 h der gleichen Membran. BM mit i-PRF zeigte im Zeitverlauf zu 48 h den deskriptiv höchsten Gefäßzuwachs. SM mit HA verzeichnete nach 48 h ($p=0,031$) und 72 h ($p=0,002$) eine signifikant erhöhte Gefäßbildung, verglichen mit 24 h der gleichen Membran. In der HE-Färbung wies BM biologisiert mit HA zum Zeitpunkt 72 h ein statistisch signifikant erhöhtes angiogenetisches Potenzial auf, verglichen mit Zeitpunkt 24 h ($p=0,014$). SM mit HA zeigte nach 72 h im Vergleich zu 24 h eine deskriptive Zunahme der Gefäßbildung. BM nativ und BM mit i-PRF hingegen wiesen im Zeitverlauf deskriptiv keine Erhöhung der Gefäßzahl auf.

A)



B)



C)

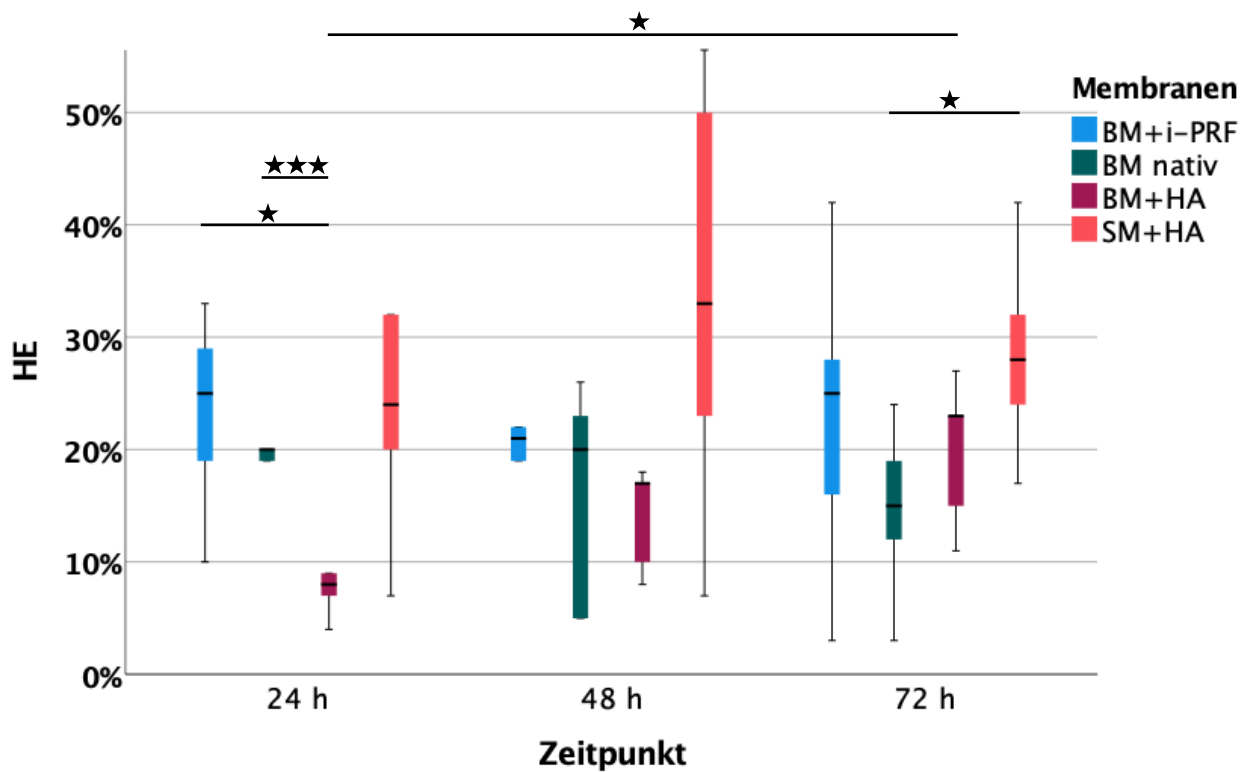


Abbildung 8: Analyse der (A) α -SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung, (C) HE-Färbung für die jeweilige Membran (BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.2 IKOSA®-Analyse

Nach 24 h und 48 h zeigte die BM biologisiert mit i-PRF deskriptiv die größte total area, jeweils verglichen mit den anderen Membranen zum selben Zeitpunkt. Nach 72 h verzeichnete die BM mit HA deskriptiv den höchsten Wert für den Parameter total area im Vergleich zu nativer BM, BM mit i-PRF sowie SM mit HA.

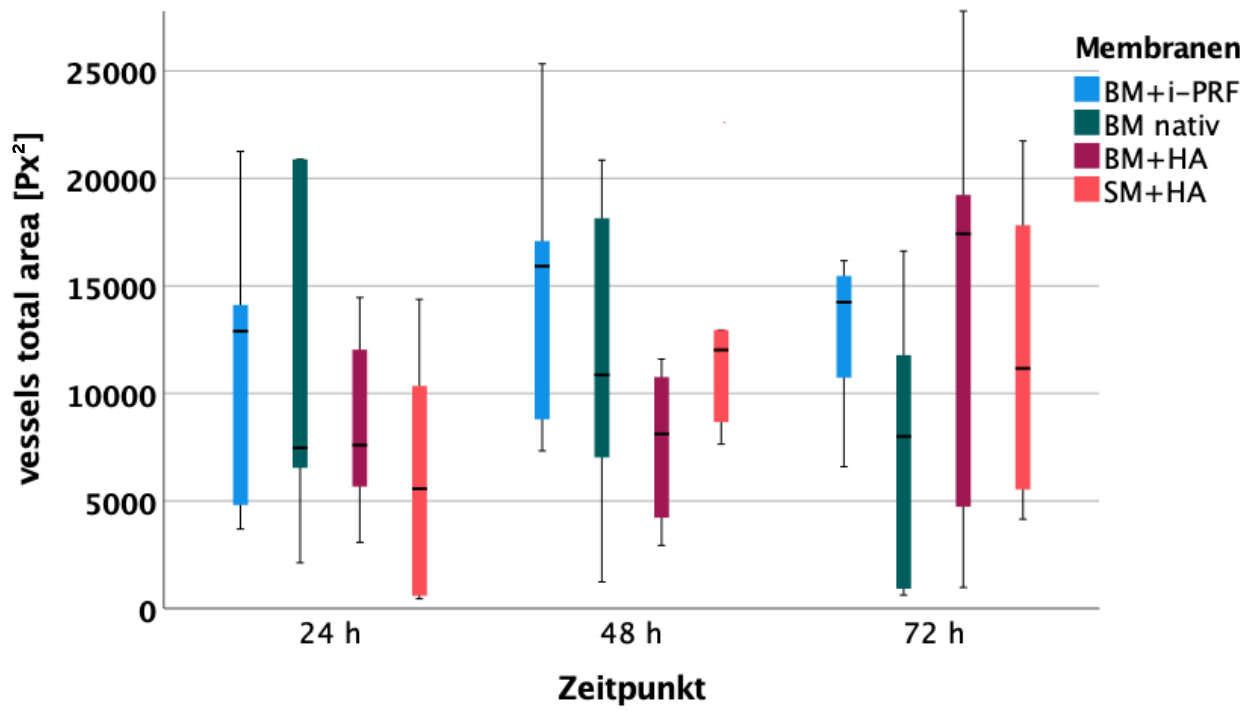
Im Gruppenvergleich zeigte sich für den Parameter length nach 24 h der deskriptiv höchste Wert für die BM mit i-PRF. Zum Zeitpunkt 48 h wies die SM mit HA den deskriptiv größten Anstieg auf, während nach 72 h die BM mit HA den höchsten Wert verzeichnete.

Zum Zeitpunkt 24 h zeigten innerhalb der untersuchten Gruppen die BM mit i-PRF und BM mit HA deskriptiv die höchsten Werte für den Parameter thickness. Nach 48 h wies die native BM den deskriptiv größten Wert auf und nach 72 h ließ sich der höchste Anstieg bei der BM mit HA feststellen.

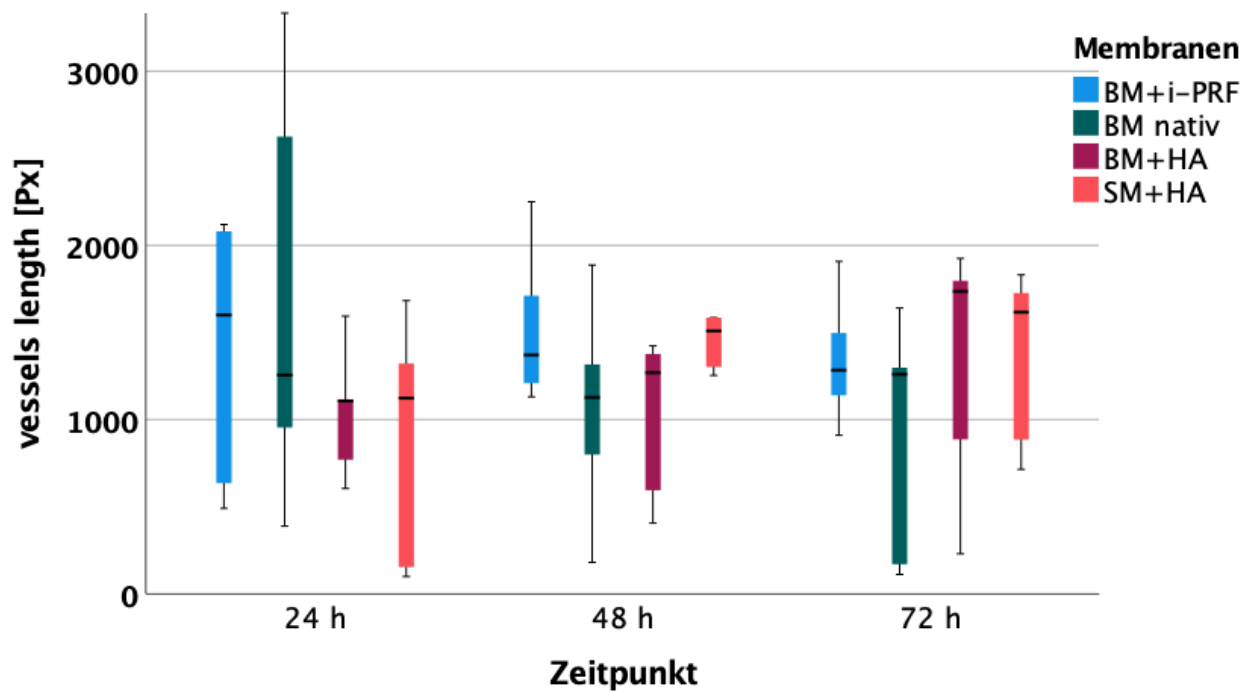
BM mit i-PRF verzeichnete innerhalb der vier Gruppen nach 24 h und 48 h die deskriptiv größte Anzahl der branchingpoints. Nach 72 h zeigte die SM mit HA den höchsten Anstieg für den Parameter branchingpoints, verglichen mit den anderen Membranen zum selben Zeitpunkt.

Im Zeitverlauf wies die BM mit i-PRF nach 72 h deskriptiv eine Zunahme der Werte für die Parameter total area und thickness auf, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der gleichen Membran. BM mit HA und SM mit HA zeigten nach 72 h deskriptiv erhöhte Werte für alle Parameter, jeweils verglichen mit Zeitpunkt 24 h. Native BM zeigte im Zeitverlauf deskriptiv keinen Anstieg der Werte für die untersuchten Parameter.

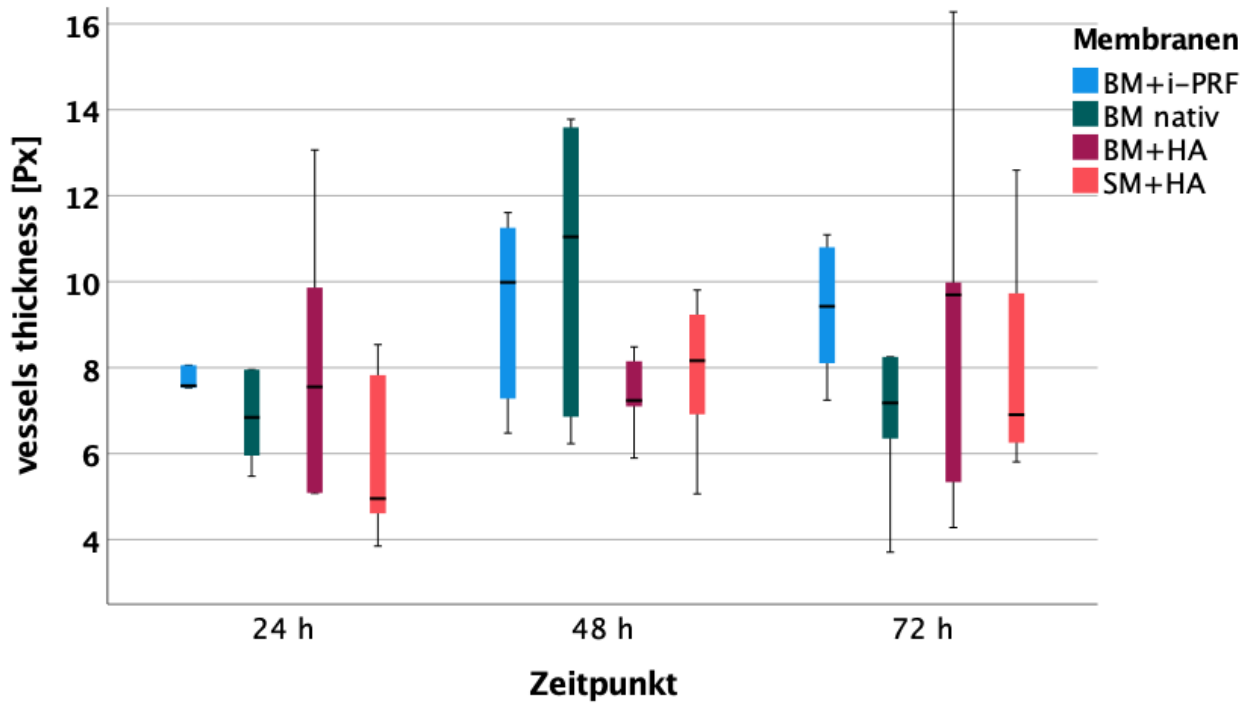
A)



B)



C)



D)

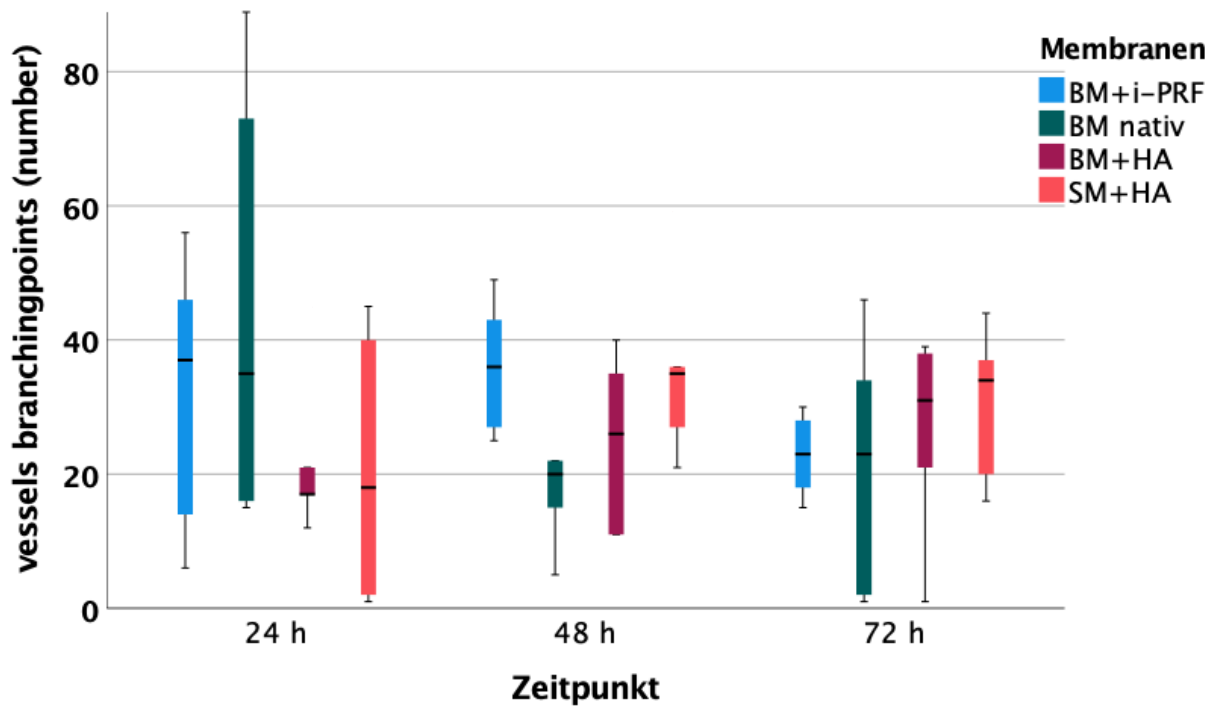


Abbildung 9: IKOSA®-Analyse der Parameter (A) total area in pixel² [Px.²], (B) length in pixels [Px], (C) thickness in pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints für die jeweilige Membran (BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <math>p<0,05</math>, ** <math>p<0,01</math>, *** <math>p<0,001</math>.

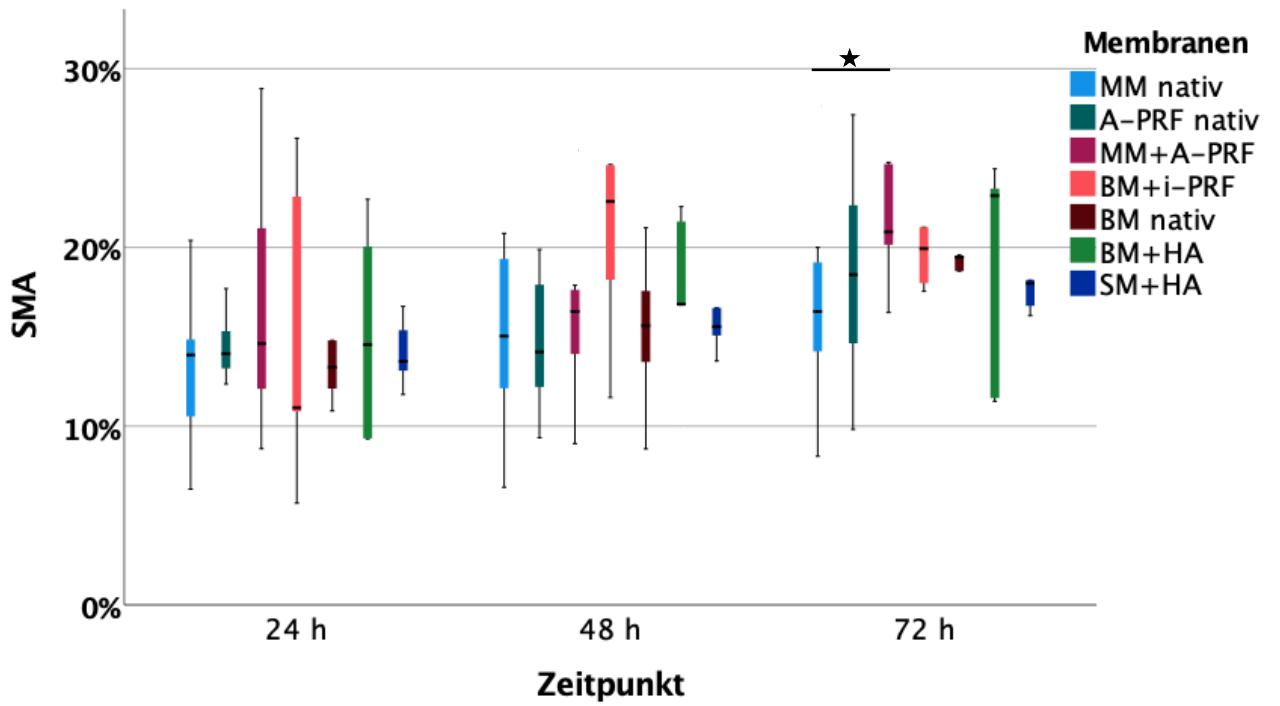
4.3 Vergleich Mucoderm®, Bio-Gide® und Smartbrane

In der α -SMA-Färbung zeigte sich innerhalb der sieben untersuchten Gruppen nach 24 h deskriptiv das höchste angiogenetische Potenzial bei der biologisierten MM sowie BM mit HA. Nach 48 h wies die BM mit i-PRF deskriptiv die höchste Anzahl an Gefäßen auf, während zum Zeitpunkt 72 h die BM mit HA die größte Gefäßbildung verzeichnete. Die biologisierte MM verzeichnete im Vergleich zur nativen MM zum Zeitpunkt 72 h einen statistisch signifikanten Gefäßzuwachs ($p=0,044$).

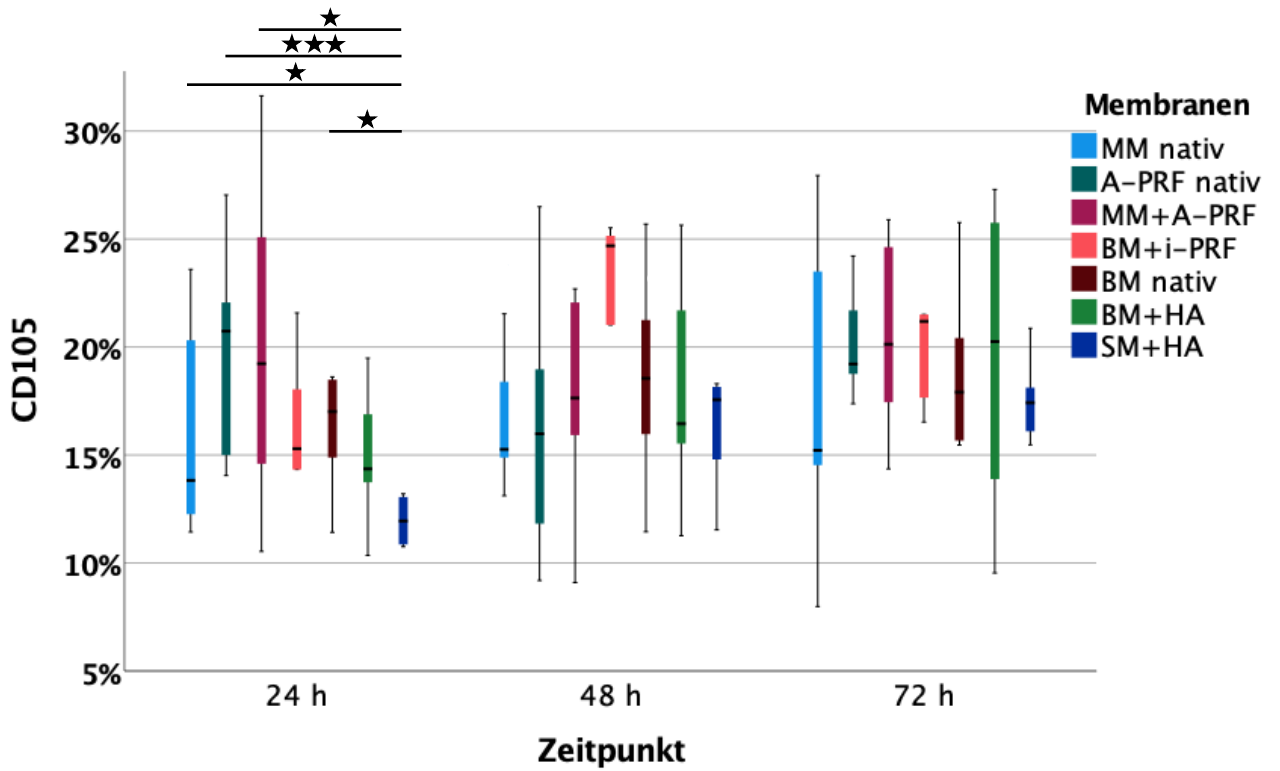
Die CD105-Färbung zeigte zum Zeitpunkt 24 h deskriptiv die höchste Gefäßzahl für die native A-PRF, verglichen mit den anderen Membranen zum selben Zeitpunkt. Zudem wiesen nach 24 h die biologisierte MM ($p=0,012$), native MM ($p=0,038$), native A-PRF ($p<0,001$) sowie native BM ($p=0,034$) im Vergleich zu der SM mit HA eine signifikant höhere Gefäßbildung auf. Nach 48 h und 72 h zeigte die BM mit i-PRF im Vergleich zu den anderen Membranen den deskriptiv größten proangiogenen Effekt.

In der HE-Färbung zeigte sich deskriptiv nach 24 h der höchste Anstieg der Gefäßzahl für die BM mit i-PRF, verglichen mit den anderen untersuchten Gruppen. BM mit i-PRF wies nach 24 h im Vergleich zu nativer MM ($p=0,036$) nativer A-PRF ($p=0,031$) sowie BM mit HA ($p=0,018$) einen signifikant höheren Gefäßzuwachs auf. Native BM zeigte nach 24 h signifikant mehr Gefäße als native MM ($p=0,012$), native A-PRF ($p=0,002$) sowie BM mit HA ($p<0,001$). Biologisierte MM wies nach 24 h ein signifikant höheres proangiogenes Potenzial als BM mit HA auf ($p=0,024$). Nach 48 h zeigte SM mit HA deskriptiv den höchsten Anstieg der Gefäßzahl, verglichen mit den anderen Membranen zum selben Zeitpunkt. Biologisierte MM ($p=0,045$), BM mit i-PRF ($p=0,040$) und native A-PRF ($p=0,030$) verzeichneten im Vergleich zu nativer MM nach 48 h einen statistisch signifikant höheren Gefäßzuwachs. Nach 72 h wies die SM mit HA im Vergleich zu den anderen Gruppen deskriptiv die höchste Zunahme an Gefäßen auf. Biologisierte MM ($p<0,001$) und native A-PRF ($p=0,005$) zeigten im Vergleich zu nativer MM nach 72 h einen statistisch signifikant erhöhten proangiogenen Effekt. Gleiches gilt im Vergleich zur nativen BM nach 72 h (Biologisierte MM: $p=0,028$); native A-PRF: $p=0,045$). Es ließ sich eine statistisch erhöhte Gefäßzahl bei der BM mit HA ($p=0,036$) sowie SM mit HA ($p=0,010$) im Vergleich zu nativer MM erkennen. SM mit HA verzeichnete zudem einen statistisch höheren Gefäßzuwachs als die native BM ($p=0,034$).

A)



B)



C)

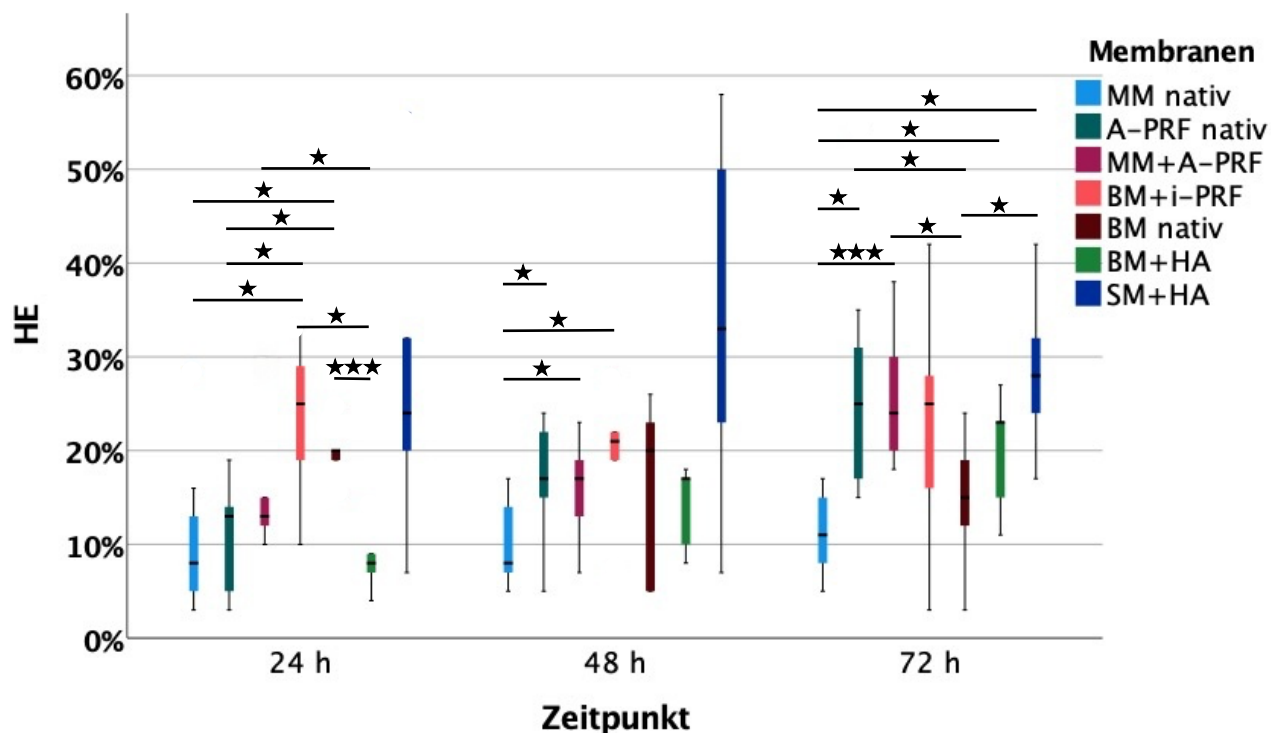


Abbildung 10: Analyse der (A) α -SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung, (C) HE-Färbung für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF, BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.1 IKOSA®-Analyse

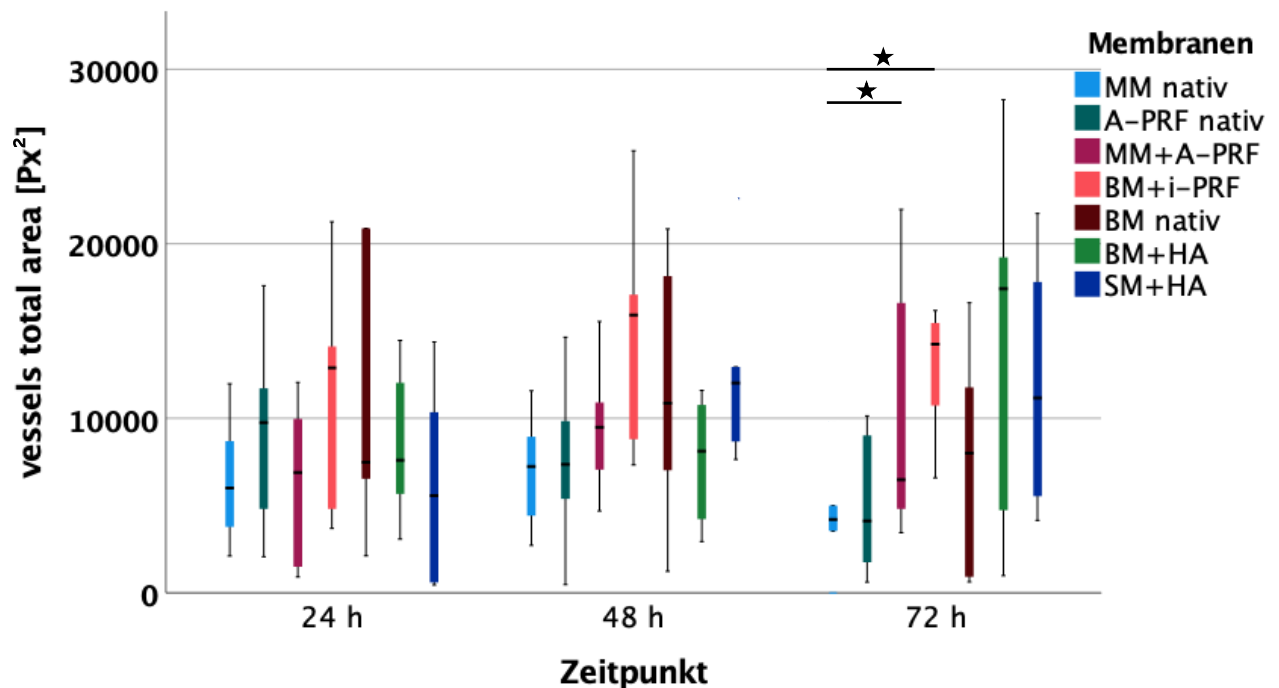
Nach 24 h und 48 h zeigte die BM mit i-PRF deskriptiv die größten Werte für den Parameter total area, jeweils verglichen mit den anderen Membranen. Innerhalb der analysierten Gruppen wies die BM mit HA nach 72 h deskriptiv die größte total area auf. Biologisierte MM ($p=0,049686$) und BM mit i-PRF ($p=0,007$) wiesen nach 72 h eine signifikant größere total area als die native MM auf.

Für den Parameter length zeigte sich nach 24 h deskriptiv der höchste Wert bei der BM mit i-PRF, verglichen mit den anderen Membranen zum selben Zeitpunkt. Nach 48 h wies die SM mit HA den deskriptiv größten Wert auf und zeigte eine signifikant größere length als die native MM ($p=0,037$) sowie native A-PRF ($p=0,026$). Zudem wies die BM mit i-PRF nach 48 h einen signifikant höheren Wert für den Parameter length auf, verglichen mit nativer A-PRF ($p=0,047$). Zum Zeitpunkt 72 h verzeichnete die BM mit HA innerhalb der sieben Gruppen deskriptiv den höchsten Wert für den Parameter length. Zudem zeigte BM mit i-PRF nach 72 h einen signifikant höheren Wert für die length, verglichen mit nativer MM nach 72 h ($p=0,018$).

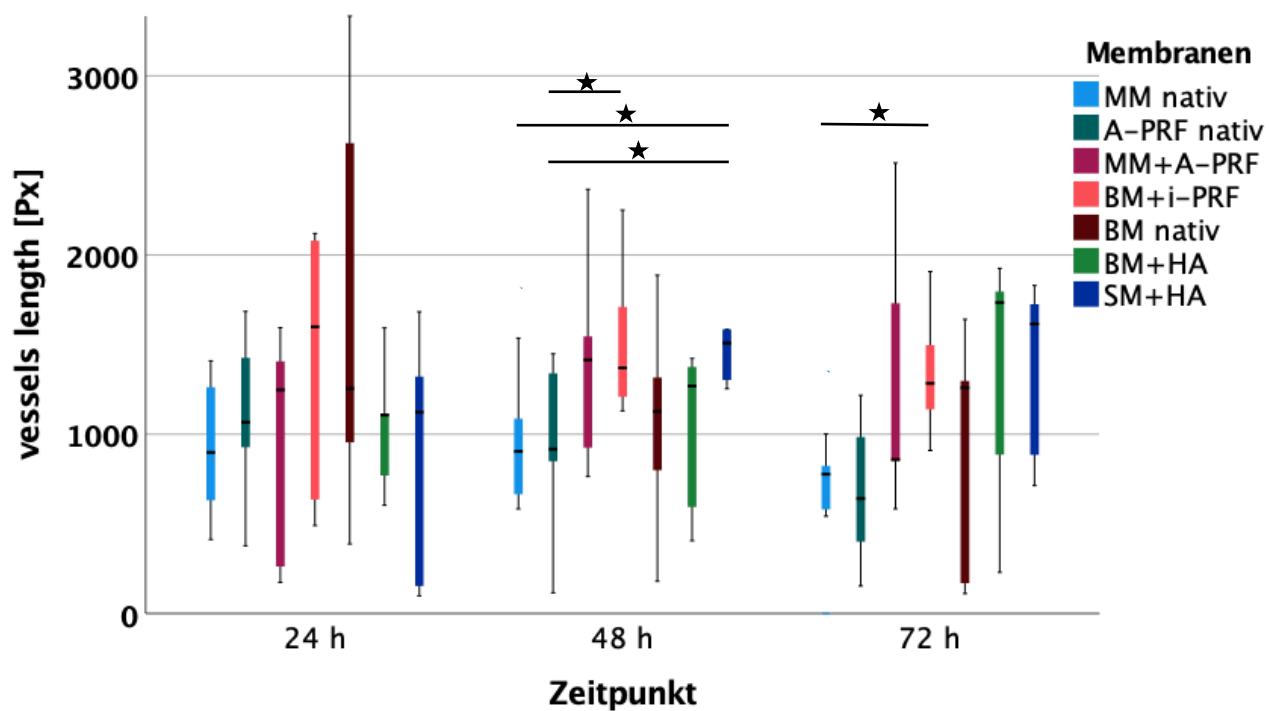
Nach 24 h zeigten im Gruppenvergleich die BM mit i-PRF und BM mit HA die deskriptiv höchsten Werte für den Parameter thickness. Nach 48 h wies die native BM den deskriptiv höchsten Wert auf, während nach 72 h die BM mit HA den höchsten Wert verzeichnete. BM mit i-PRF zeigte nach 72 h eine signifikant größere thickness im Vergleich zu nativer MM ($p=0,008$).

Für die Anzahl der branchingpoints zeigte sich nach 24 h der deskriptiv höchste Anstieg bei der BM mit i-PRF, verglichen mit den anderen Gruppen. Nach 48 h verzeichnete die biologisierte MM die deskriptiv höchste Anzahl der branchingpoints. BM mit i-PRF wies nach 48 h statistisch mehr branchingpoints auf als die native MM ($p=0,049$). Nach 72 h war bei der SM mit HA im Vergleich zu den anderen Membranen der deskriptiv höchste Wert für die Anzahl der branchingpoints erkennbar.

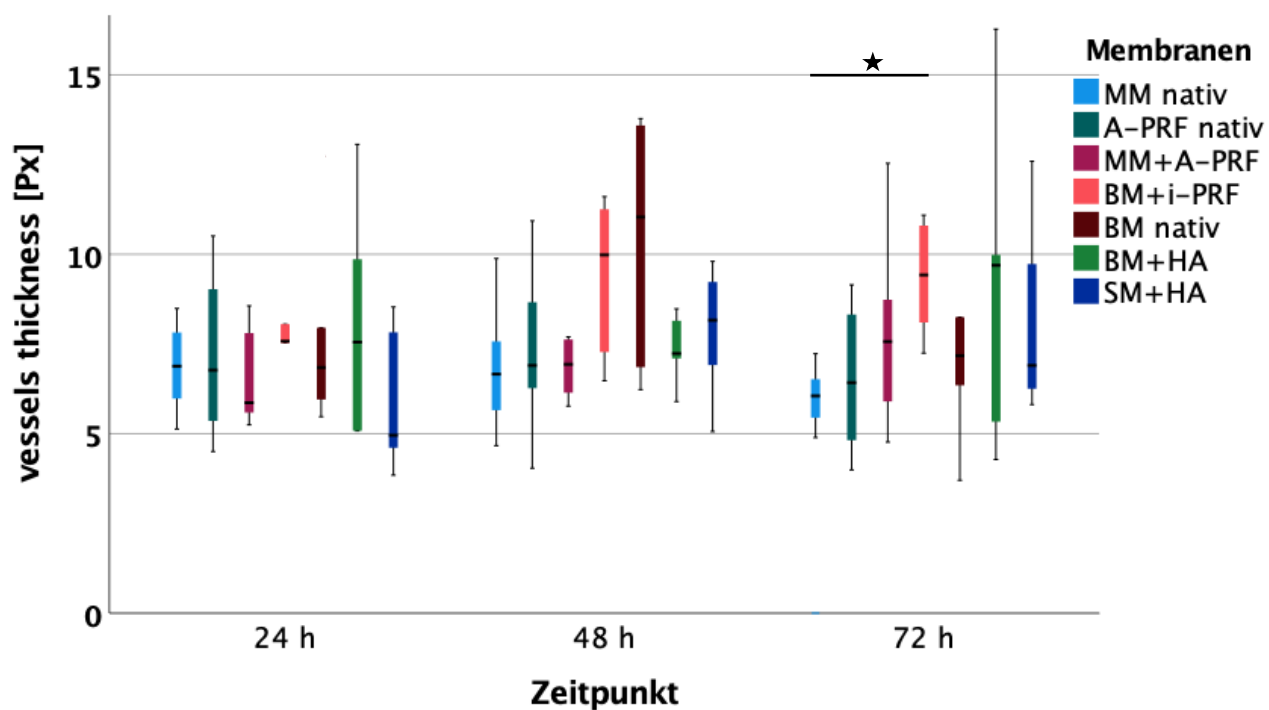
A)



B)



C)



D)

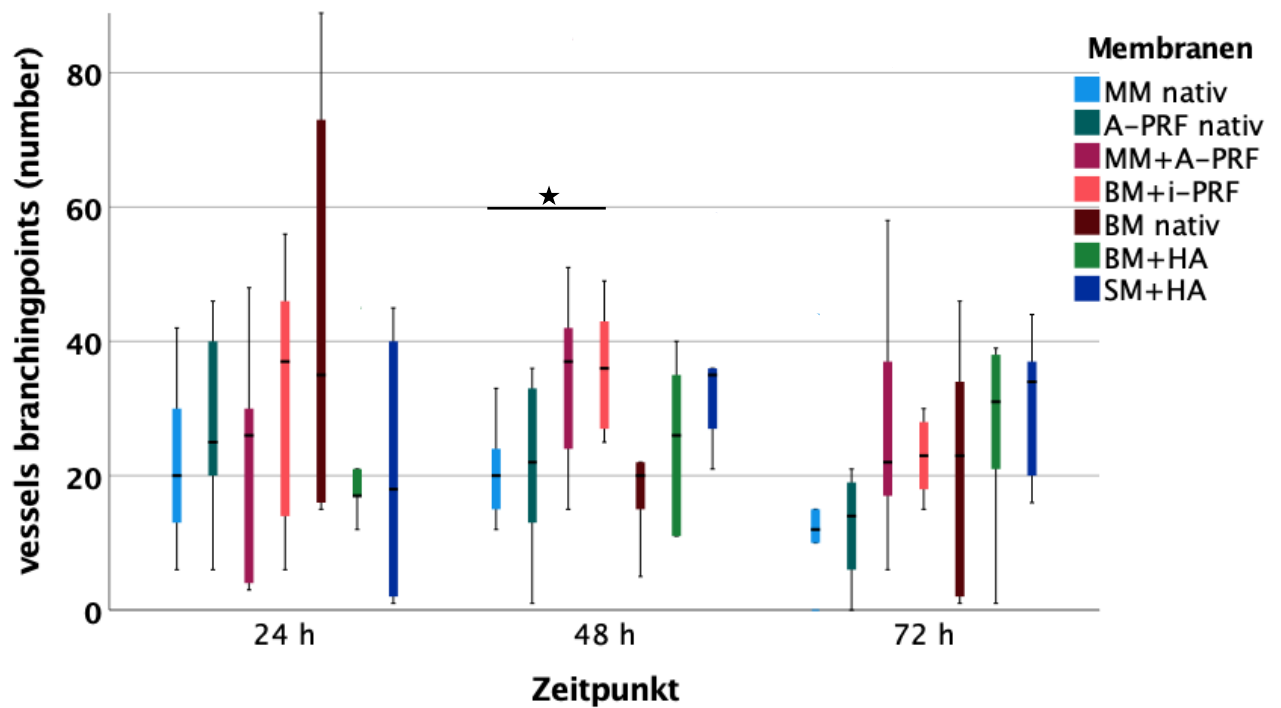


Abbildung 11: IKOSA®-Analyse der Parameter (A) total area in pixel² [Px.²], (B) length in pixels [Px], (C) thickness in pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints für die jeweilige Membran (MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF, BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA) nach 24 h, 48 h und 72 h. Linien kennzeichnen signifikante Unterschiede (basierend auf t-Tests), dabei gilt: * <0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

5.1.1 Vergleich der Membranen

Als wichtigstes Ergebnis der Mucoderm® Versuchsreihe ließ sich in der α -SMA-Färbung nach 72 h ein signifikant erhöhtes angiogenetisches Potenzial für die biologisierte MM im Vergleich zur nativen MM feststellen. Die HE-Färbung zeigte nach 48 h und 72 h einen signifikant höheren proangiogenen Effekt bei der biologisierten MM sowie der nativen A-PRF, jeweils verglichen mit der nativen MM. Nach 96 h ließ sich bei der biologisierten MM ein signifikant größerer Gefäßzuwachs feststellen, verglichen mit nativer MM und nativer A-PRF. In der IKOSA®-Analyse verzeichnete die biologisierte MM zum Zeitpunkt 72 h eine signifikant größere total area als die native MM.

Die Bio-Gide®/Smartbrane Versuchsreihe zeigte in der CD105-Färbung nach 24 h statistisch mehr Gefäße bei der nativen BM, verglichen mit der SM mit HA. In der HE-Färbung ließ sich nach 24 h ein statistisch signifikant erhöhtes angiogenetisches Potenzial bei der BM mit i-PRF sowie der nativen BM feststellen, jeweils verglichen mit der BM mit HA. Nach 72 h wies die SM mit HA im Vergleich zur nativen BM eine signifikant höhere Gefäßzahl auf. Die IKOSA®-Analyse verzeichnete keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Der Vergleich zwischen der Mucoderm® und der Bio-Gide®/Smartbrane Versuchsreihe zeigte in der CD105-Färbung signifikant mehr Gefäße für die native A-PRF, native MM, biologisierte MM sowie die native BM, jeweils verglichen mit der SM mit HA zum Zeitpunkt 24 h. In der HE-Färbung wies die BM mit i-PRF nach 24 h im Vergleich zu nativer MM, nativer A-PRF sowie BM mit HA einen signifikant größeren proangiogenen Effekt auf. Native BM zeigte nach 24 h eine signifikant größere Gefäßbildung als die native MM, native A-PRF sowie BM mit HA. Biologisierte MM verzeichnete nach 24 h eine signifikant höhere Gefäßzahl als die BM mit HA. Nach 48 h war bei der biologisierten MM, BM mit i-PRF und nativen A-PRF ein signifikant höherer Gefäßzuwachs erkennbar, verglichen mit der nativen MM. Nach 72 h zeigten die biologisierte MM sowie native A-PRF im Vergleich zur nativen MM und nativen BM statistisch mehr Gefäße. Es ließ sich zudem ein statistisch erhöhtes angiogenetisches Potenzial bei der BM mit HA sowie der SM mit HA erkennen, verglichen mit der nativen MM. Die SM mit HA wies nach 72 h statistisch signifikant mehr Gefäße auf als die native BM. Die IKOSA®-Analyse zeigte für die biologisierte MM und BM mit i-PRF nach 72 h eine signifikant größere total area als für die native MM. Nach 48 h wies die SM mit HA eine signifikant größere length als die native MM sowie native A-PRF auf. Zudem verzeichnete die BM mit i-PRF nach 48 h einen signifikant höheren Wert für den Parameter length, verglichen mit nativer A-PRF. BM mit i-PRF zeigte nach 72 h einen signifikant größeren length, verglichen mit nativer MM zum

Zeitpunkt 72 h. Bei der BM mit i-PRF war nach 72 h ein signifikant größerer Wert für den Parameter thickness erkennbar, verglichen mit nativer MM. BM mit i-PRF wies zudem nach 48 h statistisch mehr branchingpoints auf als die native MM.

5.1.2 Vergleich innerhalb des Zeitverlaufs

Im Zeitverlauf zeigte die biologisierte MM in der α -SMA-Färbung im Vergleich zu 24 h einen statistisch erhöhten Gefäßzuwachs nach 120 h. Bei der nativen MM war nach 96 h sowie 120 h ein statistisch höheres angiogenetisches Potenzial erkennbar, verglichen mit 24 h. Native A-PRF zeigte ebenfalls eine signifikant höhere Gefäßbildung nach 96 h sowie 120 h, verglichen mit Zeitpunkt 24 h. In der HE-Färbung wies die native A-PRF nach 72 h, 96 h sowie 120 h eine statistisch erhöhte Anzahl an Gefäßen auf, verglichen mit Zeitpunkt 24 h. Die biologisierte MM verzeichnete zu den Zeitpunkten 72 h und 96 h eine statistisch erhöhte Gefäßzahl im Vergleich zum Zeitpunkt 24 h. Gleiches gilt für die native MM zu 120 h, verglichen mit Zeitpunkt 24 h der nativen MM. Biologisierte MM zeigte einen statistisch signifikant erhöhten Wert für den Parameter thickness zum Zeitpunkt 96 h, verglichen mit Zeitpunkt 24 h.

Biologisierte SM verzeichnete im Zeitverlauf in der α -SMA-Färbung nach 72 h einen signifikant größeren proangiogenen Effekt im Vergleich zu 24 h. Die CD105-Färbung zeigte für die SM mit HA nach 48 h und 72 h ebenfalls eine signifikant erhöhte Gefäßbildung, verglichen mit 24 h der gleichen Membran. In der HE-Färbung wies die BM mit HA zum Zeitpunkt 72 h ein statistisch signifikant erhöhtes angiogenetisches Potenzial auf, verglichen mit Zeitpunkt 24 h.

5.2 Evaluation der Studienergebnisse im Vergleich zur bestehenden Literatur

5.2.1 Biofunktionalisierung von KM mittels Platelet-Rich-Fibrin

Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits nachweisen, dass die Biofunktionalisierung von KM mit PRF proangiogene Effekte bewirken kann. Blatt et al. (2020) beschrieben, dass PRF die Angiogenese von KM in vivo und vitro steigern konnte. Zum Zeitpunkt 24 h wiesen alle biologisierten Membranen (Mucoderm®, Jason®, Collprotect®) signifikant höhere Werte für die Anzahl der Gefäße pro mm², die Gefäßdichte sowie die Anzahl der Branchingpoints pro mm² auf, verglichen mit den nativen Kontrollgruppen. Die immunhistochemischen α -SMA- und CD105-Färbungen zeigten ebenfalls ein signifikant höheres proangiogenes Potenzial bei den biologisierten Membranen (10). In einer weiteren Studie konnte die Biofunktionalisierung von KM (Symbios®) mittels PRF nach 72 h einen signifikanten Zuwachs an Gefäßen und Branchingpoints bewirken, verglichen mit nativer YSM. Im Vergleich zu den nativen Pendants konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es muss beachtet werden, dass in der Studie von Blatt et al. (2022) keine Analyse der Mucoderm® erfolgte (9).

In dieser Studie führte die Biofunktionalisierung der MM mit A-PRF nach 48 h, 72 h sowie 96 h zu einem signifikant höheren angiogenetischen Potenzial in der immunhistochemischen Analyse, verglichen mit den nativen Varianten. Zu den Zeitpunkten 24 h und 120 h konnte die biologisierte MM deskriptiv mehr Gefäße verzeichnen als die native MM, jedoch war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Die IKOSA®-Analyse bestätigte diese Ergebnisse größtenteils. Nach 48 h und 72 h zeigten die Parameter total area, length, thickness und branchingpoints deskriptiv die höchsten Werte bei der biologisierten MM. Nach 72 h war eine signifikant größere total area bei der biologisierten MM festzustellen, verglichen mit der nativen MM. Zum Zeitpunkt 96 h zeigte sich deskriptiv eine größere total area und thickness im Vergleich zur nativen MM. Nach 120 h wies die IKOSA®-Analyse deskriptiv jedoch konsequent bessere Werte bei der nativen MM auf.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die Biofunktionalisierung von KM mit A-PRF die Vaskularisation und Angiogenese in ovo steigern kann. Dies gilt insbesondere für die Langzeitbeobachtung bis 96 h, die in der vorliegenden Studie im Fokus steht. Die Studienergebnisse unserer Arbeitsgruppen können somit um die Zeitpunkte 48 h und 96 h ergänzt werden. Für den Zeitraum bis 120 h kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse denen der IKOSA®-Analyse widersprechen. Beide Verfahren konnten sich als geeignete Methoden zur Untersuchung angiogener Eigenschaften erweisen (9, 10, 49, 51).

Weiterhin erfolgte die Biofunktionalisierung der BM mittels i-PRF. Eine Studie unserer Forschungsgruppe untersuchte unter anderem die Anwendung von i-PRF zur Prävasikularisierung einer azellulären, porcinen Kollagenmembran. Die Biofunktionalisierung mittels i-PRF führte dabei jedoch nicht zu einem erhöhten angiogenen Potenzial. Vielmehr zeigte die native Kollagenmembran bis 72 h alleinige signifikante proangiogene Eigenschaften (138). Die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist jedoch eingeschränkt, da unterschiedliche Membranen untersucht wurden. Diese unterscheiden sich bspw. in ihrer Kollagenzusammensetzung. Während die NovoMatrix™ Kollagen I und VI enthält, besteht die Bio-Gide® aus Kollagen Typ I und III (132, 139).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen beschrieben Al-Maawi et al. (2019), dass i-PRF die Bioaktivität kollagenbasierter Materialien steigern könnte. Zudem könnte die Freisetzung von Wachstumsfaktoren ermöglicht werden. Jedoch wurden auch in dieser Studie materialabhängige Unterschiede festgestellt. Während i-PRF die Mucograft® Kollagenmatrix fast vollständig durchdringen konnte, gelang dies bei der Bio-Gide®- und der Mucoderm®-Membran nur teilweise. Die Collprotect®-Membran zeigte nur eine Oberflächen-Invasion, und die BEGO®-Membran verzeichnete keine Aufnahme von i-PRF. Es zeigten sich zudem Abweichungen im i-PRF Zentrifugationsprotokoll (600 U/Minuten, 8 Minuten) (Duo-Zentrifuge,

Process for PRF, Nizza, Frankreich) (125). In einer klinischen Studie von Rosatto et al. (2023) konnte die Biofunktionalisierung mittels i-PRF ebenfalls positive Ergebnisse erzielen. Fibro-Gide® Kollagenmatrices wurden mit i-PRF (600 U/Minuten, 8 Minuten) kombiniert und zur Behandlung einzelner gingivaler Rezessionen eingesetzt. Dabei konnte nach sechs Monaten eine signifikante Reduktion der Rezessionen nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Kombination mit i-PRF die Wundheilung auf Grund einer verbesserten Angiogenese fördern konnte. Die erhöhte Gefäßdichte könnte zudem die Volumenstabilität der Kollagenmatrix steigern. Zusätzlich kann die Geweberegeneration auf Grund der Freisetzung von Wachstumsfaktoren begünstigt werden (140). Eine Vergleichbarkeit zur vorliegenden Studie ist insofern gegeben, da die Fibro-Gide®, ebenso wie die Bio-Gide®, aus porcinem Kollagen Typ I und III besteht. Allerdings weist die Fibro-Gide® eine Quervernetzung auf, die der Kollagenmatrix zusätzliche Volumenstabilität, Elastizität und Festigkeit verleiht (141).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Biofunktionalisierung der BM mittels i-PRF die Angiogenese und Vaskularisation in ovo fördern, bezogen auf den frühen Zeitraum 24 h bis 72 h. Die HE-Färbung zeigte für die BM mit i-PRF einen signifikant größeren Gefäßzuwachs nach 24 h, verglichen mit der BM mit HA, nativer MM und nativer A-PRF. Nach 48 h wies die BM mit i-PRF ein größeres angiogenetisches Potenzial im Vergleich zur nativen MM auf. Die IKOSA-Analyse konnte diese Ergebnisse bestätigen. Die Analyse ergab für die BM mit i-PRF nach 48 h eine größere length, verglichen mit nativer A-PRF. Im Vergleich zur nativen MM zeigte die BM mit i-PRF mehr branchingpoints nach 48 h. Nach 72 h wies die BM mit i-PRF signifikant bessere Werte für die Parameter total area, length und thickness auf, verglichen mit nativer MM. Es ist anzumerken, dass keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur nativen BM festgestellt werden konnten. Jedoch war die BM mit i-PRF ihrem nativen Pendant in der α -SMA-, CD105- und HE-Färbung nach 48 h und 72 h deskriptiv überlegen. Zudem zeigten sich in der IKOSA®-Analyse bei nahezu allen Parametern und Zeitpunkten deskriptiv höhere Werte bei der BM mit i-PRF, verglichen mit der nativen Variante.

In dieser Studie zeigte sowohl die Anwendung von A-PRF als auch i-PRF proangiogene Effekte. Es lässt sich jedoch keine Aussage darüber treffen, welche der beiden Methoden die Angiogenese in ovo über einen Zeitraum bis 72 h effektiver fördern konnte. Dies stimmt mit den Aussagen von Schröger et al. (2024) überein, die ebenfalls keine Empfehlung für eine bevorzugte PRF-Modifikation zur Prävasikularisierung von KM geben konnten (138). Weitere Studien untersuchten die Eigenschaften von A-PRF und i-PRF. Dabei zeigten sich ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Choukroun et al. (2017) beschrieben unter anderem, dass i-PRF signifikant mehr Leukozyten und Thrombozyten aufweisen konnte, verglichen mit A-PRF+. Zudem konnten höhere Level an Wachstumsfaktoren (VEGF und TGF- β 1) freigesetzt werden, bezogen auf einen Zeitraum bis 24 h (75). Miron et al. (2019) berichteten ebenfalls, dass i-PRF im Vergleich zu L-PRF und A-PRF die höchsten Konzentrationen an Thrombozyten und

Leukozyten aufweisen konnte. Es ist jedoch zu beachten, dass die Analyse nicht über einen Zeitraum hinweg erfolgte (14). Shash et al. (2024) dokumentierten hingegen, dass A-PRF nach einem Tag signifikant größere Mengen an VEGF ausschütten konnte, verglichen mit i-PRF und L-PRF. Nach drei Tagen zeigte A-PRF eine signifikant größere Freisetzung von TGF- β . Zudem konnte A-PRF nach sieben Tagen signifikant größere Mengen an VEGF, TGF- β und PDGF-BB freisetzen. Weiterhin zeigte A-PRF eine höhere Zugfestigkeit, Zellviabilität, Alkalische Phosphatase-Produktion sowie Mineralisation in humanen Zellen des parodontalen Ligaments. Die Anwendung von A-PRF wurde daher insbesondere in Hinblick auf die verbesserte Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie die Förderung der Osteogenese empfohlen (142). Ashour et al. (2023) beschrieben, dass A-PRF über einen Zeitraum bis sieben Tagen signifikant größere Mengen an PDGF-AA und TGF- β 1 freisetzen konnte, verglichen mit i-PRF. I-PRF verzeichnete währenddessen eine höhere Freisetzung von IGF-1. Insgesamt erwies sich A-PRF in der Freisetzung von Wachstumsfaktoren als überlegen (143). Um das langfristige angiogene Potenzial von i-PRF und A-PRF zuverlässig vergleichen zu können, sollten beide Modifikationen über einen längeren Zeitraum analysiert werden.

5.2.2 Biofunktionalisierung von KM mittels Hyaluronsäure

In der Studie von Kyyak et al. (2022) wurde bereits gezeigt, dass die Biofunktionalisierung boviner Knochenersatzmaterialien mittels HA die Angiogenese in vivo fördern konnte. Dabei wurde in der IKOSA®-Analyse eine signifikant größere Anzahl an Gefäßen und Branchingpoints, eine größere Gefäßlänge sowie Gesamtfläche an Gefäßen im Vergleich zum nativen Pendant festgestellt. Zudem zeigte sich in der HE- und SMA-Färbung eine größere Gefäßfläche sowie eine höhere Helligkeitsintegration. Die Analyse erfolgte am 13. Entwicklungstag des Hühnerembryos, was in der vorliegenden Studie dem Zeitpunkt 144 h entspricht. Die Studie von Kyyak et al. berücksichtigt somit einen deutlich späteren Zeitpunkt, ohne dabei einzelne Zeitpunkte gesondert zu betrachten (128).

In dieser Arbeit zeigte die Biofunktionalisierung von KM mit HA nach 24 h zunächst keine positiven Einflüsse. Native BM, native A-PRF, native MM und MM mit A-PRF konnten nach 24 h jeweils signifikant mehr Gefäße als die SM mit HA verzeichnen. Zudem zeigten die native BM, BM mit i-PRF und MM mit A-PRF einen größeren proangiogenen Effekt als die BM mit HA. Nach 48 h hingegen zeigte die SM mit HA in der IKOSA-Analyse eine signifikant größere length, verglichen mit nativer MM und nativer A-PRF. Nach 72 h wies die SM mit HA in der immunhistochemischen Analyse einen signifikant größeren Gefäßzuwachs auf, verglichen mit nativer MM und nativer BM. Zudem zeigte die BM mit HA signifikant mehr Gefäße als die native MM. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Biofunktionalisierung mittels HA nach 48 h und 72 h ein signifikant größeres angiogenetisches Potenzial bewirken kann. Die Beobachtungen von Kyyak et al. (2022) werden somit um zwei frühere Zeitpunkte ergänzt

(128). Allerdings war der proangiogene Effekt von HA im Vergleich zur Biofunktionalisierung mittels A-PRF und i-PRF weniger ausgeprägt.

Die Biofunktionalisierung mittels HA könnte auf Grund patientenbezogener, finanzieller sowie organisatorischer Vorteile eine sinnvolle Alternative im klinischen Alltag darstellen. Die Vorgänge der Blutentnahme mittels spezieller Vacutainer-Systeme, Zentrifugation und Weiterverarbeitung mittels PRF-Box entfallen. Die Patientenbelastung kann somit deutlich reduziert werden. Dieser Aspekt ist besonders relevant für Patienten, die zusätzliche Blutentnahmen fürchten und vermeiden möchten. Zudem werden hohe Materialkosten sowie medizinisches Personal eingespart. Die Effizienz klinischer Arbeitsabläufe könnte somit insgesamt optimiert werden. Um jedoch den langfristigen Erfolg der Biofunktionalisierung mittels HA beurteilen zu können, wäre eine Langzeitbeobachtung erforderlich.

5.2.3 Native Membranen

Im direkten Vergleich zwischen den nativen Membranen ließ sich in der HE-Färbung ein signifikanter Unterschied zwischen der nativen BM und nativen MM erkennen. Die native BM zeigte dabei nach 24 h ein signifikant höheres proangiogenes Potenzial als die native MM. In der IKOSA®-Analyse, α -SMA- und CD-105-Färbung war die native BM der nativen MM größtenteils ebenfalls überlegen, allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer Studie von Al-Maawi et al. (2019) gemacht. Dabei zeigte die MM im Gegensatz zur BM eine geringere Aufnahme von i-PRF. Als mögliche Erklärung wurden die kompakte Struktur sowie die größeren, eng verflochtenen Fasern der MM genannt, wie die Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie zeigten. Somit könnte das Eindringen von i-PRF in die Membran erschwert werden (125). Möglicherweise gilt dies ebenfalls für das Einwachsen von Blutgefäßen im CAM-Assay. Diese Überlegung könnte das geringere angiogenetische Potenzial nach 24 h erklären. Die Aussagekraft dieser Beobachtung ist jedoch eingeschränkt, da keine weiteren signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

Allgemein ist festzuhalten, dass die nativen Varianten in dieser Studie gute Ergebnisse erzielen konnten. Die native BM wies nach 24 h ein signifikant höheres angiogenetisches Potenzial auf, verglichen mit der SM mit HA, BM mit HA und nativer A-PRF. Zudem zeigte die native MM nach 24 h einen signifikant größeren proangiogenen Effekt als die SM mit HA. Wie bereits in der Literatur beschrieben (9, 10), erwies sich die native A-PRF in der vorliegenden Studie ebenfalls als vorteilhaft. Nach 24 h verzeichnete die native A-PRF einen signifikant größeren angiogenen Effekt als die SM mit HA, und nach 48 h war sie der nativen MM signifikant überlegen. Zum Zeitpunkt 72 h zeigte die native A-PRF eine signifikant höhere Gefäßzahl als die native MM und native BM. Für den Langzeiteffekt sind die nativen Membranen jedoch nicht mit den biologisierten Varianten zu vergleichen.

5.3 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, welche die Interpretation der Ergebnisse einschränken können. Im Rahmen des CAM-Assays lässt sich zunächst die Variabilität der Hühnerembryonen nennen. Diese können auf Grund von genetischen Faktoren, Außentemperaturen oder verschiedenen Entwicklungsstadien Unterschiede in Form und Größe aufweisen. Darüber hinaus variierte die Größe der Hühnereier. Eine vollständig standardisierte Applikation der Membranen auf die CAM sowie Entnahme der Membranen kann daher nicht gewährleistet werden. Zudem könnten die Biologisierung und das Schneiden der Membranen potenzielle Fehlerquellen darstellen. Da die A-PRF Membranen manuell auf die Kollagenmembranen gepresst und zugeschnitten wurden, konnten geringfügige Größenabweichungen auftreten. Gleichzeitig könnten aufgrund der manuellen Inkubation mit flüssigem i-PRF und Hyaluronsäure Abweichungen in der Konzentration entstanden sein. Weitere Unregelmäßigkeiten konnten durch den Transport, die Lagerung, Luftfeuchtigkeit, Beleuchtung oder Temperatur entstehen. Kontaminationen durch Schimmelpilze oder Bakterien konnten trotz steriler Arbeitsbedingungen nicht vollständig ausgeschlossen werden und somit möglicherweise die Ergebnisse beeinflussen. Allgemein ist die Aussagekraft der Studie auf Grund der begrenzten Fallzahl und Beobachtungsdauer beschränkt.

Eine weitere Fehlerquelle stellt die Fotodokumentation mittels digitalen Mikroskops dar. In Einzelfällen war die Bildqualität durch Reflexionen oder Spiegelungen gemindert, was die Ergebnisse der Auswertung mittels IKOSA® CAM Assay Software beeinflusst haben könnte. Weiterhin kann die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch die Färbemethoden beeinträchtigt werden. Die manuelle Auswertung der histologischen Schnitte könnte eine Standardisierung der Ergebnisse erschweren. Zudem ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse des CAM-Assays auf den Menschen auf Grund der unterschiedlichen Metabolismen nur begrenzt möglich (144).

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Studie erfolgte die Biofunktionalisierung von KM mittels A-PRF, i-PRF und HA. Dabei wurde mit Hilfe des CAM-Assays der Einfluss auf die Vaskularisierung und Angiogenese in ovo analysiert. Um eine differenzierte und objektive Beurteilung der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden sowohl immunhistochemische als auch KI-gestützte Gefäßanalysen durchgeführt. Dennoch können die in Kapitel 5.3 beschriebenen Limitationen die Aussagekraft dieser Studie einschränken.

Die Kombination von KM mit A-PRF konnte in der Langzeitbeobachtung bis 96 h signifikante proangiogene Effekte bewirken. Dies stellt eine wesentliche neue Erkenntnis dar und bietet vielversprechende Perspektiven für den langfristigen klinischen Erfolg bei der GBR/GTR. Die Biofunktionalisierung mittels i-PRF konnte im Zeitraum von 24 h bis 72 h gleichermaßen gute Ergebnisse erzielen. Es lässt sich insgesamt keine Aussage darüber treffen, welche der beiden Varianten die Angiogenese in ovo effektiver fördern konnte. In der klinischen Praxis können beide PRF-Modifikationen als wirksame Methoden zur Prävaskularisierung von KM betrachtet werden.

Die Biofunktionalisierung mittels HA lieferte ebenfalls neue Erkenntnisse. Die Kombination mit HA zeigte nach 48 h und 72 h eine signifikante Steigerung der Angiogenese. Die Anwendung von HA könnte daher eine sinnvolle Alternative im klinischen Alltag darstellen. Zu den Vorteilen gegenüber A-PRF und i-PRF zählen insbesondere reduzierte Kosten sowie eine vereinfachte Handhabung. Die Biologisierung mittels HA eignet sich besonders für Angst-Patienten, die zusätzliche Blutentnahmen fürchten und auf diese verzichten möchten.

Zur vollständigen Bewertung des langfristigen proangiogenen Potenzials von A-PRF, i-PRF sowie HA sind weiterführende Studien erforderlich, die eine Langzeitbeobachtung umfassen.

7 Literaturverzeichnis

1. Ayari H. The use of periodontal membranes in the field of periodontology: spotlight on collagen membranes. *J Appl Biomed*. 2022;20(4):154-62.
2. Sasaki JI, Abe GL, Li A, Thongthai P, Tsuboi R, Kohno T, Imazato S. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. *Biomater Investig Dent*. 2021;8(1):54-63.
3. Urban IA, Monje A. Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2019;31(2):331-8.
4. Yang Z, Wu C, Shi H, Luo X, Sun H, Wang Q, Zhang D. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:921576.
5. Heller M, Bauer HK, Schwab R, Blatt S, Peters K, Nezi-Cahn S, et al. The impact of intercellular communication for the generation of complex multicellular prevascularized tissue equivalents. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(3):734-48.
6. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci*. 2010;10(1):12-27.
7. 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.
8. Laschke MW, Menger MD. Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res*. 2012;48(2):85-92.
9. 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).
10. 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):3425-36.
11. Gollapudi M, Bajaj P, Oza RR. Injectable Platelet-Rich Fibrin - A Revolution in Periodontal Regeneration. *Cureus*. 2022;14(8):e28647.
12. Ucer C, Khan RS. Alveolar Ridge Preservation with Autologous Platelet-Rich Fibrin (PRF): Case Reports and the Rationale. *Dent J (Basel)*. 2023;11(10).
13. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353-60.
14. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(10):2257-71.
15. Cortes H, Caballero-Florán IH, Mendoza-Muñoz N, Córdova-Villanueva EN, Escutia-Guadarrama L, Figueroa-González G, et al. Hyaluronic acid in wound dressings. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2020;66(4):191-8.
16. Koray M, Ofluoglu D, Onal EA, Ozgul M, Ersev H, Yaltirik M, Tanyeri H. Efficacy of hyaluronic acid spray on swelling, pain, and trismus after surgical extraction of impacted mandibular third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(11):1399-403.
17. de Araújo Nobre M, Cintra N, Maló P. Peri-implant maintenance of immediate function implants: a pilot study comparing hyaluronic acid and chlorhexidine. *Int J Dent Hyg*. 2007;5(2):87-94.
18. Mesa FL, Aneiros J, Cabrera A, Bravo M, Caballero T, Revelles F, et al. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. *Histol Histopathol*. 2002;17(3):747-53.
19. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Göcke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol*. 2003;30(2):159-64.
20. Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, et al. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016;29(4):572-82.
21. Tennant M, McGeachie JK. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *Aust N Z J Surg*. 1990;60(10):747-53.

22. Wang D, Wang Z, Zhang L, Wang Y. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8135934.
23. Kato Y, Mizutani T, Otsuka N, Ezure H, Inoue Y. Quantitative analysis of the elastic fiber in the tunica media at the carotid bifurcation. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2018;95(2):23-7.
24. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75(3):487-517.
25. Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020;20(1):21-30.
26. Rey FE, Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(12):1962-71.
27. Majesky MW, Weiser-Evans MCM. The adventitia in arterial development, remodeling, and hypertension. *Biochem Pharmacol.* 2022;205:115259.
28. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res.* 2004;117:3-32.
29. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development.* 1989;105(3):473-85.
30. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.
31. Naito H, Iba T, Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *Int Immunol.* 2020;32(5):295-305.
32. D'Alessio A, Moccia F, Li JH, Micera A, Kyriakides TR. Angiogenesis and Vasculogenesis in Health and Disease. *Biomed Res Int.* 2015;2015:126582.
33. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.* 2001;100(2):157-63.
34. Thompson MA, Ransom DG, Pratt SJ, MacLennan H, Kieran MW, Detrich HW, 3rd, et al. The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol.* 1998;197(2):248-69.
35. Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development.* 2001;128(10):1717-30.
36. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8(1):21-43.
37. Liu Z-L, Chen H-H, Zheng L-L, Sun L-P, Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2023;8(1):198.
38. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(3-4):489-502.
39. Irvin MW, Zijlstra A, Wikswo JP, Pozzi A. Techniques and assays for the study of angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(11):1476-88.
40. Guerra A, Belinha J, Jorge RN. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *J Theor Biol.* 2018;459:1-17.
41. Moreno-Jiménez I, Hulsart-Billstrom G, Lanham SA, Janeczek AA, Kontouli N, Kanczler JM, et al. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. *Scientific Reports.* 2016;6(1):32168.
42. Mitrevska K, Merlos Rodrigo MA, Cernei N, Michalkova H, Splichal Z, Hynek D, et al. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay for the evaluation of the antitumor and antimetastatic activity of platinum-based drugs in association with the impact on the amino acid metabolism. *Mater Today Bio.* 2023;19:100570.
43. Schneider-Stock R, Ribatti D. The CAM Assay as an Alternative In Vivo Model for Drug Testing. *Handb Exp Pharmacol.* 2021;265:303-23.
44. As MN, Deshpande R, Kale VP, Bhonde RR, Datar SP. Establishment of an in ovo chick embryo yolk sac membrane (YSM) assay for pilot screening of potential angiogenic and anti-angiogenic agents. *Cell Biol Int.* 2018;42(11):1474-83.
45. Yadgary L, Yair R, Uni Z. The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. *Poult Sci.* 2011;90(2):410-6.

46. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*. 2014;17(4):779-804.
47. Wang H-M, Lu C-Y, Wang X-H, Bao Y, Meng X-Y, Wu Y, Li Y-X. Chick yolk sac membrane assay: a novel angiogenesis model. *Journal of Biological Research*. 2007;7:93-7.
48. Annese T, Tamma R, Ribatti D. IKOSA(®) CAM Assay Application to Quantify Blood Vessels on Chick Chorioallantoic Membrane (CAM). *Methods Mol Biol*. 2023;2572:129-39.
49. Kuri PM, Pion E, Mahl L, Kainz P, Schwarz S, Brochhausen C, et al. Deep Learning-Based Image Analysis for the Quantification of Tumor-Induced Angiogenesis in the 3D In Vivo Tumor Model-Establishment and Addition to Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI). *Cells*. 2022;11(15).
50. Salvante ERG, Popoiu AV, Barb AC, Cosma AA, Fenesan MP, Saxena AK, et al. Artificial Intelligence (AI) Based Analysis of In Vivo Polymers and Collagen Scaffolds Inducing Vascularization. *In Vivo*. 2024;38(2):620-9.
51. Faihs L, Firouz B, Slezak P, Slezak C, Weißensteiner M, Ebner T, et al. A Novel Artificial Intelligence-Based Approach for Quantitative Assessment of Angiogenesis in the Ex Ovo CAM Model. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17).
52. Feigin K, Shope B. Use of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Dentistry and Oral Surgery: Introduction and Review of the Literature. *J Vet Dent*. 2019;36(2):109-23.
53. Fan Y, Perez K, Dym H. Clinical Uses of Platelet-Rich Fibrin in Oral and Maxillofacial Surgery. *Dent Clin North Am*. 2020;64(2):291-303.
54. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33.
55. Patzelt J, Langer HF. Platelets in angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(5):570-7.
56. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 2013;153(1):13-9.
57. Franzén L, Dahlquist C. The effect of transforming growth factor-beta on fibroblast cell proliferation in intact connective tissue in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1994;30a(7):460-3.
58. Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*. 2004;124(3):376-84.
59. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*. 2013;122(15):2550-4.
60. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105 Suppl 1:S13-33.
61. Chaudhary PK, Kim S, Kim S. An Insight into Recent Advances on Platelet Function in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11).
62. Riedl J, Pabinger I, Ay C. Platelets in cancer and thrombosis. *Hamostaseologie*. 2014;34(1):54-62.
63. Mihaylova Z, Mitev V, Stanimirov P, Isaeva A, Gateva N, Ishkitiev N. Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta Odontol Scand*. 2017;75(1):1-11.
64. Bergel S. Ueber wirkungen des fibrins. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1909;35(15):663-5.
65. Matras H, Dinges HP, Lassmann H, Mamoli B. [Suture-free interfascicular nerve transplantation in animal experiments]. *Wien Med Wochenschr*. 1972;122(37):517-23.
66. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67.
67. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(11):1294-9.

68. Bai MY, Vy VPT, Tang SL, Hung TNK, Wang CW, Liang JY, et al. Current Progress of Platelet-Rich Derivatives in Cartilage and Joint Repairs. *Int J Mol Sci.* 2023;24(16).
69. Kingsley CS. Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature.* 1954;173(4407):723-4.
70. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-46.
71. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(4):529-35.
72. Shah R, M GT, Thomas R, Mehta DS. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2017;25(2):64-72.
73. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60.
74. Karimi K, Rockwell H. The Benefits of Platelet-Rich Fibrin. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2019;27(3):331-40.
75. 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.
76. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Trandafilovic M, Stojanovic P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Med (Wars).* 2021;16(1):446-54.
77. Pabst A, Kämmerer PW. Membranwendungen in der ZMK-Heilkunde. *Zahnmed-u2d.* 2020;14(03):199-210.
78. 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.
79. Tunali M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013;51(5):438-43.
80. Pathak H, Mohanty S, Urs AB, Dabas J. Treatment of Oral Mucosal Lesions by Scalpel Excision and Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting: A Review of 26 Sites. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2015;73(9):1865-74.
81. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;23(1):83-99.
82. Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *J Periodontol.* 2009;80(12):2056-64.
83. Shawky H, Seifeldin SA. Does Platelet-Rich Fibrin Enhance Bone Quality and Quantity of Alveolar Cleft Reconstruction? *Cleft Palate Craniofac J.* 2016;53(5):597-606.
84. Assad M, Bitar W, Alhadj MN. Closure of Oroantral Communication Using Platelet-rich Fibrin: A Report of Two Cases. *Ann Maxillofac Surg.* 2017;7(1):117-9.
85. 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.
86. Gönen ZB, Yılmaz Asan C. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw using platelet-rich fibrin. *Cranio.* 2017;35(5):332-6.
87. Soydan SS, Uçkan S. Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a platelet-rich fibrin membrane: technical report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(2):322-6.
88. Egle K, Salma I, Dubnika A. From Blood to Regenerative Tissue: How Autologous Platelet-Rich Fibrin Can Be Combined with Other Materials to Ensure Controlled Drug and Growth Factor Release. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).

89. Yang KC, Wang CH, Chang HH, Chan WP, Chi CH, Kuo TF. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(10):777-85.
90. Mu Z, Chen K, Yuan S, Li Y, Huang Y, Wang C, et al. Gelatin Nanoparticle-Injectable Platelet-Rich Fibrin Double Network Hydrogels with Local Adaptability and Bioactivity for Enhanced Osteogenesis. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(5):e1901469.
91. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014;40(6):679-89.
92. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol.* 2017;88(1):112-21.
93. Mourão CF, Valiense H, Melo ER, Mourão NB, Maia MD. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir.* 2015;42(6):421-3.
94. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, Choukroun J. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig.* 2017;21(8):2619-27.
95. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(1):53-60.
96. Graça MFP, Miguel SP, Cabral CSD, Correia IJ. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. *Carbohydr Polym.* 2020;241:116364.
97. Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem.* 2009;16(14):1718-45.
98. Marinho A, Nunes C, Reis S. Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. *Biomolecules.* 2021;11(10).
99. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel).* 2018;10(7).
100. Park D, Kim Y, Kim H, Kim K, Lee YS, Choe J, et al. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . *Mol Cells.* 2012;33(6):563-74.
101. Lu J, Guan F, Cui F, Sun X, Zhao L, Wang Y, Wang X. Enhanced angiogenesis by the hyaluronic acid hydrogels immobilized with a VEGF mimetic peptide in a traumatic brain injury model in rats. *Regen Biomater.* 2019;6(6):325-34.
102. Russo R, Carrizzo A, Barbato A, Rasile BR, Pentangelo P, Ceccaroni A, et al. Clinical Evaluation of the Efficacy and Tolerability of Rigenase(®) and Polyhexanide (Fitostimoline(®) Plus) vs. Hyaluronic Acid and Silver Sulfadiazine (Connettivina(®) Bio Plus) for the Treatment of Acute Skin Wounds: A Randomized Trial. *J Clin Med.* 2022;11(9).
103. Sahayata VN, Bhavsar NV, Brahmhatt NA. An evaluation of 0.2% hyaluronic acid gel (Gengigel ®) in the treatment of gingivitis: a clinical & microbiological study. *Oral Health Dent Manag.* 2014;13(3):779-85.
104. Parashar P, Rathor M, Dwivedi M, Saraf SA. Hyaluronic Acid Decorated Naringenin Nanoparticles: Appraisal of Chemopreventive and Curative Potential for Lung Cancer. *Pharmaceutics.* 2018;10(1).
105. Ali M, Mohd Noor SNF, Mohamed H, Ullah F, Javed F, Abdul Hamid ZA. Advances in Guided Bone Regeneration Membranes: A Comprehensive Review of Materials and Techniques. *Biomed Phys Eng Express.* 2024.
106. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(6):567-76.
107. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982;9(3):257-65.
108. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1984;11(8):494-503.
109. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol.* 1986;13(6):604-16.

110. Pontoriero R, Nyman S, Lindhe J, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J Clin Periodontol*. 1987;14(10):618-20.
111. Buser D, Urban I, Monje A, Kunrath MF, Dahlin C. Guided bone regeneration in implant dentistry: Basic principle, progress over 35 years, and recent research activities. *Periodontol* 2000. 2023;93(1):9-25.
112. Nyman S, Lang NP, Buser D, Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5(1):9-14.
113. Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994;14(6):496-511.
114. Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Natri L. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. *Materials (Basel)*. 2020;13(3).
115. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.
116. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMedical Engineering OnLine*. 2019;18(1):24.
117. Rezvani Ghomi E, Nourbakhsh N, Akbari Kenari M, Zare M, Ramakrishna S. Collagen-based biomaterials for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021;109(12):1986-99.
118. Abedi M, Shafiee M, Afshari F, Mohammadi H, Ghasemi Y. Collagen-Based Medical Devices for Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023.
119. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel)*. 2010;3(3):1863-87.
120. Revell CK, Jensen OE, Shearer T, Lu Y, Holmes DF, Kadler KE. Collagen fibril assembly: New approaches to unanswered questions. *Matrix Biol Plus*. 2021;12:100079.
121. Kumari CBN, Ramakrishnan T, Devadoss P, Vijayalakshmi R, Alzahrani KJ, Almasri MA, et al. Use of Collagen Membrane in the Treatment of Periodontal Defects Distal to Mandibular Second Molars Following Surgical Removal of Impacted Mandibular Third Molars: A Comparative Clinical Study. *Biology (Basel)*. 2021;10(12).
122. 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. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(23):14987.
123. Watanabe T, Hasuike A, Wakuda S, Kogure K, Min S, Watanabe N, et al. Resorbable bilayer membrane made of L-lactide- ϵ -caprolactone in guided bone regeneration: an in vivo experimental study. *Int J Implant Dent*. 2024;10(1):1.
124. Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int*. 2017;48(2):131-47.
125. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaíno C, Orłowska A, Willershäusen 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).
126. Silva EC, Omonte SV, Martins AG, de Castro HH, Gomes HE, Zenóbio É G, et al. Hyaluronic acid on collagen membranes: An experimental study in rats. *Arch Oral Biol*. 2017;73:214-22.
127. Shirakata Y, Imafuji T, Nakamura T, Kawakami Y, Shinohara Y, Noguchi K, et al. Periodontal wound healing/regeneration of two-wall intrabony defects following reconstructive surgery with cross-linked hyaluronic acid-gel with or without a collagen matrix: a preclinical study in dogs. *Quintessence Int*. 2021;52(4):308-16.
128. Kyyak S, Blatt S, Wiesmann N, Smeets R, Kaemmerer PW. Hyaluronic Acid with Bone Substitutes Enhance Angiogenesis In Vivo. *Materials (Basel)*. 2022;15(11).
129. Kyyak S, Pabst A, Heimes D, Kämmerer PW. The Influence of Hyaluronic Acid Biofunctionalization of a Bovine Bone Substitute on Osteoblast Activity In Vitro. *Materials (Basel)*. 2021;14(11).
130. GmbH bb. mucoderm®

- 3D-Kollagenmatrix für die Weichgeweberegeneration 2017 [Available from: https://botiss-dental.com/pdf/botiss_mucoderm_STMN_DE.pdf.
131. Biomaterials G, mbH V. Geistlich Bio-Gide® 2023 [Available from: <https://www.geistlich.de/dental-fachpersonen/produkte/membranen/geistlich-bio-gide/>.
132. Oliveira EA, Dalla-Costa KL, França FM, Kantovitz KR, Peruzzo DC. Influence of melatonin associated with the Bio-Gide® membrane on osteoblast activity: an in vitro Study. *Acta Odontol Latinoam*. 2022;35(2):90-7.
133. GmbH R. SMARTBRANE
- Resorbierbare Perikardmembran o. J. [Available from: <https://www.regedent.de/index.php/produkte/smartbrane>.
134. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*. 2008;2008:pdb.prot4986.
135. Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*. 2006;312(3):205-14.
136. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1931-7.
137. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, et al. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol*. 2000;217(1):42-53.
138. 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.
139. GmbH CV. NovoMatrix® Rekonstruktive Gewebematrix 2024 [Available from: <https://www.camlog.de/de/produkte/biomaterialien/weichgeweberegeneration>.
140. Nair MR, Thomas R, Shah R, Gowda I, Gowda TM. Comparison of the angiogenic efficacy of conventional leukocyte- and platelet-rich fibrin versus low-speed advanced platelet-rich fibrin: An in vitro chorioallantoic membrane assay study. *Dent Med Probl*. 2024;61(1):77-83.
141. Vallecillo C, Toledano-Osorio M, Vallecillo-Rivas M, Toledano M, Osorio R. In Vitro Biodegradation Pattern of Collagen Matrices for Soft Tissue Augmentation. *Polymers (Basel)*. 2021;13(16).
142. Shah R, M GT, Thomas R, A BT. Advanced platelet rich fibrin demonstrates improved osteogenic induction potential in human periodontal ligament cells, growth factor production and mechanical properties as compared to leukocyte and platelet fibrin and injectable platelet rich fibrin. *Oral Maxillofac Surg*. 2024;28(1):413-24.
143. Ashour SH, Mudalal M, Al-Aroomi OA, Al-Attab R, Li W, Yin L. The Effects of Injectable Platelet-Rich Fibrin and Advanced-Platelet Rich Fibrin on Gingival Fibroblast Cell Vitality, Proliferation, Differentiation. *Tissue Eng Regen Med*. 2023;20(7):1161-72.
144. Palumbo C, Sisi F, Checchi M. CAM Model: Intriguing Natural Bioreactor for Sustainable Research and Reliable/Versatile Testing. *Biology*. 2023;12(9):1219.

8 Anhang

(A)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
SMA	MM nativ	0,165	9	,200*	0,96	9	0,796
	A-PRF nativ	0,198	9	,200*	0,893	9	0,216
	MM + A-PRF	0,204	9	,200*	0,921	9	0,401
CD105	MM nativ	0,23	9	0,188	0,843	9	0,063
	A-PRF nativ	0,183	9	,200*	0,937	9	0,553
	MM + A-PRF	0,189	9	,200*	0,947	9	0,653
HE	MM nativ	0,196	9	,200*	0,851	9	0,077
	A-PRF nativ	0,224	9	,200*	0,905	9	0,284
	MM + A-PRF	0,341	9	0,003	0,691	9	0,001
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 24							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(B)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
SMA	MM nativ	0,159	9	,200*	0,939	9	0,567
	A-PRF nativ	0,138	9	,200*	0,96	9	0,797
	MM + A-PRF	0,248	9	0,118	0,912	9	0,332
CD105	MM nativ	0,174	9	,200*	0,972	9	0,915
	A-PRF nativ	0,188	9	,200*	0,939	9	0,569
	MM + A-PRF	0,177	9	,200*	0,907	9	0,297
HE	MM nativ	0,235	9	0,165	0,884	9	0,174
	A-PRF nativ	0,195	9	,200*	0,903	9	0,27
	MM + A-PRF	0,152	9	,200*	0,916	9	0,363
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 48							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(C)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		Signifikanz
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	
SMA	MM nativ	0,181	9	,200*	0,935	9	0,531
	A-PRF nativ	0,149	9	,200*	0,956	9	0,347
	MM + A-PRF	0,201	9	,200*	0,914	9	0,503
CD105	MM nativ	0,235	9	0,163	0,932	9	0,717
	A-PRF nativ	0,163	9	,200*	0,952	9	0,436
	MM + A-PRF	0,193	9	,200*	0,925	9	0,626
HE	MM nativ	0,154	9	,200*	0,944	9	0,101
	A-PRF nativ	0,169	9	,200*	0,862	9	0,474
	MM + A-PRF	0,175	9	,200*	0,929		
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 72							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(D)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		Signifikanz
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	
SMA	MM nativ	0,156	9	,200*	0,946	9	0,651
	A-PRF nativ	0,236	9	0,161	0,889	9	0,193
	MM + A-PRF	0,153	9	,200*	0,95	9	0,694
CD105	MM nativ	0,188	9	,200*	0,937	9	0,546
	A-PRF nativ	0,143	9	,200*	0,955	9	0,747
	MM + A-PRF	0,121	9	,200*	0,97	9	0,894
HE	MM nativ	0,181	9	,200*	0,871	9	0,125
	A-PRF nativ	0,144	9	,200*	0,972	9	0,915
	MM + A-PRF	0,197	9	,200*	0,959	9	0,784
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 96							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(E)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
SMA	MM nativ	0,19	9	,200*	0,9	9	0,251
	A-PRF nativ	0,176	9	,200*	0,981	9	0,971
	MM + A-PRF	0,159	9	,200*	0,969	9	0,885
CD105	MM nativ	0,182	9	,200*	0,947	9	0,655
	A-PRF nativ	0,121	9	,200*	0,969	9	0,886
	MM + A-PRF	0,195	9	,200*	0,963	9	0,828
HE	MM nativ	0,185	9	,200*	0,929	9	0,474
	A-PRF nativ	0,169	9	,200*	0,94	9	0,584
	MM + A-PRF	0,16	9	,200*	0,95	9	0,688
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 120							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

Abbildung 12: Tests auf Normalverteilung für die MM nativ: Mucoderm® nativ, A-PRF nativ, MM+A-PRF: Mucoderm® mit A-PRF (jeweils α -SMA-Färbung, CD105-Färbung und HE-Färbung) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h, (D), 96 h, (E) 120 h.

(A)

Färbung	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
SMA	MM nativ	24 h	13,54%	4,60%	/
SMA	MM nativ	48 h	15,02%	4,63%	0,505
SMA	MM nativ	72 h	16,79%	5,38%	0,187
SMA	MM nativ	96 h	20,53%	3,67%	0,003
SMA	MM nativ	120 h	21,69%	3,50%	<0,001
SMA	A-PRF nativ	24 h	14,85%	2,34%	/
SMA	A-PRF nativ	48 h	14,85%	3,58%	0,997
SMA	A-PRF nativ	72 h	18,35%	6,08%	0,137
SMA	A-PRF nativ	96 h	20,47%	4,07%	0,003
SMA	A-PRF nativ	120 h	20,39%	3,56%	0,002
SMA	MM + A-PRF	24 h	16,67%	7,00%	/
SMA	MM + A-PRF	48 h	16,31%	4,36%	0,899
SMA	MM + A-PRF	72 h	21,38%	2,95%	0,09
SMA	MM + A-PRF	96 h	22,56%	4,59%	0,053
SMA	MM + A-PRF	120 h	24,46%	4,98%	0,016

(B)

Färbung	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (±)	Vergleich zu 24 h (p)
CD105	MM nativ	24 h	15,90%	4,67%	/
CD105	MM nativ	48 h	16,55%	4,30%	0,761
CD105	MM nativ	72 h	18,25%	6,49%	0,392
CD105	MM nativ	96 h	20,40%	4,68%	0,058
CD105	MM nativ	120 h	19,34%	6,48%	0,216
CD105	A-PRF nativ	24 h	19,57%	4,42%	/
CD105	A-PRF nativ	48 h	16,20%	5,45%	0,17
CD105	A-PRF nativ	72 h	19,72%	3,29%	0,937
CD105	A-PRF nativ	96 h	22,38%	5,26%	0,239
CD105	A-PRF nativ	120 h	19,89%	3,95%	0,875
CD105	MM + A-PRF	24 h	19,59%	7,11%	/
CD105	MM + A-PRF	48 h	17,75%	4,31%	0,518
CD105	MM + A-PRF	72 h	20,23%	4,08%	0,819
CD105	MM + A-PRF	96 h	24,47%	6,39%	0,146
CD105	MM + A-PRF	120 h	22,11%	5,41%	0,412

(C)

Färbung	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (±)	Vergleich zu 24 h (p)
HE	MM nativ	24 h	10,89	8,023	/
HE	MM nativ	48 h	10,11	4,54	0,804
HE	MM nativ	72 h	11	4,359	0,971
HE	MM nativ	96 h	15	5,852	0,234
HE	MM nativ	120 h	18,89	7,928	0,049
HE	A-PRF nativ	24 h	10,56	5,615	/
HE	A-PRF nativ	48 h	16,56	6,579	0,054
HE	A-PRF nativ	72 h	26,78	12,276	0,004
HE	A-PRF nativ	96 h	20	5,852	0,003
HE	A-PRF nativ	120 h	19,22	7,067	0,011
HE	MM + A-PRF	24 h	16,22	7,645	/
HE	MM + A-PRF	48 h	15,56	5,94	0,839
HE	MM + A-PRF	72 h	26,11	6,954	0,011
HE	MM + A-PRF	96 h	26,56	7,038	0,009
HE	MM + A-PRF	120 h	22,56	6,227	0,073

Abbildung 13: Mittelwerte, Standard-Abweichung (±) und Vergleich zu 24 h (p) für die MM nativ, A-PRF nativ und MM + A-PRF (jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) für die (A) α-SMA-Färbung, (B) CD105-Färbung und (C) HE-Färbung. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) % (B) % (C) Anzahl der Gefäße.

(A)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	MM nativ	0,129	9	,200*	0,96	9	0,796
	A-PRF nativ	0,219	9	,200*	0,941	9	0,587
	MM + A-PRF	0,2	9	,200*	0,882	9	0,164
length	MM nativ	0,174	9	,200*	0,935	9	0,535
	A-PRF nativ	0,151	9	,200*	0,971	9	0,905
	MM + A-PRF	0,253	9	0,101	0,847	9	0,068
thickness	MM nativ	0,142	9	,200*	0,967	9	0,865
	A-PRF nativ	0,221	9	,200*	0,888	9	0,192
	MM + A-PRF	0,332	9	0,005	0,799	9	0,02
branchingpoi	MM nativ	0,18	9	,200*	0,948	9	0,664
	A-PRF nativ	0,228	9	0,198	0,901	9	0,257
	MM + A-PRF	0,203	9	,200*	0,911	9	0,321
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 24							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(B)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	MM nativ	0,166	9	,200*	0,93	9	0,484
	A-PRF nativ	0,125	9	,200*	0,972	9	0,912
	MM + A-PRF	0,211	9	,200*	0,931	9	0,492
length	MM nativ	0,203	9	,200*	0,885	9	0,176
	A-PRF nativ	0,219	9	,200*	0,846	9	0,068
	MM + A-PRF	0,177	9	,200*	0,916	9	0,359
thickness	MM nativ	0,189	9	,200*	0,948	9	0,664
	A-PRF nativ	0,184	9	,200*	0,947	9	0,66
	MM + A-PRF	0,281	9	0,039	0,773	9	0,01
branchingpoi	MM nativ	0,229	9	0,192	0,868	9	0,118
	A-PRF nativ	0,241	9	0,14	0,873	9	0,131
	MM + A-PRF	0,192	9	,200*	0,881	9	0,161
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 48							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(C)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	MM nativ	0,257	9	0,089	0,864	9	0,105
	A-PRF nativ	0,318	9	0,009	0,665	9	0,001
	MM + A-PRF	0,27	9	0,057	0,869	9	0,12
length	MM nativ	0,191	9	,200*	0,936	9	0,536
	A-PRF nativ	0,195	9	,200*	0,827	9	0,041
	MM + A-PRF	0,276	9	0,047	0,823	9	0,037
thickness	MM nativ	0,261	9	0,078	0,85	9	0,075
	A-PRF nativ	0,176	9	,200*	0,876	9	0,141
	MM + A-PRF	0,173	9	,200*	0,942	9	0,599
branchingpoi	MM nativ	0,302	9	0,017	0,834	9	0,049
	A-PRF nativ	0,258	9	0,085	0,813	9	0,028
	MM + A-PRF	0,277	9	0,045	0,848	9	0,071
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 72							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(D)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	MM nativ	0,167	9	,200*	0,968	9	0,876
	A-PRF nativ	0,243	9	0,134	0,887	9	0,185
	MM + A-PRF	0,193	9	,200*	0,9	9	0,252
length	MM nativ	0,15	9	,200*	0,925	9	0,437
	A-PRF nativ	0,122	9	,200*	0,983	9	0,979
	MM + A-PRF	0,156	9	,200*	0,952	9	0,717
thickness	MM nativ	0,132	9	,200*	0,964	9	0,834
	A-PRF nativ	0,212	9	,200*	0,952	9	0,714
	MM + A-PRF	0,227	9	,200*	0,857	9	0,09
branchingpoi	MM nativ	0,16	9	,200*	0,961	9	0,812
	A-PRF nativ	0,185	9	,200*	0,924	9	0,427
	MM + A-PRF	0,211	9	,200*	0,925	9	0,437
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 96							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(E)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	MM nativ	0,257	9	0,087	0,888	9	0,19
	A-PRF nativ	0,151	9	,200*	0,965	9	0,849
	MM + A-PRF	0,293	9	0,025	0,814	9	0,029
length	MM nativ	0,18	9	,200*	0,95	9	0,692
	A-PRF nativ	0,135	9	,200*	0,983	9	0,977
	MM + A-PRF	0,176	9	,200*	0,878	9	0,149
thickness	MM nativ	0,18	9	,200*	0,9	9	0,254
	A-PRF nativ	0,312	9	0,012	0,701	9	0,001
	MM + A-PRF	0,253	9	0,101	0,832	9	0,047
branchingpoi	MM nativ	0,194	9	,200*	0,932	9	0,501
	A-PRF nativ	0,163	9	,200*	0,96	9	0,796
	MM + A-PRF	0,205	9	,200*	0,877	9	0,145
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 120							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

Abbildung 14: Tests auf Normalverteilung für die MM nativ, A-PRF nativ und MM + A-PRF (jeweils für die Parameter total area, length, thickness, branchingpoints) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h, (D) 96 h, (E) 120 h.

(A)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
total area	MM nativ	24 h	6549,22	3346,67	/
total area	MM nativ	48 h	6960,00	3268,62	0,796
total area	MM nativ	72 h	4833,33	3032,77	0,271
total area	MM nativ	96 h	9742,56	6104,20	0,193
total area	MM nativ	120 h	13116,33	9006,77	0,067
total area	A-PRF nativ	24 h	9030,22	5272,91	/
total area	A-PRF nativ	48 h	7239,11	4625,92	0,455
total area	A-PRF nativ	72 h	8138,56	11153,06	0,832
total area	A-PRF nativ	96 h	6065,00	2682,28	0,159
total area	A-PRF nativ	120 h	7239,78	4645,26	0,456
total area	MM + A-PRF	24 h	6528,22	4540,21	/
total area	MM + A-PRF	48 h	10133,89	4587,16	0,113
total area	MM + A-PRF	72 h	10458,44	7017,68	0,181
total area	MM + A-PRF	96 h	9238,22	4593,70	0,226
total area	MM + A-PRF	120 h	8926,33	6883,31	0,398

(B)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
length	MM nativ	24 h	911,65	351,23	/
length	MM nativ	48 h	1008,07	422,16	0,606
length	MM nativ	72 h	731,55	364,26	0,301
length	MM nativ	96 h	1210,05	574,93	0,206
length	MM nativ	120 h	1486,72	760,27	0,063
length	A-PRF nativ	24 h	1195,13	531,37	/
length	A-PRF nativ	48 h	925,61	511,44	0,289
length	A-PRF nativ	72 h	835,57	714,56	0,245
length	A-PRF nativ	96 h	866,83	335,28	0,14
length	A-PRF nativ	120 h	1072,31	689,21	0,678
length	MM + A-PRF	24 h	946,92	582,85	/
length	MM + A-PRF	48 h	1376,69	497,38	0,112
length	MM + A-PRF	72 h	1276,23	714,39	0,3
length	MM + A-PRF	96 h	1000,43	440,42	0,829
length	MM + A-PRF	120 h	1018,45	664,96	0,811

(C)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
thickness	MM nativ	24 h	6,85	1,12	/
thickness	MM nativ	48 h	6,80	1,57	0,937
thickness	MM nativ	72 h	5,71	2,50	0,24
thickness	MM nativ	96 h	7,45	1,92	0,431
thickness	MM nativ	120 h	8,27	2,02	0,089
thickness	A-PRF nativ	24 h	7,23	2,30	/
thickness	A-PRF nativ	48 h	7,65	2,24	0,705
thickness	A-PRF nativ	72 h	7,32	3,26	0,948
thickness	A-PRF nativ	96 h	6,78	1,23	0,615
thickness	A-PRF nativ	120 h	6,07	2,40	0,312
thickness	MM + A-PRF	24 h	6,46	1,27	/
thickness	MM + A-PRF	48 h	7,26	1,64	0,27
thickness	MM + A-PRF	72 h	7,74	2,36	0,177
thickness	MM + A-PRF	96 h	9,04	2,95	0,035
thickness	MM + A-PRF	120 h	8,85	3,63	0,093

(D)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
branchingpoi	MM nativ	24 h	21,67	12,18	/
branchingpoi	MM nativ	48 h	22,67	10,84	0,856
branchingpoi	MM nativ	72 h	15,78	12,70	0,33
branchingpoi	MM nativ	96 h	25,78	17,15	0,567
branchingpoi	MM nativ	120 h	35,44	24,68	0,16
branchingpoi	A-PRF nativ	24 h	27,44	14,77	/
branchingpoi	A-PRF nativ	48 h	21,78	13,54	0,409
branchingpoi	A-PRF nativ	72 h	15,56	16,34	0,125
branchingpoi	A-PRF nativ	96 h	21,56	12,99	0,383
branchingpoi	A-PRF nativ	120 h	27,67	20,78	0,979
branchingpoi	MM + A-PRF	24 h	22,67	16,61	/
branchingpoi	MM + A-PRF	48 h	37,33	21,57	0,127
branchingpoi	MM + A-PRF	72 h	30,78	24,17	0,42
branchingpoi	MM + A-PRF	96 h	21,33	9,19	0,836
branchingpoi	MM + A-PRF	120 h	24,89	20,61	0,804

Abbildung 15: Mittelwerte, Standard-Abweichung (\pm) und Vergleich zu 24 h (p) für die MM nativ, A-PRF nativ und MM + A-PRF (jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) für die Parameter (A) total area, (B) length, (C) thickness, (D) branchingpoints. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) pixel² [Px.²], (B) pixels [Px], (C) pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints.

(A)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
SMA	BM + i-PRF	0,288	5	,200*	0,891	5	0,365
	BM nativ	0,296	5	0,174	0,83	5	0,138
	BM + HA	0,231	5	,200*	0,884	5	0,329
	SM + HA	0,2	5	,200*	0,973	5	0,897
CD105	BM + i-PRF	0,25	5	,200*	0,945	5	0,704
	BM nativ	0,221	5	,200*	0,882	5	0,318
	BM + HA	0,17	5	,200*	0,987	5	0,967
	SM + HA	0,229	5	,200*	0,86	5	0,228
HE	BM + i-PRF	0,179	5	,200*	0,965	5	0,84
	BM nativ	0,3	5	0,161	0,922	5	0,543
	BM + HA	0,235	5	,200*	0,955	5	0,775
	SM + HA	0,209	5	,200*	0,952	5	0,753
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 24							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(B)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
SMA	BM + i-PRF	0,258	5	,200*	0,851	5	0,199
	BM nativ	0,154	5	,200*	0,992	5	0,986
	BM + HA	0,25	5	,200*	0,899	5	0,402
	SM + HA	0,187	5	,200*	0,96	5	0,805
CD105	BM + i-PRF	0,302	5	0,155	0,768	5	0,043
	BM nativ	0,113	5	,200*	1	5	1
	BM + HA	0,217	5	,200*	0,969	5	0,869
	SM + HA	0,296	5	0,177	0,836	5	0,154
HE	BM + i-PRF	0,267	5	,200*	0,922	5	0,54
	BM nativ	0,261	5	,200*	0,823	5	0,124
	BM + HA	0,341	5	0,058	0,808	5	0,094
	SM + HA	0,179	5	,200*	0,971	5	0,879
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 48							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(C)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
SMA	BM + i-PRF	0,238	5	,200*	0,876	5	0,293
	BM nativ	0,396	5	0,01	0,639	5	0,002
	BM + HA	0,336	5	0,066	0,751	5	0,03
	SM + HA	0,332	5	0,076	0,825	5	0,128
CD105	BM + i-PRF	0,342	5	0,057	0,808	5	0,093
	BM nativ	0,205	5	,200*	0,881	5	0,313
	BM + HA	0,2	5	,200*	0,931	5	0,602
	SM + HA	0,202	5	,200*	0,935	5	0,628
HE	BM + i-PRF	0,16	5	,200*	0,99	5	0,98
	BM nativ	0,171	5	,200*	0,982	5	0,947
	BM + HA	0,287	5	,200*	0,914	5	0,49
	SM + HA	0,158	5	,200*	0,991	5	0,982
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 72							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

Abbildung 16: Tests auf Normalverteilung für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils α -SMA-Färbung, CD105-Färbung und HE-Färbung) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h.

(A)

Färbung	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
SMA	BM + i-PRF	24 h	15,31%	8,72%	/
SMA	BM + i-PRF	48 h	20,32%	5,53%	0,315
SMA	BM + i-PRF	72 h	20,58%	3,51%	0,262
SMA	BM nativ	24 h	14,76%	4,68%	/
SMA	BM nativ	48 h	15,32%	4,61%	0,852
SMA	BM nativ	72 h	17,91%	3,16%	0,252
SMA	BM + HA	24 h	15,18%	6,12%	/
SMA	BM + HA	48 h	17,42%	5,00%	0,546
SMA	BM + HA	72 h	18,71%	6,62%	0,407
SMA	SM + HA	24 h	14,12%	1,93%	/
SMA	SM + HA	48 h	16,03%	2,08%	0,171
SMA	SM + HA	72 h	18,38%	2,60%	0,021

(B)

Färbung	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
CD105	BM + i-PRF	24 h	15,07%	5,76%	/
CD105	BM + i-PRF	48 h	21,70%	5,65%	0,104
CD105	BM + i-PRF	72 h	22,26%	7,13%	0,119
CD105	BM nativ	24 h	16,09%	3,01%	/
CD105	BM nativ	48 h	18,58%	5,37%	0,398
CD105	BM nativ	72 h	19,05%	4,26%	0,244
CD105	BM + HA	24 h	14,97%	3,44%	/
CD105	BM + HA	48 h	18,12%	5,61%	0,322
CD105	BM + HA	72 h	19,35%	7,60%	0,288
CD105	SM + HA	24 h	11,97%	1,16%	/
CD105	SM + HA	48 h	16,07%	2,90%	0,031
CD105	SM + HA	72 h	17,60%	2,11%	0,002

(C)

Färbung	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
HE	BM + i-PRF	24 h	23,2	9,011	/
HE	BM + i-PRF	48 h	19,6	7,301	0,508
HE	BM + i-PRF	72 h	22,8	14,481	0,96
HE	BM nativ	24 h	20	3,24	/
HE	BM nativ	48 h	15,8	10,085	0,417
HE	BM nativ	72 h	14,6	7,893	0,213
HE	BM + HA	24 h	8,4	3,647	/
HE	BM + HA	48 h	14	4,637	0,068
HE	BM + HA	72 h	19,8	6,573	0,014
HE	SM + HA	24 h	27,8	18,171	/
HE	SM + HA	48 h	34,2	20,511	0,616
HE	SM + HA	72 h	28,6	9,317	0,933

Abbildung 17: Mittelwerte, Standard-Abweichung (\pm) und Vergleich zu 24 h (p) für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils α -SMA-Färbung, CD105-Färbung und HE-Färbung) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) % (B) % (C) Anzahl der Gefäße.

(A)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	BM + i-PRF	0,217	5	,200*	0,925	5	0,56
	BM nativ	0,296	5	0,176	0,848	5	0,187
	BM + HA	0,183	5	,200*	0,961	5	0,813
	SM + HA	0,224	5	,200*	0,905	5	0,437
length	BM + i-PRF	0,232	5	,200*	0,843	5	0,173
	BM nativ	0,246	5	,200*	0,93	5	0,596
	BM + HA	0,218	5	,200*	0,948	5	0,722
	SM + HA	0,244	5	,200*	0,875	5	0,287
thickness	BM + i-PRF	0,286	5	,200*	0,873	5	0,278
	BM nativ	0,278	5	,200*	0,827	5	0,131
	BM + HA	0,214	5	,200*	0,902	5	0,423
	SM + HA	0,284	5	,200*	0,87	5	0,267
branchingpoi	BM + i-PRF	0,2	5	,200*	0,934	5	0,621
	BM nativ	0,235	5	,200*	0,88	5	0,309
	BM + HA	0,343	5	0,055	0,772	5	0,047
	SM + HA	0,224	5	,200*	0,865	5	0,245
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 24							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(B)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	BM + i-PRF	0,2	5	,200*	0,933	5	0,614
	BM nativ	0,192	5	,200*	0,96	5	0,811
	BM + HA	0,204	5	,200*	0,906	5	0,445
	SM + HA	0,289	5	,200*	0,858	5	0,222
length	BM + i-PRF	0,239	5	,200*	0,892	5	0,367
	BM nativ	0,144	5	,200*	0,993	5	0,99
	BM + HA	0,304	5	0,148	0,823	5	0,122
	SM + HA	0,305	5	0,143	0,824	5	0,126
thickness	BM + i-PRF	0,212	5	,200*	0,881	5	0,313
	BM nativ	0,23	5	,200*	0,85	5	0,195
	BM + HA	0,193	5	,200*	0,947	5	0,716
	SM + HA	0,169	5	,200*	0,952	5	0,749
branchingpoi	BM + i-PRF	0,21	5	,200*	0,935	5	0,629
	BM nativ	0,271	5	,200*	0,933	5	0,619
	BM + HA	0,245	5	,200*	0,876	5	0,292
	SM + HA	0,289	5	,200*	0,901	5	0,414
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 48							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

(C)

Tests auf Normalverteilung							
	Membran	Kolmogorov-Smirnovb			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
totalarea	BM + i-PRF	0,257	5	,200*	0,892	5	0,366
	BM nativ	0,232	5	,200*	0,913	5	0,487
	BM + HA	0,216	5	,200*	0,94	5	0,665
	SM + HA	0,205	5	,200*	0,923	5	0,548
length	BM + i-PRF	0,166	5	,200*	0,977	5	0,917
	BM nativ	0,297	5	0,172	0,834	5	0,149
	BM + HA	0,317	5	0,111	0,846	5	0,183
	SM + HA	0,294	5	0,181	0,84	5	0,164
thickness	BM + i-PRF	0,211	5	,200*	0,925	5	0,56
	BM nativ	0,23	5	,200*	0,953	5	0,761
	BM + HA	0,227	5	,200*	0,919	5	0,521
	SM + HA	0,282	5	,200*	0,872	5	0,273
branchingpoi	BM + i-PRF	0,192	5	,200*	0,942	5	0,679
	BM nativ	0,235	5	,200*	0,909	5	0,459
	BM + HA	0,225	5	,200*	0,872	5	0,276
	SM + HA	0,226	5	,200*	0,927	5	0,573
* Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.							
a Zeitpunkt = 72							
b Signifikanzkorrektur nach Lilliefors							

Abbildung 18: Tests auf Normalverteilung für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils für die Parameter total area, length, thickness, branchingpoints) zu den Zeitpunkten (A) 24 h, (B) 48 h, (C), 72 h.

(A)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
total area	BM + i-PRF	24 h	11358,20	7237,13	/
total area	BM + i-PRF	48 h	14893,40	7229,88	0,462
total area	BM + i-PRF	72 h	12645,00	3974,99	0,739
total area	BM nativ	24 h	15977,40	16582,64	/
total area	BM nativ	48 h	11626,80	8019,30	0,617
total area	BM nativ	72 h	7590,40	6933,55	0,342
total area	BM + HA	24 h	8570,40	4646,57	/
total area	BM + HA	48 h	7530,80	3854,65	0,711
total area	BM + HA	72 h	14126,60	11154,05	0,348
total area	SM + HA	24 h	6268,60	6100,04	/
total area	SM + HA	48 h	12775,80	5919,90	0,125
total area	SM + HA	72 h	12084,00	7629,40	0,222

(B)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
length	BM + i-PRF	24 h	1385,63	779,78	/
length	BM + i-PRF	48 h	1534,56	457,92	0,724
length	BM + i-PRF	72 h	1347,99	379,42	0,926
length	BM nativ	24 h	1718,34	1235,65	/
length	BM nativ	48 h	1062,55	631,97	0,332
length	BM nativ	72 h	896,04	705,88	0,241
length	BM + HA	24 h	1038,61	380,74	/
length	BM + HA	48 h	1014,05	476,77	0,931
length	BM + HA	72 h	1315,13	732,08	0,482
length	SM + HA	24 h	876,46	713,71	/
length	SM + HA	48 h	1591,14	421,96	0,099
length	SM + HA	72 h	1354,78	515,63	0,262

(C)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
thickness	BM + i-PRF	24 h	8,01	1,33	/
thickness	BM + i-PRF	48 h	9,32	2,33	0,313
thickness	BM + i-PRF	72 h	9,33	1,67	0,204
thickness	BM nativ	24 h	7,79	2,92	/
thickness	BM nativ	48 h	10,30	3,60	0,262
thickness	BM nativ	72 h	7,66	3,33	0,948
thickness	BM + HA	24 h	8,13	3,40	/
thickness	BM + HA	48 h	7,37	1,01	0,655
thickness	BM + HA	72 h	9,12	4,74	0,716
thickness	SM + HA	24 h	5,96	2,09	/
thickness	SM + HA	48 h	7,84	1,90	0,175
thickness	SM + HA	72 h	8,26	2,86	0,188

(D)

Parameter	Membran	Zeitpunkt	Mittelwert	Std.-Abw. (\pm)	Vergleich zu 24 h (p)
branchingpoi	BM + i-PRF	24 h	31,80	21,19	/
branchingpoi	BM + i-PRF	48 h	36,00	10,25	0,704
branchingpoi	BM + i-PRF	72 h	22,80	6,38	0,407
branchingpoi	BM nativ	24 h	48,20	38,15	/
branchingpoi	BM nativ	48 h	21,00	13,95	0,194
branchingpoi	BM nativ	72 h	21,20	19,74	0,21
branchingpoi	BM + HA	24 h	22,40	13,03	/
branchingpoi	BM + HA	48 h	24,60	13,39	0,799
branchingpoi	BM + HA	72 h	26,00	15,72	0,704
branchingpoi	SM + HA	24 h	21,20	20,66	/
branchingpoi	SM + HA	48 h	35,60	14,45	0,241
branchingpoi	SM + HA	72 h	30,20	11,80	0,428

Abbildung 19: Mittelwerte, Standard-Abweichung (\pm) und Vergleich zu 24 h (p) für die BM+i-PRF: Bio-Gide® mit i-PRF, Bio-Gide® nativ, BM+HA: Bio-Gide® mit HA, SM+HA: Smartbrane-Membran mit HA (jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h) für die Parameter (A) total area, (B) length, (C) thickness, (D) branchingpoints. Angaben für Mittelwerte und Standard-Abweichung jeweils in (A) pixel² [Px.²], (B) pixels [Px], (C) pixels [Px] und (D) Anzahl der branchingpoints.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater für seine permanente Unterstützung, seine Geduld und sein Vertrauen in allen Phasen dieser Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin. Ihre wertvollen Ratschläge, stetige Motivation sowie fachliche Expertise haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin richte ich ein großes Dankeschön an einen wissenschaftlichen Mitarbeiter, für seine Anregungen und Hilfestellungen, insbesondere im Umgang mit der IKOSA® Software. Ich möchte mich ganz herzlich bei dem gesamten Laborteam bedanken, das mich bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützt hat.

Zudem danke ich dem beratenden Statistiker für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, die mir während dieser Doktorarbeit eine wertvolle Stütze waren.

10 Tabellarischer Lebenslauf