

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**„Einfluss von quervernetzten und nicht quervernetzten  
xenogenen Barrieremembranen auf die Proliferation von  
humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und  
immortalisierten multipotenten parodontalen Ligamentzellen  
(PDL-hTERT)“**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Saliter

aus

München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny

Mitberichterstatter: PD Dr. Bogna Stawarczyk  
PD Dr. Attila Aszódi

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. dent. Thomas Spinell

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2019

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	6
1.1. EINSATZ VON MEMBRANEN IN DER REGENERATIVEN PARODONTALTHERAPIE .....	6
1.1.1. GEWEBE- UND KNOCHENABBAU IM KIEFER .....	6
1.1.2. GBR UND GTR .....	7
1.1.3. BARRIEREMEMBRANEN.....	8
1.2. MEMBRANEN IN KOMBINATION MIT KNOCHENERSATZMATERIALIEN UND WACHSTUMSFAKTOREN.....	10
1.2.1. KNOCHENERSATZMATERIALIEN .....	10
1.2.2. WACHSTUMSFAKTOREN .....	11
1.2.3. BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs) .....	12
1.3. PARODONTALE REGENERATION MIT TISSUE ENGINEERING UND STAMMZELLEN	14
1.4. EINFLUSS VON HYALURONSÄURE AUF DIE ANGIOGENESE UND GEWEBEHEILUNG . .....	16
1.5. BARRIEREMEMBRANEN .....	17
1.5.1. ANFORDERUNGEN AN MEMBRANEN .....	17
1.5.2. NICHT RESORBIERBARE MEMBRANEN .....	19
1.5.3. RESORBIERBARE MEMBRANEN.....	21
1.5.4. FLÜSSIGE BARRIEREMEMBRANEN.....	23
2. ZIELE DER STUDIE .....	25
3. MATERIAL UND METHODEN .....	26
3.1. MEMBRANEN, REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE .....	26
3.2. ZELLKULTUR .....	30
3.2.1. ZELLEN .....	30
3.2.2. KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN, ZELLKULTURMEDIENTEN UND WST-1 .....	31
3.2.3. BESTIMMUNG DER ZELLPROLIFERATION MIT DEM WST-1-TEST .....	31
3.2.4. PASSAGIEREN, TRYPSINIEREN UND KULTIVIEREN DER ZELLEN.....	32

3.2.5. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL .....	33
3.2.6. LAGERUNG VON ZELLEN.....	35
3.2.7. AUFTAUEN VON ZELLEN .....	35
3.2.8. VORBEREITUNG UND ANORDNUNG DER MEMBRANEN .....	35
3.3. VORVERSUCHE .....	36
3.3.1. WACHSTUMSKURVE PDL-HTERT .....	37
3.3.2. WACHSTUMSKURVE HMSC .....	37
3.4. HAUPTVERSUCHE.....	38
3.4.1. UNTERSUCHUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON MEMBRANEN AUF HMSC ZELLEN	38
3.4.2. UNTERSUCHUNG DER ZYTOTOXIZITÄT DER MEMBRANEN AUF PDL-HTERT ZELLEN.....	41
3.5. QUANTITATIVER NACHWEIS VON HYALURONSÄURE IN DEN BARRIEREMEMBRAN... .....	43
3.5.1. ELISA ZUM QUANTITATIVEN NACHWEIS VON HYALURONSÄURE .....	43
3.5.2. KOMPETITIVER ELISA .....	44
3.5.3. VERSUCHSAUFBAU .....	45
3.6. ZYTOKIN-/ WACHSTUMSFAKTORENBESTIMMUNG.....	46
3.7. STATISTIK .....	51
4. ERGEBNISSE .....	52
4.1. ERGEBNIS WACHSTUMSKURVE PDL-HTERT .....	52
4.2. ERGEBNIS WACHSTUMSKURVE HMSCs .....	53
4.3. ZYTOTOXIZITÄT DER MEMBRANEN AUF HMSC ZELLEN.....	55
4.4. VERGLEICH DES ZELLWACHSTUMS VON ADHÄRENTEN UND NICHT ADHÄRENTEN HMSC-ZELLEN IM WASCHELUAT .....	58
4.5. ZYTOTOXIZITÄT DER MEMBRANEN AUF PDL-H TERT ZELLEN .....	60
4.6. NACHWEIS FREIER HYALURONSÄURE IN DEN MEMBRANEN.....	64
4.7. BESTIMMUNG FREIER WACHSTUMSFAKTOREN IN DEN BARRIEREMEMBRANEN ..	67
5. DISKUSSION .....	76
5.1. VERSUCHSAUFBAU .....	76

5.2. ZELLPROLIFERATION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ART DER BARRIEREMEMBRAN	78
5.3. ZELLPROLIFERATION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORBEHANDLUNG UND QUERVERNETZUNG DER MEMBRAN.....	81
5.3.1. ZELLPROLIFERATION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORBEHANDLUNG (WASCHEN) DER MEMBRAN.....	81
5.3.2. ZELLPROLIFERATION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER QUERVERNETZUNG DER MEMBRAN.....	82
5.4. NACHWEIS VON HYALURONSÄURE IN DEN BARRIEREMEMBRANEN .....	84
5.5. NACHWEIS VON WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSFAKTOREN IN DEN BARRIEREMEMBRANEN .....	87
6. ZUSAMMENFASSUNG .....	90
7. ANHANG .....	92
7.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	92
7.2. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	94
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	101
9. DANKSAGUNG.....	120
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	121

# 1. Einleitung

## 1.1. Einsatz von Membranen in der regenerativen Parodontaltherapie

### 1.1.1. Gewebe- und Knochenabbau im Kiefer

Der Rückgang von Gewebe und Knochen im Kiefer ist ein häufig auftretender Prozess im menschlichen Körper. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Oftmals sind chronische Entzündungsprozesse im Rahmen einer Parodontitis- oder Periimplantitiserkrankung ein Grund für Gewebeabbau einschließlich Knochenresorption, genauso wie die physiologische Atrophie nach Zahnverlust, oder fehlende funktionelle Belastung der Zähne und des Kieferknochens (Ebel 2006).

Ebenso ist es möglich, dass im Rahmen von Extraktionen, Tumor- oder Zystenentfernungen, sowie einer Wurzelspitzenresektion, ausgedehnte Knochendefekte entstehen. Schließlich kann im Zusammenhang mit einer Implantatversorgung ein zu kleines Knochenvolumen anzutreffen sein, das die therapeutische Regeneration von pathogen verlorenem Knochengewebe erfordert. Die Regeneration und Neubildung von Knochen und Gewebe bei bestehender Knochenresorption oder knöchernen Defekten, sowie die Wiederherstellung der verlorengegangenen Strukturen des Zahnhalteapparates sind zentrale Ziele der parodontalen und kieferchirurgischen Therapie, besonders im ästhetischen Bereich der Frontzähne und Prämolaren im Oberkiefer (Hynes et al. 2000).

Neben der Möglichkeit, im Rahmen augmentativer- und parodontalchirurgischer Eingriffe auf Eigenknochen des Patienten zurückzugreifen, haben sich mittlerweile verschiedene Arten von Knochenersatzmaterialien bewährt (Aghaloo und Moy 2007). Anders als körpereigener Knochen stehen Knochenersatzmaterialien unbegrenzt zur Verfügung. Weitere Vorteile der Knochenersatzmaterialien sind die nicht vorhandene

zusätzliche Morbidität im Bereich der Spenderregion (Blutungen, Hämatome oder Wundheilungsstörungen an der Entnahmestelle ) einschließlich der Vermeidung von Infektionen (Younger und Chapman 1989; Günther et al. 1998; Linhart 2000). Zudem birgt Eigenknochen langfristig eine höhere Gefahr der sekundären Resorption des Knochens. Bei der regenerativen Therapie von parodontalen Gewebedefekten durch die Technik der GTR mit Hilfe von autologen Transplantaten besteht außerdem ein spezifisches Risiko von Wurzelresorptionen und Ankylosen (Wehrhan et al. 2008; Eickhoff 2005). Knochenersatzmaterialien werden in der Regel in Kombination mit sogenannten Barrieremembranen verwendet. Die Membranen können zusätzlich mit Wachstumsfaktoren in die Defekte eingebracht werden.

### **1.1.2.GBR und GTR**

Seit Beginn der 1980er Jahre wurde das zunächst in tierexperimentellen Untersuchungen entwickelte GBR/ GTR-Behandlungsverfahren in der regenerativen Parodontaltherapie angewendet (Caffesse et al. 1994).

Unter GBR (Guided bone regeneration/ gesteuerte Knochenregeneration) versteht man Verfahren zum Aufbau des knöchernen Alveolarfortsatzes vor der Insertion von enossalen Implantaten. Durch den Einsatz von Membranen soll das schnell proliferierende Weichgewebe vom Einwachsen in den zu regenerierenden Knochendefekt abgehalten und somit die Knochenneubildung begünstigt werden (Donos et al. 2002, Kostopoulus und Karring 1994b).

Die GTR (Guided tissue regeneration/ gesteuerte Geweberegeneration) beschreibt Behandlungskonzepte, welche die Regeneration und Neubildung der Strukturen des Zahnhalteapparates, vor allem des parodontalen Ligaments, des dentalen Zements und des Alveolarknochens ermöglichen. Sowohl das GTR- als auch das GBR-Verfahren soll die vollständige therapeutische Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes („restitutio ad integrum“) möglich machen (Soheilifar et al. 2014; Karring et al. 1980; Nyman et al. 1980).

### 1.1.3. Barrieremembranen

Im Rahmen früherer Studien wurde die Vermutung aufgestellt, dass Art und Qualität des späteren Attachments von den Zellen bestimmt werden, die nach parodontalchirurgischen Eingriffen als erste die Wurzeloberfläche wiederbesiedeln (Melcher und Bowen 1969). Hierbei sollte es sich um Zellen der Wurzelhaut handeln (Nyman et al. 1982a; Nyman et al. 1982b). Wird die Wurzeloberfläche stattdessen zuerst von gingivalen Bindegewebszellen oder Knochenzellen besiedelt, kann es zur Adhäsion zwischen Hart- und Weichgewebe mit Resorptionen und Ankylosen kommen (Nyman et al. 1980). Deshalb ist es für eine optimale Wundheilung und parodontal ligamentäres Attachment bislang nötig, die um die Besiedelung der Zahnwurzeloberfläche konkurrierenden langsam proliferierenden Zellen wie Osteoblasten und parodontale Zellen, von schnell proliferierenden Bindegewebs- und Epithelzellen zu trennen. Dass mechanische Barrieren in Form von Membranen die Trennung der Zellen ermöglichen, konnten erstmals Nyman et al. zeigen (Nyman et al. 1982a). Durch die Verwendung von Membranen besiedeln multipotente Stammzellen der Wurzelhaut postoperativ als erste die Zahnwurzeloberfläche (Gottlow et al. 1984). Die gingivalen Bindegewebs- und Epithelzellen werden von der Wurzeloberfläche abgehalten wodurch die eher langsam proliferierenden parodontalen Gewebearten, wie der Wurzelzement, das Desmodont und der alveoläre Knochen ausreichend Zeit haben, neue Gewebestrukturen zu bilden (Karring et al. 1980; Nyman et al. 1980). So kann eine regenerative Heilung mit vollständiger Restitution des Zahnhalteapparates erreicht werden.

Eine Studie von Karring et al. hat ergeben, dass auch die Neubildung von pathogen zerstörtem Wurzelzement ein zentraler Schritt in der Regeneration des Attachments ist. Die Untersuchung konnte zeigen, dass an Zähnen, welche ein zwar reduziertes, aber gesundes Desmodont besitzen, neues bindegewebiges Attachment gebildet wird. Dies wurde auf die koronale Wanderung von desmodontalen Zellen zurückgeführt (Karring et al. 1985).

Eine Studie von Seo et al. belegt, dass das menschliche parodontale Ligament multipotente adulte Stammzellen enthält (PDLSCs), welche fähig sind, sich in osteoblastäre, (ligament-)fibroblastäre (desmodontale) oder zementoblastäre Richtung zu differenzieren (Seo et al. 2004; Park et al. 2011).

Ohne die gesteuerte Gewebe- und Knochenregeneration resultiert regelmäßig eine reparative Wundheilung, was bedeutet, dass es zur Bildung eines in die Tiefe



reichenden, langen Saumepithels kommt, welches die physiologische desmodontale Verbindung von Knochen und Wurzeloberfläche verhindert (Caton und Nyman 1980). Im Jahr 1982 wurde das GTR Verfahren mit Membranen erstmals erfolgreich am Menschen durchgeführt. Hierbei wurde eine Membran aus Kunststoff zwischen Zahnwurzeloberfläche und Mukoperiostlappen eingesetzt (Dahlin et al. 1988; Nyman et al. 1982a).

Im Rahmen der GBR werden Membranen verwendet, um ein Einwachsen des schnell proliferierenden Weichgewebes in den knöchernen Defekt zu verhindern (Lee et al. 2013, Donos et al. 2002). Zudem ermöglicht der Einsatz von Membranen bei GBR eine Knochenneubildung in Arealen, in denen zuvor kein Knochen vorhanden war (Donos et al. 2001; Kostopoulos und Karring 1994b). Verschiedene Studien zeigen den Heilungserfolg von Knochendefekten durch GBR mittels Membranen (Kostopoulos und Karring 1994a, Hämmeler et al. 1995, Matzen et al. 1996, Donos et al. 2002). In einer Studie von Kostopoulos und Karring wurde die Knochenregeneration mit Barrieremembranen bei Kieferdefekten von Ratten untersucht. Die Defekte wurden auf der einen Seite mit resorbierbaren Membranen, auf der kontralateralen Seite ohne Membranen abgedeckt. Es wurde festgestellt, dass die Membranen das den Knochendefekt umgebende Weichgewebe abgehalten haben. Somit wurde das Einwachsen von knochenbildenden Zellen in den Defekt verbessert (Kostopoulos und Karring 1994a). Allerdings konnten bei der Untersuchung auch Probleme bei der Verwendung der Membranen festgestellt werden. Teilweise war das Einbringen der Membran in den Defekt aufgrund der Rigidität der Membranen erschwert oder es kam zur Bildung eines kleinen Spalts zwischen Membran und dem den Defekt umgebenden Knochen.

In einer Studie von Donos et al. wurden Knochendefekte im Unterkiefer von Ratten mit autologen Knochentransplantaten und Titanimplantaten versorgt. Auf der einen Seite wurde das Transplantat mit einer e-PTFE Membran abgedeckt, auf der kontralateralen Seite wurde keine Membran verwendet. Nach 180 Tagen war auf der Seite mit Membranen der Hohlraum komplett mit Knochen aufgefüllt und das Knochentransplantat nicht mehr vom neugebildeten Knochen zu unterscheiden. Auf der Kontrollseite dagegen traten Resorptionen sowie eine fehlende Verbindung zwischen Knochentransplantat und dem ortsständigen Knochen auf (Donos et al. 2001).

Andere Studien zeigen einen geringeren Erfolg bei der Verwendung von Membranen im Rahmen der GBR. So ist es möglich, dass Knochendefekte nicht vollständig mit

Knochen aufgefüllt werden, weil umgebendes Weichgewebe einen zu großen Druck auf die Membran ausübt, was letztlich den Kollaps der Membran in den Defekt verursacht (Donos et al. 2001; Zellin et al. 1995). Das Risiko eines Einbruchs der Membran kann jedoch durch zusätzliches Einbringen von autogenem Knochen in die Defekte reduziert werden (Donos et al. 2001, Dahlin et al. 1991). Lee et al. untersuchten die gesteuerte Knochenregeneration unter Verwendung von autogenem Knochen mit und ohne Membran an 20 Patienten. Zwischen den beiden Versuchsgruppen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verringerung der Knochendefekthöhe oder der Knochenregeneration festgestellt (Lee et al. 2013). In anderen Studien hat die Verwendung einer Membran die Häufigkeit von Wundöffnungen erhöht. Daraus resultierte eine frühzeitige Membranexposition, was die Regeneration des periimplantären Gewebes und die Knochenregeneration beeinträchtigt hat (Lee et al. 2013, Gotfredsen et al. 1994, Moses et al. 2005). Mittlerweile ist GBR/ GTR mit Membranen als Barriere und Platzhalter zur klinischen Standardtherapie bei parodontal- und oralchirurgischen Eingriffen wie dem Setzen von Implantaten oder der Behandlung parodontaler Knochendefekte geworden (Buser 2010; Hynes et al. 2000; Hammerle und Jung 2003). Im Rahmen dieser Therapie haben sich verschiedene Arten von Membranen in der klinischen Anwendung bewährt.

## **1.2. Membranen in Kombination mit Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren**

### **1.2.1. Knochenersatzmaterialien**

Je nach Form und Morphologie des Defekts wird die Membran entweder allein oder in Kombination mit Knochenersatzmaterial angewendet, um den Defekt und die Membran zu stabilisieren. Man unterscheidet zwischen biologisch gewonnenen und synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterialien.

Zu den biologisch gewonnenen Materialien gehören autogener Knochen (vom selben Individuum, z.B. aus der Kinnregion), allogener Knochen (von derselben Spezies, z.B. Leichenknochen) und xenogener Knochen (von einer anderen Spezies, z.B. Rinderknochen). Bei den synthetisch hergestellten, alloplastischen Materialien, stehen Keramiken, Metalle und Polymere zur Verfügung. Auch Verbund- und Kompositmaterialien zählen zu den Knochenersatzmaterialien (Smeets und Kolk 2010). Autogener Knochen ist osteoinduktiv, er enthält eigene undifferenzierte, pluripotente Zellen, welche sich zu knochenbildenden Zellen entwickeln und somit die Knochenneubildung ermöglichen. Allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien sind osteokonduktiv, sie fungieren als Leitstruktur um die Neogenese des eigenen Knochens zu unterstützen (Albrektsson und Johansson 2001, Lee 2016).

### **1.2.2. Wachstumsfaktoren**

Neben Membrantechnik und Knochenersatzmaterial sind auch Wachstumsfaktoren bei der Wundheilung und Knochenregeneration von Bedeutung und werden entweder allein oder in Kombination mit Membranen und/oder Knochenersatzmaterialien eingesetzt (Lee et al 2001; Linde und Hedner 1995; Dimitriou et al. 2012).

Als Wachstumsfaktoren bezeichnet man Signalproteine, die eine Vielzahl regulatorischer Funktionen erfüllen und als Botenstoffe zwischen verschiedenen Zellen wirken. Einige Faktoren sind hauptsächlich an immunologischen Vorgängen sowie der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt und können spezifische Signale in der gleichen oder in benachbarten Zellen (autokrin oder parakrin), aber auch systemisch in entfernt liegenden Zielzellen (endokrin) auslösen. Andere steuern hauptsächlich Wachstumsvorgänge und die Proliferation und Differenzierung von Zellen.

Wachstumsfaktoren wirken durch Bindung an membranständige Rezeptoren, welche durch Konformitätsänderung im Zellinneren eine intrazelluläre Signalkaskade, die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren und letztlich die Genexpression auslösen (Hauser et al. 2012).

Man unterscheidet Wachstumsfaktoren autogenen, xenogenen und rekombinanten Ursprungs. Faktoren autogenen Ursprungs werden aus dem Blut bzw. den Thrombozyten des Patienten gewonnen. Xenogenen Ursprungs bedeutet, dass

Faktoren aus tierischen Organen oder Geweben gewonnen werden. Unter rekombinanten Wachstumsfaktoren versteht man solche, die gentechnisch hergestellt werden können. In den Granula vorkommende Wachstumsfaktoren sind z.B. PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1; 2), IGF-I, IGF-II (Insulin-like Growth Factor I; II), FGF (Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor) und EGF (Epidermal Growth Factor) (Christgau et al. 2006; Weibric et al. 2002).

Vor allem PDGF, TGF $\beta$  und IGF sind für die parodontale Regeneration von Bedeutung (Okuda et al. 2003). PDGF kann in den Isoformen AA, BB und AB vorliegen. Es fördert die Fibroblastenproliferation, Kollagensynthese sowie die Chemotaxis von Osteoblasten, Fibroblasten und Monozyten (Kawase et al. 2003).

Von TGF- $\beta$  gibt es ebenfalls drei Isoformen, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3. Es stimuliert die Kollagensynthese und Regeneration von Knochen und Knorpel sowie die Chemotaxis von inflammatorischen Zellen (Kapp und Smola 2006).

IGF kann in zwei Isoformen als IGF-I und IGF-II vorliegen. Es fördert die Proliferation von Osteoblasten sowie die Kollagensynthese.

Lynch et al. konnten nachweisen, dass eine Kombination von PDGF und IGF-I zu einer vermehrten Neubildung von parodontalem Ligament, Zement und Knochen führen kann (Lynch et al. 1991).

bFGF steigert die Proliferation von Zellen mesenchymalen Ursprungs, induziert die Differenzierung endothelialer Zellen und stimuliert durch Förderung der Angiogenese die Ossifikation von Knorpel. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass bFGF die Sekretion des Faktors VEGF erhöht (Hodde et al. 2007; Claffey et al. 2001).

VEGF kann in den Isoformen VEGF- A bis VEGF- F vorliegen und ist im Rahmen der Angiogenese und Knochenregeneration von Bedeutung.

### **1.2.3. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)**

Bei der Verwendung von allogenen Knochen kann entweder mineralisierte oder demineralisierte Knochenmatrix eingesetzt werden. Mineralisierte Knochenmatrix wird nach ihrer Entnahme zur Entfernung potentiell infektiöser und allergener Bestandteile aufbereitet, das mineralisierte Gewebe behält bei diesem Vorgang aber seine natürliche Struktur bei (FDDB – Freeze-dried bone allograft). Wird die Knochenmatrix

dagegen entfettet, die Knochenminerale entfernt und die Matrix anschließend gefriergetrocknet, spricht man von demineralisierter Knochenmatrix bzw. DFDBA (demineralized freeze-dried bone allograft). Durch dieses Vorgehen werden Verfügbarkeit und Wirksamkeit der enthaltenen Wachstumsfaktoren gesteigert und somit eine höhere osteoinduktive Wirkung ermöglicht (Schwartz et al. 1998).

Bei diesen Wachstumsfaktoren handelt es sich um knochenmorphogenetische Proteine (Bone Morphogenic Proteins), kurz BMPs, die im organischen Anteil der Knochenmatrix vorkommen und undifferenzierte mesenchymale Stammzellen im perivaskulären Bindegewebe und im Knochen aktivieren (Nogami und Urist 1975, Smeets und Kolka 2010). BMPs sind lösliche Wachstumsfaktoren, die eine Untergruppe der TGF- $\beta$  Superfamilie (Transforming Growth Factor Beta) darstellen (Wozney 2002)

und in der Regel an ein geeignetes Trägermaterial wie Kollagen Typ-1 Schwämme oder Kalziumphosphat gebunden werden, um einen zu schnellen Abbau zu verhindern sowie eine gleichmäßige Freisetzung zu gewährleisten (Govender et al. 2002; Winn et al. 1998). Sie sind an der embryonalen Entwicklung von Organen und verschiedener Gewebearten wie Knochen und Knorpel, Zellproliferation, Gefäßneubildung und Apoptose beteiligt (Hogan 1996; Onishi et al. 1998). Tierstudien zeigten zudem, dass BMPs die Regeneration von Zement, parodontalem Faserapparat und Knochen fördern können (Rao et al. 2013; Sigurdsson et al. 1995). In dreidimensionalen Pelletkulturen induzieren sie die Differenzierung von Pulpazellen zu Odontoblasten und somit die Dentinbildung (Iohara et al. 2004).

BMPs wurden zunächst aus dem Knochen von Menschen und Tieren entnommen (humane BMPs). Nach Aufschlüsselung ihrer Struktur durch Wang et al. wurde es möglich, BMPs gentechnisch durch molekulare Klonierung in Zellkulturen herzustellen (rekombinante humane BMPs) (Wang et al. 1990).

Entscheidend für die Wirksamkeit der BMPs ist die Konzentration, in der sie eingesetzt werden. Im Rahmen klinischer Studien konnte für BMP-2 eine Konzentration von 1,5 mg/ml als wirkungsvoll nachgewiesen werden (Govender et al. 2002).

### 1.3. Parodontale Regeneration mit Tissue Engineering und Stammzellen

Einen weiteren Ansatz zur parodontalen regenerativen Heilung stellen das Tissue Engineering und die Stammzellbiologie dar. Unter Tissue Engineering versteht man die Förderung der Geweberegeneration und Wiederherstellung des Ursprungszustands des Gewebes durch die Verwendung von Stammzellen. Damit die Stammzellen proliferieren und sich ausbreiten können, werden sie an ein geeignetes, biokompatibles Trägermedium gekoppelt. Zusätzlich werden bioaktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren eingesetzt, welche die Zelldifferenzierung fördern (Langer und Vacanti 1993; Shinoka et al. 1997 Bonassar und Vacanti 1998; Khan et al. 2012). Die Zellen werden als dreidimensionales Konstrukt kultiviert und anschließend in den Organismus reimplantiert.

Stammzellen sind Körperzellen, die eine Art Ursprungszelle darstellen und sich in nahezu alle Zelltypen und Gewebe der drei Keimblätter differenzieren können. Embryonale Stammzellen kommen nur in Embryos vor und sind pluripotent, können sich also zu Zellen jeden menschlichen Organs entwickeln. Postnatal dagegen sind im Körper adulte Stammzellen vorhanden, sie sind multipotent und können sich nur zu Zellen eines einzigen Organs entwickeln (Hynes et al. 2000). Sie dienen in erster Linie als Ersatzzellen für durch Gewebeschädigungen verloren gegangene Zellen. Bei mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um Stammzellen des Bindegewebes, welche sich zu Adipozyten, Myozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen differenzieren können (Pittenger et al. 1999). Sie werden hauptsächlich aus dem Knochenmark (BMSSC, bone marrow stromal stem cells), aber z.B. auch dem Fettgewebe oder Nabelschnurblut gewonnen. Kawaguchi et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in Kombination mit Kollagenträgern bei Hunden zur regenerativen Neubildung von Zement, parodontalem Ligament und Alveolarknochen geführt hat (Kawaguchi et al. 2004).

Auch Stammzellen des parodontalen Ligaments sind bei dem Prinzip der zellbasierten Geweberegeneration in Kombination mit geeigneten Biomaterialien von großer Bedeutung, da sie die Fähigkeit besitzen, in vivo Knochen- und PDL- ähnliche Strukturen zu bilden (Docheva et al. 2010).

PDL Zellen sind nach ihrem Ursprungsgewebe, dem parodontalen Ligament (PDL), bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Bindegewebe, welches den Spalt zwischen Alveolarknochen und Zahnwurzel ausfüllt. Es setzt sich aus einem faserreichen Anteil mit überwiegend kollagenen Fasern und einem zellulären Anteil zusammen. Dieser besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, welche den Auf- und Abbau der kollagenen Fasern regulieren. Zudem finden sich dort Osteo- und Zementoprogenitorzellen, Osteoklasten, Osteo- und Zementoblasten, Leukozyten und epitheliale Zellreste (Nanci und Bosshardt 2006).

PDL Zellen zeigen fibroblastenähnliche Eigenschaften, wodurch sie in der Lage sind, verschieden Kollagene zu produzieren und weisen zusätzlich Merkmale von Osteoblasten auf, was ihnen die Fähigkeit verleiht, für den Knochenaufbau wichtige Proteine und Enzyme (Osteonectin, Alkalische Phosphatase) zu sezernieren. Zudem konnte in vitro die Differenzierung von Stammzellen aus dem parodontalen Ligament zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten nachgewiesen werden (Docheva et al. 2010; Fujii et al. 2008; Jonsson et al. 2011). Seo et al. gelang es, Stammzellen des parodontalen Ligaments aus extrahierten Weisheitszähnen zu gewinnen und zu zeigen, dass sie

nach In- vivo- Transplantation in der Lage sind, Wurzelzement und parodontale Fasern zu bilden (Seo et al. 2004). Die parodontalen Stammzellen scheinen demnach fähig, in Osteoblasten, Zementoblasten und Fibroblasten zu differenzieren. Auch in Tierversuchen wie der Versorgung von infraalveolären Defekten bei Schweinen durch PDL Zellen konnte eine verstärkte regenerative Heilung dokumentiert werden (Liu et al. 2008).

Die PDL-hTERT Zelllinie stammt von PDL Zellen ab und wurde durch einen Lentivirus-basierten Gentransfer mit der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) gezüchtet. Es handelt sich um immortalisierte Zellen, welche den Primärzellen in ihrer Morphologie und Verdopplungszeit ähneln, jedoch eine verlängerte Lebensdauer besitzen (Docheva et al. 2010).

## 1.4. Einfluss von Hyaluronsäure auf die Angiogenese und Gewebeheilung

Hyaluronsäure (HA) ist ein Glykosaminoglykan-Polysaccharid, das aus verknüpften Disacchariden aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin zusammengesetzt ist und ein Molekulargewicht zwischen einigen Kilodalton und  $10^6$  Dalton besitzen kann.

HA wurde 1934 von Meyer und Palmer im Glaskörper von Rinderaugen entdeckt (Meyer und Palmer 1934) und kommt in Haut und Gelenken sowie als wesentlicher Bestandteil der Extrazellulären Matrix und des Bindegewebes vor, so auch dem Bindegewebe der Mundschleimhaut und der Gingiva (Laurent und Fraser 1992; Tammi et al. 1990).

Hyaluronsäure scheint aufgrund ihrer Eigenschaften ein geeignetes Mittel zur Behandlung pathologischer Veränderungen des Parodontiums zu sein. Sie reguliert den Wasser- und Feuchtigkeitshaushalt der Haut, zeigt eine antiödematöse und antiinflammatorische Wirkung und hat als Radikalfänger einen protektiven Effekt. HA fördert zudem durch Regulation von Zellteilungsmechanismen, Zellproliferation und Migration die Wundheilung und Angiogenese und kann durch Interaktionen mit der extrazellulären Matrix die parodontale Integrität wiederherstellen (David-Raoudi et al. 2008; Laurent et al. 1995; Moseley et al. 2002; Myint et al. 1987; Toole et al. 2002). Verschiedene Studien zeigen die entzündungshemmende Wirkung von Hyaluron. So konnte bei der Behandlung von plaqueinduzierter Gingivitis durch zusätzlich Anwendung von hyaluronsäurehaltigen Gels die vorhandene Plaque und der Sulkusblutungsindex reduziert werden (Jentsch et al. 2003; Pistorius et al. 2005). Entscheidend für die Wirkung von Hyaluronsäure ist ihre Molekülgröße. Bezüglich der Steuerung der Angiogenese durch Hyaluronsäure konnte gezeigt werden, dass kleinere Hyaluronsäurefragmente die Proliferation stärker fördern als größere (West und Kumar 1989). Niedermolekulares HA, welches als eine Gruppe von HA Fragmenten mit einer Größe von 4-25 Disacchariden definiert ist, wirkt pro-angiogen, es stimuliert die Endothelzellproliferation, Zellmigration und Neovaskularisation. Hochmolekulare Hyaluronsäure dagegen scheint die Zellproliferation und Angiogenese zu hemmen, wobei die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen variieren (Gao et al.



2010; West und Kumar 1989). Hochmolekulare Hylauronsäure scheint bei der Knochenneubildung von Bedeutung zu sein. In künstlich geschaffenen Knochendefekten konnte nach Verwendung von hochmolekularer HA eine Osteoblastenanreicherung und Knochenregeneration beobachtet werden (Sasaki und Watanabe 1995).

Pirnaza et al. zeigten, dass Hyaluronsäure mit einem hohen Molekulargewicht (1300 KD) einen bakteriostatischen Effekt auf verschiedene Bakterienspezies, darunter *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* haben. Eine bakterizide Wirkung konnte dagegen nicht festgestellt werden (Pirnazar et al. 1999).

## 1.5. Barrieremembranen

### 1.5.1. Anforderungen an Membranen

Um ihre volle Funktionsfähigkeit im Rahmen des GBR/GTR Prinzips ausschöpfen zu können, müssen Barrieremembranen verschiedene Grundvoraussetzungen erfüllen (Scantlebury 1993). Die wichtigste Anforderung stellt die klinisch nachweisbare Biokompatibilität dar, zudem sind eine gute Gewebeintegration, Raum- bzw. Platzhalterfunktion, Zellokklusivität und eine möglichst einfache klinische Handhabung entscheidende Auswahlkriterien (Soheilifar et al. 2014; Dimitriou et al. 2012; Scantlebury 1993; Tatakis et al. 1999). Auch Material und Design der Membranen sind von Bedeutung.

#### *Biokompatibilität*

Biokompatibilität bedeutet, dass die verwendeten Materialien in Kontakt mit lebendem Gewebe keinen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel ausüben (Williams 2008). Gerade bei implantierten Materialien ist dies von enormer Bedeutung, da sie über einen längeren Zeitraum mit den umgebenden Körpergeweben in Kontakt stehen und

daher keine Abwehrreaktionen hervorrufen dürfen. Bestimmt wird die Biokompatibilität durch Effekte wie Zytotoxizität, Histokompatibilität oder mutagene Wirkung.

### *Gewebeintegration*

Gewebeintegration ist eine wichtige Grundlage für eine gute mechanische Stabilität des behandelten Knochenareals (Haney et al. 1993). Dabei hängt das Einwachsen des umgebenden Gewebes von der chemischen Zusammensetzung, der Oberflächenstruktur sowie der Porosität der Membran ab. So sollte die Membran porös sein, um eine ausreichende Wundstabilität gewährleisten zu können (Claffey et al. 1989). Des Weiteren sollte sie nicht rigide sein, sondern eine gewisse Flexibilität aufweisen, um die Adaptation zu erleichtern.

### *Platzhalterfunktion*

Es ist wichtig, dass Membranen nach dem Einsetzen eine ausreichende Formstabilität aufweisen, um den Hohlraum, in welchem sich das Blutkoagulum bildet, sicher aufrecht zu erhalten. Verliert die Membran ihre mechanische Widerstandsfähigkeit, geht die für die Regeneration benötigte Raumsicherung verloren (Hardwick et al. 1994; Soheilifar et al. 2014). Um solch einem möglichen Zusammenbruch der Membran vorzubeugen, kann es notwendig sein, zusätzlich Materialien wie Knochentransplantate oder Knochenersatzmaterialien einzusetzen, welche die Membran stabilisieren und stützen (Lundgren et al. 1994).

### *Zellokklusivität*

Die Verhinderung des Einwachsens von unerwünschten gingivalen Bindegewebezellen in den Bereich, in dem die Knochenregeneration stattfindet, ist ein weiteres wichtiges Auswahlkriterium für Membranen (Tatakis et al. 1999). Gleichzeitig sollte die Barrieremembran aber durchlässig für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Gefäßen sein (Soheilifar et al. 2014; Scantlebury 1993).

### *Klinische Handhabung*

Der Behandler sollte die Membran möglichst schnell und einfach zur benötigten Größe und Form verarbeiten und an der gewünschten Stelle einbringen können (Tatakis et al. 1999). Um sie ideal an die jeweilige Defektmorphologie anzupassen, wird die Membran während des Eingriffs in der Regel so zurechtgeschnitten, dass sie den Knochendefekt um ca. 2- 3 mm überragt. Zudem sollte die Membran abgerundet werden, um scharfkantige Stellen zu vermeiden. Nach der Lappenbildung wird sie manschettenartig über den Defekt gelegt, bevor der Lappen wieder adaptiert wird (Bornstein et al. 2007). Der Lappen sollte dabei ca. 3 mm koronal über die Membran reichen.

Grundsätzlich sind heute zwei Arten von Membranen im Einsatz. Man unterscheidet zwischen den vor allem früher verwendeten nicht-resorbierbaren Membranen und resorbierbaren Membranen.

### **1.5.2. Nicht resorbierbare Membranen**

Nicht resorbierbare Membranen waren lange Zeit der Goldstandard in der GBR/GTR Therapie (Zellin et al. 1995). Die Membranen bestehen aus Polytetrafluorethylen, welches als e-PTFE (= expandiertes Polytetrafluorethylen, Gore Tex) oder d-PTFE (= hochdichtes Polytetrafluorethylen) Verwendung findet. Polytetrafluorethylen ist ein Polymer aus Fluor und Kunststoff und zeichnet sich durch chemische Beständigkeit, eine lange Lebensdauer sowie gute Verträglichkeit aus (Tatakis et al. 1999, Sheikh et al. 2014). Expandiertes PTFE entsteht durch eine spezielle Verarbeitungsform des Polytetrafluorethylens und führt im Material zu verbesserten Festigkeitseigenschaften. Bereits seit den 1970iger Jahren wird Polytetrafluorethylen erfolgreich in der Herz- und Gefäßchirurgie verwendet (Hanel et al. 1982) und seit den späten 1980er – und frühen 1990er- Jahren auch standardmäßig in der Zahnmedizin im Rahmen der GBR/GTR Verfahren (Becker et al. 1999; Buser et al. 1999).

e-PTFE und d-PTFE unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihrer Porosität. e-PTFE hat eine Porengröße von 5- 20  $\mu\text{m}$ , wodurch Bakterien mit einer kleineren Porengröße das Eindringen in den Defekt ermöglicht wird. Bei d-PTFE Membranen hingegen beträgt die Porengröße weniger als 0,3  $\mu\text{m}$ . Durch diese deutlich dichtere Struktur wird

die Passage von Bakterien verhindert. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass selbst bei freiliegenden d-PTFE Membranen das Risiko für Komplikationen wie Infektionen oder Wundheilungsstörungen sehr gering ist. d-PTFE Membranen eignen sich demnach besonders bei Eingriffen, bei welchen ein primärer Weichgewebsverschluss nicht möglich ist (Liu and Kerns 2014, Bartee 1995, Ghensi et al. 2017).

Verschiedene Studien zeigen den Behandlungserfolg von GBR/GTR mit nicht resorbierbaren Membranen (Becker et al. 1992; Dahlin et al. 1990; Simion et al. 1994). Dahlin et al. erzeugten an 30 Ratten Knochendefekte im Unterkiefer. In der einen Kieferhälfte wurde zum Abdecken des Defektes eine e-PTFE Membran benutzt, die andere Kieferseite, auf der keine Membran eingesetzt wurde, diente als Kontrolle. Nach 3 Wochen war bei der Hälfte der Ratten auf der Seite mit der Membran die Knochenheilung abgeschlossen, nach 6 Wochen auch bei den restlichen Tieren. Auf der Kontrollseite ohne Membran konnte dagegen keine oder eine nur geringe Knochenregeneration festgestellt werden (Dahlin et al. 1994; Liu and Kerns 2014). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Verwendung von e-PTFE Membranen in Knochendefekten bei Versuchen mit Affen erzielt (Dahlin et al. 1990). Allerdings konnten Studien auch belegen, dass es während der Einheilungszeit zur Exposition der e-PTFE Membran kommen kann, häufig verbunden mit dem frühzeitigen Verlust der Membran (Buser 2010, Gielkens et al. 2008). Daraus können Infektionen, Wundheilungsstörungen und eine geringere Knochenheilung resultieren (Black et al. 1994; Simion et al. 1994). Die Freilegung der Membran kann daher auch ihre frühzeitige Entfernung erfordern (Selvig et al. 1992). Zudem liegt in der Notwendigkeit einer zweiten Operation zur chirurgischen Entfernung der Membranen ein weiterer Nachteil. Neben den allgemeinen Risiken einer erneuten OP birgt dies die Gefahr der Traumatisierung des neugebildeten Gewebes (Buser 2010). Dass bei d-PTFE Membranen hingegen auch bei freiliegender Membranoberfläche eine erfolgreiche Behandlung möglich ist, konnte eine Untersuchung von Ghensi et al. zeigen (Ghensi et al. 2017).

In einer Studie von Walters et al. konnte hinsichtlich der vertikalen Knochenregeneration und Weichgewebsheilung bei 14 Patienten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen e-PTFE und d-PTFE Membranen festgestellt werden (Liu und Kerns 2014).

### **1.5.3. Resorbierbare Membranen**

Resorbierbare Membranen werden innerhalb weniger Wochen vom Körper resorbiert, wodurch kein Zweiteingriff nötig ist und Behandlungszeit sowie Behandlungskosten reduziert werden (Zellin et al. 1995; Rakhmatia et al. 2013). Sie verwachsen mit der Wundseite (=Unterseite) des Weichgewebelappens und zeigen deshalb deutlich seltener eine postoperative Exposition als nicht-resorbierbare Membranen, welche nicht vom Weichgewebe integriert werden. In der Folge ist das Regenerationsergebnis mit resorbierbaren Membranen oftmals besser (Hämmerle und Jung 2003; Garcia et al. 2017). Resorbierbare Membranen werden entweder aus natürlichen Biomaterialien von Menschen und Tieren oder als synthetische Membranen aus Polymeren hergestellt.

#### **1.5.3.1. Resorbierbare biologische Membranen**

Bei den resorbierbaren biologischen Membranen handelt es sich um Membranen aus Kollagen, extrazellulärer Matrix (ECM), azellulärer dermalen Matrix oder sie werden synthetisch durch electro-spinning produziert. Das Kollagen stammt entweder von Tieren (z.B. Schwein, Rind) oder ist menschlichen Ursprungs (z.B. Dura mater). Kollagen ist ein unlösliches Faserprotein mit der Struktur einer Tripelhelix und besitzt eine hohe Zugfestigkeit. Es wird vor allem Kollagen Typ-I verwendet, welches der Hauptbestandteil parodontaler Gewebe ist, oder eine Kombination aus Typ-I- und Typ-III Kollagen. Ursprungsgewebe sind Dermis, Sehngewebe, Perikard und Peritoneum. Durch enzymatische Reaktionen wird die Kollagenmembran umgebaut und in das parodontale Gewebe eingefügt. Die Resorption von Kollagen wird durch Kollagenasen gestartet, welche das Kollagen spalten. Die Bruchstücke denaturieren unter Temperatureinwirkung zu Gelatine. Anschließend wird es zu Oligopeptiden und natürlichen Aminosäuren abgebaut (Macke 2000).

Vorteile der Verwendung von Kollagen oder ECM in Membranen sind neben ihrer eigentlichen Barrierefunktion der biologische Einfluss auf die Knochenbildung und die Chemotaxis für Fibroblasten, was den Heilungsverlauf begünstigen kann (Buser 2010). Zudem fördert Kollagen die Migration von Desmodontalzellen und beschleunigt die Hämostase (Greenstein und Caton 1993; Rothamel et al. 2004). Auch die leichte Handhabung spricht für diese Membranen, sie müssen aufgrund ihrer Biegsamkeit nicht vernäht werden und haften durch ihre hydrophoben Eigenschaften gut am sich bildenden Fibrinpräzipitat auf der Zahnwurzeloberfläche.

Da es allerdings häufig zu früh zur Resorption des Kollagens kommt, wurden unterschiedliche Verfahren durchgeführt, die auf chemischer, physikalischer oder enzymatischer Ebene die Quervernetzung des Kollagens ermöglichen (Garcia et al. 2017; Brunel et al. 1996; Quteish und Dolby 1992; Jorge-Herrero et al. 1999). Studien konnten zeigen, dass es durch die Quervernetzung mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden wie zum Beispiel durch Glutaraldehyd (GA), Diphenylphosphorylazid (DPPA) oder Ultraviolettbestrahlung ermöglicht wird, die Barrierefunktion der Kollagenmembran zu verlängern (Moses et al. 2005; Quteish und Dolby 1992). Die Resorption der quervernetzten Kollagenmembran dauert länger als die von nicht quervernetzten Membranen (Macke 2000). In einer anderen Studie wurde anhand von 28 Patienten die Wirkung einer quervernetzten Kollagenmembran in Kombination mit bovinem Knochenmineral (DBBM) als Platzhalter mit einer e-PTFE Membran mit demselben Knochenersatzmaterial verglichen. Nach vier Wochen war das Ergebnis eine sekundäre Heilung der vorzeitig exponierten quervernetzten Kollagenmembran, während im exponierten Bereich der e-PTFE Membran keine Heilung stattfand. Insgesamt wurde die Knochenregeneration weder in der Test-, noch in der Kontrollgruppe durch die Membranexposition beeinträchtigt (Friedmann et al. 2002). Allerdings konnten auch Nachteile der quervernetzten Membranen festgestellt werden. Durch die Quervernetzung wird zwar die Resorption der Membranen gehemmt, jedoch führt die Verlängerung der Standzeit (Resorptionszeit) zu einer Veränderung der klinischen Eigenschaften der Membranen, wodurch sie den nicht-resorbierbaren Membranen ähnlicher werden. Dementsprechend wird das Regenerationsergebnis schlechter und das Risiko der postoperativen Membranexposition nimmt zu. Auch die biologischen Effekte der resorbierbaren Membranen nehmen durch die Quervernetzung ab (Rothamel et al. 2014).

So kann es bei dem am häufigsten verwendeten Quervernetzungsverfahren, der Verwendung von Glutaraldehyd, zur Bildung zytotoxischer Rückstände kommen (Speer et al. 1980; An et al. 2017). In einem Tierversuch zur Untersuchung der Knochenregeneration in Defekten der Hundemandibula kam es im Bereich der durch quervernetzte Kollagenmembranen abgedeckten Defekte zum Auftreten von Dehiszenzen und einer sehr geringen Knochenregeneration (Buser 2010).

### **1.5.3.2. Resorbierbare synthetisch hergestellte Membranen**

Neben den resorbierbaren Membranen aus natürlichen Biomaterialien kommen in der Parodontaltherapie auch verschiedene synthetische aliphatische Polyester wie Polyglykolide (PGAs), Polylaktide (PLAs) und die daraus bestehenden Kopolymere zum Einsatz (Gotfredsen et al. 1994; Magnusson et al. 1988).

Der Vorteil der synthetischen resorbierbaren Membranen liegt in ihrer Materialbeschaffenheit, welche es dem Körper ermöglicht, den Stoff abzubauen und zu metabolisieren. Beeinflusst wird der Abbau durch Faktoren wie Form und Struktur der Polymere, ihre chemische Zusammensetzung oder die Verarbeitungsbedingungen. Bei der Verwendung von Polymeren, auch als Nahtmaterial in der Medizin oder als Platten- oder Schraubenmaterial in der Chirurgie, konnten allerdings auch Fremdkörperreaktionen und Entzündungen festgestellt werden, die zum Teil die Entfernung des Materials erzwungen und die Regeneration beeinträchtigt haben (Bergsma et al. 1993; Bornstein et al. 2007; Gotfredsen et al. 1994).

Auch die Folgen einer vorzeitigen Exposition von Polymermembranen wurde untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es bereits kurz nach der Exposition zur Resorption der Membran kam. Diese war nach ca. drei- bis vier Wochen abgeschlossen. Die Leiter der Studie bewerteten dies zum einen als positiv, da eine Spontanheilung mit Gewebeverschluss ermöglicht wird und es infolgedessen zu einer kürzeren Expositionszeit von Membran und Wundbereich kommt und ein insgesamt geringeres Risiko für eine bakterielle Invasion besteht. Als nachteilig wurde aufgeführt, dass die Raumsicherung und die Barrierefunktion der Membran zu früh verloren geht, was wiederum die Knochen- und Gewebsregeneration beeinträchtigt (Bornstein et al. 2007; Simion et al. 1997).

### **1.5.4. Flüssige Barrieremembranen**

Neben den bisher genannten resorbierbaren und nicht resorbierbaren Membranen kommen auch Barrierematerialien in fließfähiger Form zum Einsatz. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um flüssige Polyethylenglykol-(PEG-)Hydrogele. Aus diesem Material kann während der Operation eine individuelle Membran angefertigt werden und zusammen mit einem Knochentransplantat bzw. Knochenersatzmaterial direkt auf

einen Knochendefekt aufgebracht werden. Die gute Biokompatibilität und Zellokklusivität der PEG-Hydrogele ist bekannt, weshalb sie neben der Parodontologie unter anderem auch in der Gefäßchirurgie verwendet werden (Wallace et al. 2001, Dehnavi et al. 2018, Stancu et al. 2014). Herten et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass PEG-Membranen in einem Versuch an Ratten eine gute Biokompatibilität und Gewebeintegration ermöglichen. In einer anderen Studie wurden bei der Versorgung von Knochendefekten an 37 Patienten mit PEG- Hydrogelen die gleichen Erfolge erzielt wie mit Kollagenmembranen (Wang et al. 2016, Herten et al. 2009, Jung et al.2009).



## 2. Ziele der Studie

Ziel dieser Studie war es, die Wirkung von fünf verschiedenen Barrieremembranen auf die metabolische Aktivität und das Wachstum von humanen parodontalen Stammzellen (PDL-hTERT) und humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Anteil an löslichen, funktionell aktiven biologischen Molekülen in den fünf Membranen analysiert und quantifiziert werden. Für quantitative Bestimmungen wurden Vergleiche zwischen den Membranen vorgenommen. Bei diesen Vergleichen wurde die Nullhypothese angenommen, wonach kein Unterschied zwischen den zu vergleichenden Membrantypen besteht (Spinell et al. 2019).

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Membranen, Reagenzien, Materialien und Geräte

Gegenstand der vorliegenden Studie waren fünf verschiedene chirurgische Barrieremembranen unterschiedlicher Hersteller, sowie zwei verschiedene Zelllinien, die kultiviert und für die Biokompatibilitätsprüfungen genutzt wurden. Nachfolgend werden die verwendeten Membranen, Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte aufgelistet, sowie die Methodik der Versuchsreihen erläutert (Tab. 1-5). Untersucht wurden fünf resorbierbare Membranen xenogenen Ursprungs, darunter vier Kollagenmembranen sowie eine Membran aus extrazellulärer Matrix (Spinell et al. 2019).

Bei den untersuchten Kollagenmembranen handelt es sich um Membranen vom Typ BioGide (BG, Geistlich Pharma), diese nicht quervernetzten Membranen stammen aus Schweinedermis. BioMend Membranen (BM, Zimmer Biomet) sind über Glutaraldehyd quervernetzte Kollagenmembranen und werden aus Schweinedermis gewonnen. OsseoGuard Membranen (OG, Zimmer Biomet) sind über Formaldehyd quervernetzte Kollagenmembranen und haben ihren Ursprung in der Achillessehne vom Rind. OssixPlus Membranen (OX, Datum Dental) sind über Polysaccharide quervernetzte Kollagenmembranen und stammen vom Schwein. Bei DynaMatrix Membranen (DM, Keystone Dental) handelt es sich um nicht quervernetzte Membranen aus extrazellulärer Matrix, welche aus der Lamina propria des Dünndarms (SIS= small intestinal submucosa) vom Schwein gewonnen werden.

Membran	Zusammensetzung	Ursprung	Gewebe	Quervernetzung
BG	Kollagen Typ I	Schwein	Haut	Nein
BM	Kollagen Typ I+III	Rind	Sehne	Glutaraldehyd
DM	Extrazelluläre Matrix	Schwein	Dünndarm-Submukosa	Nein
OG	Kollagen	Rind	Sehne	Formaldehyd
OX	Kollagen	Schwein	Haut	Polysaccharide

**Tab. 1:** Übersicht über die verwendeten Membranen mit Angabe von Zusammensetzung, Ursprung, Gewebe und Quervernetzung (Spinell et al. 2019)

Membran	Hersteller
BG	Geistlich Pharma AG, Schweiz
BM	Zimmer Biomet, USA
DM	Keystone Dental, USA
OG	Zimmer Biomet, USA
OX	Datum Dental, Israel

**Tab. 2:** Übersicht über die verwendeten Membranen mit Angabe des Herstellers

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich, Deutschland
D-MEM Serum frei, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH, Deutschland
MEM- $\alpha$ (Minimum Essential Medium)	Gibco, USA
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Gibco, USA
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin	Gibco, USA
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics, Deutschland
Hyaluronan Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit	Echelon, USA
Human Growth Factor Array Q1	Ray-Biotech, USA

**Tab. 3:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Zellkulturflasche T-75	Sigma-Aldrich, Deutschland
Multischale 24-Well	Greiner BioOne, Deutschland
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym Biotech, Deutschland
Reagenzröhren 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Stanze mit 13 mm Durchmesser	KS Tools, Deutschland
Schere	Hu- Friedy, Deutschland
Anatomische Pinzetten	Hu- Friedy, Deutschland
Schleifstein	Hu- Friedy, Deutschland

**Tab. 4:** Übersicht über die verwendeten Materialien mit Angabe des Herstellers

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrobiologische Werkbank Holten Laminar Airflow	Thermo Fisher, USA
Inkubator HERA cell 150i	Thermo Fisher, USA
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Deutschland
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckmann Coulter, Deutschland
ELISA Reader Tecan Infinite M200	Tecan Group LTd., Schweiz
Surescan DNA Microarray Scanner (G2505C)	Agilent, USA

**Tab. 5:** Übersicht über die verwendeten Geräte mit Angabe der Typenbezeichnung und des Herstellers

## **3.2. Zellkultur**

### **3.2.1. Zellen**

Für die Durchführung der Versuche wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, Lonza, Schweiz) sowie immortalisierte parodontale Ligamentzellen (PDL-hTERT) verwendet (Docheva et al. 2010).

### **3.2.2. Kultivierungsbedingungen, Zellkulturmedien und WST-1**

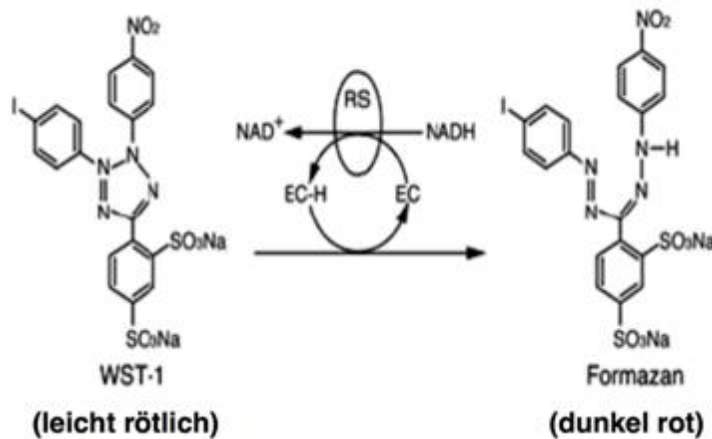
Um eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, erfolgte die Kultivierung der Zellen unter sterilen und aseptischen Bedingungen an einer Sterilbank (Holten Malinar Airflow, Thermo Fisher, USA). Die Zellkulturen wurden in feuchter Atmosphäre im Brutschrank (HERA cell 150i, Thermo Fisher, USA) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die humanen mesenchymale Stammzellen wurde als Nährmedium  $\alpha$ -MEM (Gibco, USA, LOT 1651111) verwendet. Um die Proliferation und Adhärenz der Zellen zu verbessern, sowie eine Kontamination mit Keimen zu verhindern, wurden zu 450 ml Zellkulturmedium  $\alpha$ -MEM zusätzlich 10% FBS (Gibco, USA, LOT 112M3395) und 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) zugegeben.

Für die Kultivierung der parodontalen Ligamentzellen hTERT wurde als Nährmedium DME-Medium (Gibco, Carlsbad, USA, LOT RNBD7614) verwendet. Zur Verbesserung von Zellproliferation und Adhärenz wurde zu 450 ml DME-Medium 10% FBS zugegeben.

### **3.2.3. Bestimmung der Zellproliferation mit dem WST-1-Test**

Das Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) dient dem Nachweis der Zellproliferation. Das Probenkit enthält WST-1 und ein Elektron bindendes Reagenz, die in sterilem PBS gelöst sind.

Bei WST1 handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz, das nur bei stoffwechselaktiven Zellen eine Reaktion auslöst. Die lebenden Zellen ermöglichen dabei eine Spaltung des Salzes WST1 durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen in Formazan (Abb. 1). Ein Anstieg der Zellzahl führt zur Steigerung der Enzymaktivität und zu einer vermehrten Bildung des Farbstoffes. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 450 nm, die Referenzwellenlänge bei 655 nm, durch den ELISA Reader Tecan Infinite m200 (Tecan Group Ltd., Schweiz) quantifiziert.



**Abb. 1:** Reaktionsweg des Tetrazoliums Salzes WST-1 zu Formazan. Das Enzym Succinat-Tetrazolium-Reduktase (=RS) spaltet das Tetrazolium-Salz WST-1 in einer Reduktionsreaktion zum Tetrazolam-(Formazan)- Farbstoff; EC= Elektronenaufnehmer. (übernommen aus: Roche Applied Science, Februar 2011)

### 3.2.4. Passagieren, Trypsinieren und Kultivieren der Zellen

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen passagiert, um ein weiteres Wachstum anzuregen.

Die Passagierung erfolgte entsprechend dem nachfolgendem Schema (Tab. 6): Das Nährmedium wurde mit einer sterilen Pasteurpipette (Sarstedt, Deutschland) aus den verwendeten Zellkulturflaschen (T75) abgesaugt und die Zellen in zwei Durchgängen mit je 3 ml PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 2 ml Trypsin zugesetzt und die Lösung für 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Zellkontakte zu lösen und die Zellen zu dissoziieren. Dann wurde der Zellrasen abgeklopft und die Trypsinaktivität durch Hinzufügen von 4 ml Medium gestoppt. Von dem Gemisch aus Medium und Trypsin wurden 6 ml in ein 25 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min zur Sedimentierung der Zellen bei 1.200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Trypsinreste dadurch entfernt und die Zellen in neuen T75 Zellkulturflaschen, welche 10 ml frisches Medium enthielten, rekultiviert. Um für die Zellen ideale Lebensbedingungen zu gewährleisten und eine Kontamination mit Pilzen, Bakterien oder Hefezellen ausschließen zu können, wurde das



Nährmedium zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt und die Aussaat unter dem Mikroskop betrachtet.

Nummer	Arbeitsschritt
1	Absaugen des Nährmediums
2	Zweimaliges Waschen der Zellen mit 3 ml PBS
3	Lösen der Zellkontakte durch Zugabe von 2 ml Trypsin
4	Inkubation für 5 min bei 37°C im CO <sub>2</sub> Inkubator
5	Inhibieren des Trypsins durch Zugabe von 4 ml Nährmedium
6	Überführen in 25 ml Reaktionsgefäß
7	Sedimentieren der Zellen durch Zentrifugation bei 1.200 U/min
8	Absaugen des Überstands und Reaktivierung der Zellen
9	Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau und modifizierter Neubauer- Zählkammer

**Tab. 6:** Protokoll zur Passagierung der Zellen

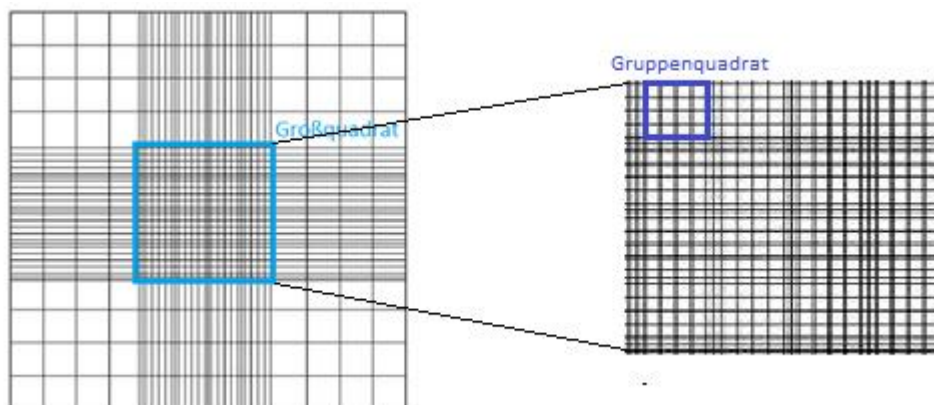
### 3.2.5. Bestimmung der Zellzahl

Um vor jedem Versuchsansatz die Zellzahl zu bestimmen und lebende Zellen von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden 100 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt und die Anzahl der Zellen pro ml mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer samt Deckglas ermittelt (Abb. 2). Die Zell-Trypan- Lösung wurde in die vier Felder der Zählkammer eingebracht, jeweils die Anzahl der lebenden Zellen pro Feld bestimmt und der Mittelwert gebildet (Abb. 3). Durch anschließendes

Multiplizieren mit dem Verdünnungsfaktor 1,66 und  $1 \times 10^4$  konnte die Anzahl der Zellen pro Milliliter bestimmt werden.



**Abb. 2:** Modifizierte Neubauer Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl; die Platte besteht aus zwei breiten Außenfeldern und drei schmalen Innenfeldern. Im mittleren Innenfeld befindet sich der Mittelsteg, in diesen sind zwei Zählnetze eingraviert (übernommen aus P+W Medizintechnik, 2012).



**Abb. 3:** Aufbau des Zählfeldes; das Zählnetz besteht aus neun großen Quadraten mit je 1mm Seitenlänge. Die vier in den Ecken liegenden Großquadrate bestehen aus je 16 Quadraten mit 0,25 mm Seitenlänge. Das mittige Großquadrat besteht aus 25 Gruppenquadraten mit je 0,2mm Seitenlänge. Die Gruppenquadrate wiederum bestehen aus 16 Kleinstquadraten mit je 0,05 mm Seitenlänge (Baussmerth 2014).

### **3.2.6.Lagerung von Zellen**

Vorübergehend nicht mehr benötigte Zellen wurden zur Lagerung für spätere Experimente eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei  $-180^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Hierfür wurde das Medium entfernt, zweimal mit PBS gewaschen, 2 ml Trypsin dazugegeben und die Zellkulturflaschen für 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach Abklopfen der Zellen wurde durch die Zugabe von 4 ml Medium die Trypsinaktivität gestoppt und das Zell-Trypsin-Gemisch in ein 25 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert ( $300 \times g$ , 8 Min). Nach Absaugen des Überstands wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in 10 ml frisches Medium gegeben. Dann wurde die gewünschte Anzahl von Zellen in ein davor berechnetes Volumen Einfriermedium in Kryoröhrchen pipettiert. Zur Konservierung wurde hierfür ein Einfriermedium aus 90 % FBS (Sigma-Aldrich, Deutschland) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH, Deutschland) hergestellt. Die Röhrchen wurden verschlossen, über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und anschließend in den Stickstofftank überführt.

### **3.2.7.Auftauen von Zellen**

Um Zellen aufzutauen, wurden die eingefrorenen Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt und die enthaltene Zellsuspension in ein mit frischem Medium gefülltes 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Nach dem Zentrifugieren konnte der Überstand abgesaugt und die Zellen in eine Medium enthaltene Zellkulturflasche eingebracht werden.

### **3.2.8.Vorbereitung und Anordnung der Membranen**

Für die Versuchsdurchführung wurden die Membranen entsprechend dem nachfolgenden Schema vorbereitet. Die Membranen wurden unter sterilen Bedingungen ausgepackt und einzeln mit Pinzetten entnommen. Auf einem sterilen Schleifstein wurden sie unter Zuhilfenahme einer Stanze mit einem Durchmesser von 13 mm sowie einer Schere in eine runde Form gebracht. Anschließend wurden sie mit

Pinzetten in die entsprechenden Wells überführt. In den Versuchen wurden 24-Wellplatten verwendet. Von jedem der fünf untersuchten Membrantypen wurden jeweils vier Proben analysiert (n= 4). Die Anordnung der Membranen in den Wells erfolgte bei jedem Versuch entsprechend der Darstellung in Tabelle 7.

BG	BM	DM	OG	OX	+CTR
BG	BM	DM	OG	OX	+CTR
BG	BM	DM	OG	OX	+CTR
BG	BM	DM	OG	OX	+CTR

**Tab. 7:** Membrananordnung in allen Versuchen. In den 24-Wellplatten befinden sich in der ersten Spalte je vier BioGide Membranen, in der zweiten Spalte je vier BioMend Membranen, in der dritten Spalte je vier DynaMatrix Membranen, in der vierten Spalte je vier OsseoGuard Membranen, in der fünften Spalte je vier OssixPlus Membranen und in der sechsten Spalte je vier Positivkontrollen.

### 3.3. Vorversuche

Im Rahmen von Vorversuchen wurden für PDL-hTERT Zellen und hMSC-Zellen unter Verwendung des Reagenz WST1 Wachstumskurven erstellt. Ziel der Vorversuche war, anhand der ermittelten Wachstumskurven den Zeitraum zu bestimmen, in dem sich die Zellen eindeutig im Wachstum befinden. Dieser Zeitraum wurde in den Hauptversuchen gewählt, um die Zytotoxizität der Membranen auf humane Zellen zu untersuchen.

### **3.3.1. Wachstumskurve PDL-hTERT**

Das Wachstum der PDL-hTERT Zellen sollte über einen Zeitraum von 12 Tagen bestimmt werden. Parodontale Ligamentzellen wurden hierfür über einen Zeitraum von sieben Tagen kultiviert, um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde die Konfluenz der Zellen mikroskopisch beurteilt, welche bei 70-80% liegen sollte, da eine vollständige Bedeckung der Fläche zu einer gegenseitigen Behinderung der Stoffwechselfvorgänge und des Wachstums der Zellen führen könnte. Als die gewünschte Konfluenz erreicht war, wurden die PDL-hTERT-Zellen in der 33. Passage entsprechend des Schemas der Passagierung gelöst. Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS, wurde Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben, fünf Minuten im Brutschrank inkubiert, durch Zugabe von Medium die Zellablösung gestoppt und die Zellen ausgezählt. Anschließend wurden jeweils 500 µl Zellsuspension, je ca. 10.000 Zellen enthaltend, auf 26 Wells von zwei 24- Wellplatten aufgeteilt. In einem Abstand von 24 Stunden wurden jeweils 50 µl WST1 zu zwei Wells mit Zellsuspension hinzu pipettiert. Nach anschließender einstündiger Inkubation der Wellplatten bei 37°C im Brutschrank erfolgte die Messung der Absorption mit Hilfe eines ELISA- Readers (Tecan Group LTd., Schweiz). Aus Messwert und Referenzwert wurde die Differenz ermittelt und anschließend aus den zwei Differenzwerten der Mittelwert berechnet. Das Medium in den Wells wurde in einem Abstand von drei bis vier Tagen gewechselt. Das Wachstum der PDL-hTERT Zellen ist in Abbildung 6 dargestellt.

### **3.3.2. Wachstumskurve hMSC**

Auch für die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurde in Vorversuchen zunächst eine Wachstumskurve erstellt. Das Wachstum wurde unter Verwendung von WST1 über einen Zeitraum von 14 Tagen ermittelt. Hierfür wurden die hMSC Zellen zunächst für zwei Wochen kultiviert und nach mikroskopischer Beurteilung ihrer Konfluenz in der 5. Passage gelöst. Dies erfolgte nach dem bereits zuvor beschriebenen Schema durch Absaugen des Mediums, Waschen mit PBS, Trypsinierung, Inkubation und Abbruch der Zelllösung durch Zugabe von Medium. Die Zellen wurden ausgezählt und jeweils 500 µl der Zellsuspension, welche je ca. 12.000 Zellen enthielten, in 30 Wells gegeben. In einem Zeitabstand von 24 Stunden wurden

jeweils 50 µl WST1 zu zwei Wells mit Zellsuspension hinzu pipettiert. Die Wells wurden nachfolgend für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgte mittels ELISA die Messung der Absorption. Aus den beiden Messwerten wurde der Mittelwert bestimmt. Der Mediumwechsel in den Wells erfolgte in einem Abstand von drei bis vier Tagen. Das Wachstum der hMSC Zellen ist in Abbildung 7 dargestellt.

### **3.4. Hauptversuche**

#### **3.4.1. Untersuchung der Zytotoxizität von Membranen auf hMSC Zellen**

Es wurde ein Versuch zur Untersuchung der Zytotoxizität von Membranen auf humane mesenchymale Stammzellen durchgeführt. Zusätzlich sollte geprüft werden, inwieweit sich ein vorheriges Waschen der Membranen im Vergleich zu ungewaschenen Membranen auf die Zellproliferation auswirkt und ob die Zellen vermehrt in den Plattenwells oder an den Membranen haftend nachgewiesen werden können. Das von gewaschenen Membranen gewonnene Eluat wurde des Weiteren in der Zellkultur getrennt von den Membranen auf Zytotoxizität getestet. Im Folgenden werden zunächst die verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Zellen sowie der genaue Versuchsablauf erläutert. Die Anordnung der Membranen und Positivkontrollen erfolgte jeweils entsprechend der Darstellung in Kapitel 3.2.8. (Tabelle 7).

##### **3.4.1.1. Kultivierung der hMSC Zellen an ungewaschenen und gewaschenen Membranen**

Für die Kultivierung der hMSC Zellen an ungewaschenen Membranen wurden von jedem Membrantyp jeweils vier Membranproben (n=4) vorbereitet und ungewaschen in eine 24-Wellplatte gegeben.

Für die Kultivierung der hMSC Zellen an gewaschenen Membranen wurden zunächst von jedem Membrantyp je acht Membranproben (n=8) nach oben beschriebenem Vorgehen vorbereitet und drei Tage in je 700 µl Medium (α-MEM, FBS, PenStrep) gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Membranen in zwei Gruppen aufgeteilt und je 4 Stück jeder Membran mit Pinzetten in zwei 24-Wellplatten überführt. Nachfolgend wurden hMSC Zellen nach dem zuvor beschriebenen Vorgehen gelöst und ausgezählt. Es wurden 400 µl Zellsuspension, welche je 10.000 Zellen enthielten, zu den ungewaschenen und den gewaschenen Membranen zugegeben. Auch in die Wells der Positivkontrollen der Platten wurden je 400 µl Zellsuspension hinzugefügt. Die Platten wurden nachfolgend bei 37°C im CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel in allen Wells. Es wurden 300 µl des Mediums mit einer Pipette entfernt und durch 300 µl frisches Nährmedium ersetzt. Nach weiteren vier Tagen wurde das Medium erneut gewechselt. 200 µl des Mediums wurden entfernt und durch 200 µl frisches Medium ersetzt.

7 Tage nach Beginn der Zellkultivierung erfolgte die Bestimmung des Zellwachstums an den ungewaschenen und gewaschenen Membranen. Hierfür wurden drei neue Platten vorbereitet und jeweils 500 µl Medium sowie 50 µl WST1 in 20 Wells jeder Platte pipettiert. Dann wurden die Membranproben mit Pinzetten aus den Platten entnommen und in die entsprechenden Wells der neuen Platten überführt. Diese Platten dienten der Bestimmung des Zellwachstums an den Membranen selbst. Aus den Platten, aus denen die Membranen entnommen wurden, wurde die Zellsuspension abgesaugt und ebenfalls 500 µl Medium und 50 µl WST1 dazugegeben. Diese drei Platten dienten der Bestimmung des Zellwachstums in den Plattenwells. Die 6 Platten wurden jeweils bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend die Absorption gemessen (Spinell et al. 2019).

### **3.4.1.2. Kultivierung der hMSC Zellen im Eluat der gewaschenen Membranen und ohne Membranen**

In einem weiteren Versuchsschritt wurde die Zellproliferation der hMSC Zellen im Eluat der gewaschenen Membranen untersucht. Hierfür wurde das Eluat der acht gewaschenen Membranproben (n=8) einzeln mit einer Pipette aus den Wells aufgenommen und in die entsprechenden Wells von zwei 24-Wellplatten überführt. Zusätzlich wurden hMSC Zellen ohne Membranen (= Kontrollen) in einer 24-Wellplatte

kultiviert.

Nachfolgend wurden hMSC Zellen nach dem zuvor beschriebenen Vorgehen gelöst und ausgezählt. 400 µl Zellsuspension, welche je 10.000 Zellen enthielten, wurden zu dem Eluat der gewaschenen Membranen sowie in die Platte ohne Membranen zugegeben. Die Platten wurden anschließend bei 37°C im CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel. In eine der beiden Platten mit Wascheluat wurde in jedes Well 100 µl frisches Medium pipetiert. Bei der Platte, welche ausschließlich Zellsuspension enthielt wurde in den vier Kontrollwells das alte Medium entfernt und 500 µl frisches Medium zugegeben. In den anderen 20 Wells dieser Platte wurde die Zellsuspension abgesaugt und das Wascheluat aus der zweiten Platte aufpipetiert und in die Wells überführt.

Nach weiteren vier Tagen wurde das Medium erneut gewechselt. Bei der Platte zur Kultivierung von hMSCs im Wascheluat aus der ersten Platte wurde der Inhalt der 24 Wells abgesaugt und danach 500 µl frisches Medium sowie 50 µl WST dazugegeben. Dann wurde die Platte für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend erfolgte mit dem ELISA- Reader die Messung der Absorption.

Das gleiche Vorgehen wurde nach weiteren 24 Stunden für die zweite Platte mit Wascheluat gewählt. Die Zellsuspension wurde entfernt und zunächst 500 µl frisches Nährmedium, danach 50 µl WST1 dazugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde die Absorption ermittelt.

### **3.4.1.3. Vergleich des Zellwachstums von nicht adhärennten und adhärennten hMSC- Zellen im Eluat von gewaschenen Membranen**

In einem weiteren Versuchsschritt sollte das von gewaschenen Membranen gewonnene Eluat in der Zellkultur getrennt von den Membranen auf Zytotoxizität getestet werden. Ziel war es, das Zellwachstum von nicht adhärennten sowie von adhärennten humanen mesenchymalen Stammzellen im Eluat der verschiedenen Membranen zu ermitteln und miteinander, sowie mit dem Kontrollwachstum, zu vergleichen.

Von jeder Membran wurden acht Proben (n=8) nach dem in Kapitel 3.2.8. (Tabelle 7) beschriebenen Vorgehen vorbereitet und je vier Stück jeder Membran auf zwei 24-



Wellplatten aufgeteilt. Anschließend wurden die Membranen mit 400 µl Medium gewaschen. Nach 72 Stunden wurden die Membranen aus den Platten entfernt, das Eluat der Membranen wurde in den Wells belassen.

Es wurde eine 24-Wellplatte vorbereitet, welche der Bestimmung des Zellwachstums im Eluat von nicht adhärennten Zellen diene. Hierfür wurden jeweils 100 µl Zellsuspension welche 12000 Zellen enthielten und 400 µl Eluat in 20 Wells der Platte gegeben.

In eine weitere Platte, welche der Bestimmung des Zellwachstums im Eluat der adhärennten Zellen diene, wurden 100 µl Zellsuspension, welche 12000 Zellen enthielten und 400 µl Medium gegeben. Nach 24 Stunden und somit Adhärenz der Zellen wurde das Medium entfernt und 400 µl Eluat sowie 100 µl Medium pro Well hinzugegeben. Der Mediumwechsel in den Platten erfolgte nach drei Tagen.

Nach sieben Tagen wurden 500 µl Medium sowie 50 µl WST1 in die Wells gegeben. Die beiden Platten wurden jeweils bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend die Absorption gemessen (Spinell et al. 2019).

### **3.4.2. Untersuchung der Zytotoxizität der Membranen auf PDL-hTERT Zellen**

Ein weiterer Versuch diene der Untersuchung der Zytotoxizität von Membranen auf parodontale ligamentäre Stammzellen. Hierbei sollte festgestellt werden, ob ein vorheriges Waschen der Membranen im Vergleich zu ungewaschenen Membranen Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen hat und ob PDL-hTERT Zellen vermehrt in den Plattenwells oder an den Membranen haftend nachgewiesen werden können. Im Folgenden werden zunächst die verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Zellen in den Wellplatten sowie der genaue Versuchsablauf erläutert. Die Anordnung der Membranen und Positivkontrollen erfolgte jeweils entsprechend der Darstellung in Kapitel 3.2.8. (Tabelle 7).

### **3.4.2.1. Kultivierung der PDL-hTERT Zellen an ungewaschenen und gewaschenen Membranen**

Für die Kultivierung der PDL-hTERT Zellen an ungewaschenen und gewaschenen Membranen wurden zunächst von jedem Membrantyp je 12 Membranproben (n=12) nach oben beschriebenem Vorgehen vorbereitet und auf drei 24-Wellplatten verteilt. Die Membranen in zwei der Platten wurden nachfolgend für drei Tage mit 700 µl Medium bedeckt. Sie repräsentieren die gewaschenen Membranen. Zu den Membranen der dritten Wellplatte wurde kein Medium zugegeben. Sie repräsentieren die ungewaschenen Membranen.

Nach drei Tagen wurden die PDL-hTERT Zellen nach oben beschriebenem Vorgehen gelöst, ausgezählt und jeweils 700 µl Zellsuspension, welche je 12.000 Zellen enthielten, in die Wells mit den gewaschenen und ungewaschenen Membranen sowie in die Wells der Positivkontrollen zugegeben. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert. Nach einem und nach drei Tagen wurden in den Wells 300 µl Medium abpipettiert und 300 µl frisches Medium hinzugefügt.

### **3.4.2.2. Bestimmung des Zellwachstums an den Membranen**

Nach sieben Tagen erfolgte die Bestimmung des Zellwachstums an den Membranen. Hierfür wurden drei 24-Wellplatten vorbereitet und jeweils 300 µl Medium und 30 µl WST 1 in 20 Wells jeder Platte zugegeben. In die entsprechenden Wells von zwei dieser Platten wurden die gewaschenen Membranen überführt, in eine Platte die ungewaschenen Membranen. Anschließend erfolgte die Inkubation der drei Platten für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank und nachfolgend die Bestimmung der Absorption im microplate reader (Tecan Infinite M200, Tecan Group LTd., Schweiz).

### **3.4.2.3. Bestimmung des Zellwachstums im Well**

Für die Bestimmung des Zellwachstums im Well wurde das Eluat aus den Platten abgesaugt und 300 µl frisches Medium sowie 30 µl WST1 zugegeben.

Die Platten wurden nachfolgend ebenfalls für 60 Minuten inkubiert und danach die Absorption ermittelt.

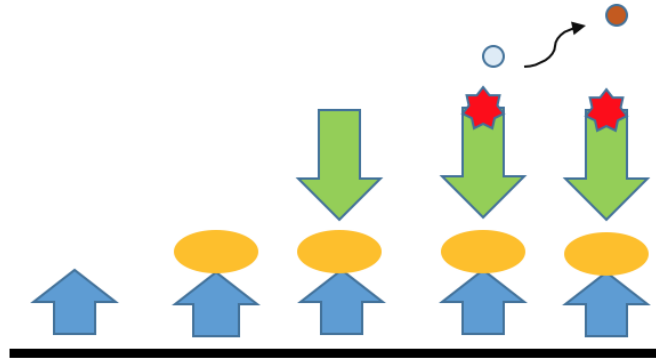
### **3.5. Quantitativer Nachweis von Hyaluronsäure in den Barrieremembran**

#### **3.5.1. ELISA zum quantitativen Nachweis von Hyaluronsäure**

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein System, das der quantitativen Konzentrationsbestimmung von Hormonen, Proteinen, Viren und Antikörpern in Zellkulturen und Körperflüssigkeiten dient. Es handelt es sich um ein Antigen-Antikörper-Nachweisverfahren, welches zu den enzymatischen Immunabsorptionsverfahren zählt. Es basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Diese kann photometrisch mit einer chromogenen Substanz (= Farbstoffsubstrat) ausgewertet werden.

Das Prinzip des ELISA macht sich die Eigenschaft von spezifischen Antikörpern zu Nutze, an die nachzuweisenden Stoffe (Antigene) zu binden. Ein Antikörper, der gegen eine zu untersuchende Hyaluronsäure gerichtet ist, wird auf dem Boden einer 96-Well Mikrotiter-Platte gebunden. Wenn die Probe die gesuchte Hyaluronsäure enthält, bildet sich ein Komplex aus Antikörper und Antigen. Die Platten werden gewaschen, um nicht gebundene Bestandteile zu entfernen. Dann wird ein zweiter, gegen die Hyaluronsäure gerichteter Antikörper (= Detektionsantikörper) zugefügt. Dieser Antikörper wird vorher mit einem Enzym (= Rezeptorenzym) gekoppelt. Die Reaktion, die durch das Enzym katalysiert wird, dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Enzym aktiviert durch Spaltung einen Farbstoff. Durch die Messung der Absorption kann anschließend die gesuchte Hyaluronsäure quantifiziert werden (Abb. 4). Die Enzymaktivität ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls, was bedeutet, dass die Farbintensität mit der Konzentration des zu bestimmenden Antigens steigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe einer durch eine Verdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellten Standardkurve. Als Rezeptorenzyme werden häufig die Meerrettichperoxidase (HRP), die alkalische

Phosphatase (AP) oder die Glucoseoxidase (GOX) verwendet. Bei der Peroxidase wird in der Regel o-Phenylendiamin (oPD) als Farbstoffsubstrat (= Chromogen) verwendet, bei der alkalischen Phosphatase p-Nitrophenylphosphat (pNPP).



**Abb. 4:** Funktionsprinzip des ELISAs zum Nachweis von Hyaluronsäure. Ein Antikörper, der gegen die gesuchte Hyaluronsäure gerichtet ist, wird am Boden der Mikrotiter-Platte gebunden. Die Hyaluronsäure (=Antigen) wird vom Antikörper gebunden. Es bildet sich ein Komplex aus Antikörper und Antigen. Ein zweiter gegen die Hyaluronsäure gerichteter Antikörper (=Detektionsantikörper), welcher mit einem Enzym (=Rezeptorenzym) gekoppelt ist, wird zugegeben. Das Enzym aktiviert durch Spaltung einen Farbstoff. Durch Messung der Absorption kann die gesuchte Hyaluronsäure quantifiziert werden (Hessling 2016).

### 3.5.2. Kompetitiver ELISA

Zur Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration im Eluat wurde ein kompetitiver ELISA (Hyaluronen Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit, Echelon Salt Lake City, Utah, USA) angewendet. Bei einem kompetitiven ELISA wird statt eines zweiten Antikörpers ein markiertes Kompetitor-Antigen zur Detektion genutzt. Dieses ähnelt strukturell dem Analyten und bindet ebenfalls am Antikörper. Die Folge ist eine Konkurrenz zwischen Analyt und Kompetitor um die Bindestelle am Antikörper. Das Signal verhält sich beim kompetitiven ELISA umgekehrt proportional zur Analyt-Konzentration: bei einer hohen Analyt-Konzentration kommt es zu einer schwachen Farbreaktion, da die meisten Bindungsstellen des Antikörpers vom Analyten besetzt sind und der markierte Kompetitor nur einen geringen Anteil an der Reaktion besitzt. Ist

die Konzentration des Analyten dagegen niedrig, erfolgt eine starke Farbreaktion, da der markierte Kompetitor die meisten Antikörperbindstellen blockiert. Die Intensität der photometrisch bestimmten Farbreaktion ist umgekehrt proportional zur Konzentration des zu untersuchenden Agens.

### 3.5.3. Versuchsaufbau

Ziel des Versuchs war es, festzustellen, ob im Überstand der Membranen Hyaluronsäure (HA) nachweisbar ist. Dabei sollte zwischen niedermolekularer- und hochmolekularer HA unterschieden werden. Hierfür wurden jeweils zwei Proben (n=2) von vier verschiedenen Membranen (BioGide, BioMend, DynaMatrix und OssixPlus) zweimal für hochmolekulare Hyaluronsäure > 30 kD und zweimal für niedermolekulare Hyaluronsäure < 30 kD verwendet. Aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung und Ursprungs von BioMend und OsseoGuard Membranen, wurden OsseoGuard Membranen in diesem Versuch nicht separat untersucht.

Proben der Barrieremembranen wurden nach dem in Kapitel 3.2.8. (Tabelle 7) beschriebenen Vorgehen in Mikrotiterplatten eingebracht. Alle Membranen wurden zum Waschen mit 800 µl Medium (high glucose, serum freies, ohne phenolrot Medium) bedeckt. Nach drei Tagen wurde das Eluat aus den einzelnen Wells mit Pipetten aufgenommen und in 16 Eppendorfgefäße übertragen. Die Gefäße wurden entsprechend der jeweiligen Membranen beschriftet, gefiltert und nach der Masse in kleine Moleküle (<) 30 kD und große Moleküle (>) 30 kD eingeteilt.

Es wurde eine Standardkonzentrationskurve in dreifacher Ausführung erstellt und das Eluat jeder Membran zweimal (einmal für < 30 kD und einmal für > 30 kD) gemessen. Im verwendeten ELISA mussten die zu bestimmenden Proben zunächst mit einem Hyaluronsäure-Detektor inkubiert werden. Die Detektion des an die Platte gebundenen Hyaluronsäure-Detektors (Antigen) erfolgt durch einen enzymverknüpften Antikörper und die photometrische Messung. Für die Enzym- Substrat-Reaktion wird die alkalische Phosphatase und p-Nitrophenylphosphat genutzt. Die Messung erfolgte bei 405 nm.

Die Herstellung der benötigten Substrate und die Versuchsdurchführung erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Zur Vorbereitung der Inkubationsplatte wurden die leeren Kontrollen, die Nullkontrollen, die Standardreihen (1600 ng/ml, 800 ng/ml, 400

ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml und 50 ng/ml), sowie die Eluatproben pipettiert (Tab. 13). Je 100 µl HA Standard und Proben in die entsprechenden Eppendorfgefäße, 150 µl Verdünnungsmittel in die leeren Kontrollgefäße und 100 µl Verdünnungsmittel in die Nullkontrollgefäße. In jedes Eppendorfgefäß, mit Ausnahme der leeren Kontrollgefäße, wurden 50 µl des Detektors hinzugefügt. Somit enthielt jedes Reaktionsgefäß insgesamt 150 µl. Zum Durchmischen wurde die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt, auf einem Schüttler bewegt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Nach dem Inkubationsschritt wurde die 96-Well-Inkubationsplatte vorbereitet und jeweils 100 µl der verschiedenen Proben und Kontrollen mit einer Pipette aus den Wells der Inkubationsplatte in die entsprechenden Wells der Detektionsplatte überführt. Der Inhalt wurde auf dem Schüttler gemischt, die Platte erneut mit einer Klebefolie abgedeckt und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Detektionsplatte verworfen und die Platte dreimal mit jeweils 200 µl der Waschlösung gewaschen. Im Anschluss an das Waschen wurden 100 µl Marker-Enzym in jedes Well der Platte pipettiert, gemischt, eine Klebefolie angebracht und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation folgte die Wiederholung des Waschschrilles. Nach dem Waschen wurden 100 µl Substratlösung in jedes Well der Detektionsplatte gegeben, um die enzymatische Reaktion zu starten und die Platte bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die photometrischen Messungen der Absorption erfolgten 15, 30 und 45 Minuten nach Inkubationsbeginn bei 405 nm den Herstellerangaben entsprechend. Die HA- Konzentrationen wurden über die zuvor erstellte Standardkurve berechnet.

### **3.6. Zytokin-/ Wachstumsfaktorenbestimmung**

In einem weiteren experimentellen Schritt sollte der Nachweis löslicher Proteinanteile, insbesondere Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, in den Barrieremembranen erfolgen. Für diese Analyse wurde der „*Human Growth Factor Array 1*“ (RayBiotech, USA) verwendet, ein ELISA, der die simultane Untersuchung von 40 verschiedenen Zytokinen pro Probe ermöglicht (Spinell et al. 2019).

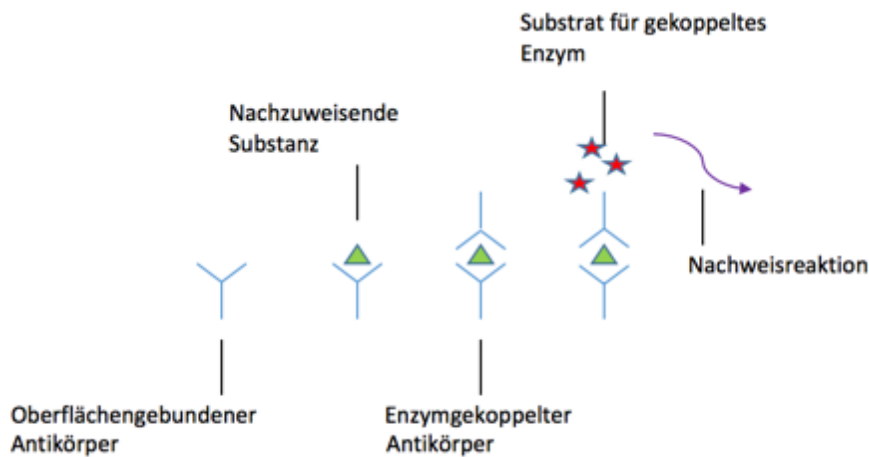
<b>Nachweisbare Proteinanteile im „Human Growth Factor Array 1“</b>	
1	AR
2	BDNF
3	bFGF
4	BMP-4
5	BMP-5
6	BMP-7
7	$\beta$ -NGF
8	EGF
9	EGF R
10	EG-VEGF
11	FGF-4
12	FGF-5
13	GDF-15
14	GDNF
15	GH
16	HB-EGF
17	HGF
18	IGFBP-1
19	IGFBP-2
20	IGFBP-3
21	IGFBP-4

22	IGFBP-6
23	IGF-1
24	Insulin
25	MCF R
26	NGF R
27	NT-3
28	NT-4
29	OPG
30	PDGF-AA
31	PIGF
32	SCF
33	SCF R
34	TGF $\alpha$
35	TGF $\beta$ 1
36	TGF $\beta$ 3
37	VEGF
38	VEGF R2
39	VEGF R3
40	VEGF-D

**Tab. 8:** Übersicht über 40 Proteinanteile, die mit dem „Human Growth Factor Array 1“ (RayBiotech, USA) nachgewiesen werden können



In den quadratischen Feldern (Spots) eines Objektträgers sind spezifische Antikörper befestigt, die der Zytokindetektion dienen. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe wird das Proben-Standard-Gemisch inkubiert, wodurch die in der Probe enthaltenen Zytokine an die entsprechenden Antikörper gebunden und auf der Glasplatte fixiert werden. Es bildet sich ein Antikörper-Zytokin-Komplex. Dieser wird durch Zugabe eines zweiten, Biotin-gekoppelten Antikörpers, markiert. Dadurch entsteht ein „Sandwich-Komplex“ aus primärem und sekundärem Antikörper. Durch anschließende Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem (Cy3) Streptavidin ist anschließend die Detektion der Wachstumsfaktoren möglich (Abb. 5).



**Abb. 5:** Funktionsprinzip RayBiotech ELISA. Aus nachzuweisender Substanz und oberflächengebundenem Antikörper bildet sich ein Antikörper-Zytokin-Komplex, dieser bindet an einen Biotin-gekoppelten Antikörper. Durch Inkubation mit Streptavidin als Substrat für das gekoppelte Enzym ist die Nachweisreaktion möglich (übernommen aus RayBiotech, 2007-2019).

Das Kit enthält zwei Platten mit jeweils 16 Feldern. Acht davon werden für die Standards benötigt, in die anderen acht werden die Proben gegeben. Das Wascheluat von je zwei Proben ( $n=2$ ) der vier untersuchten Membranen (BioGuide, BioMend, DynaMatrix, OssixPlus) wurde nach drei Tagen aus den Wells abpipettiert, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und am Versuchstag zur Analyse aufgetaut. Aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung und des ähnlichen Ursprungs von BioMend und OsseoGuard

Membranen, wurden OsseoGuard Membranen in diesem Versuch nicht separat untersucht. Die Herstellung der Waschpuffer und Verdünnung der Antikörper erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zur Blockierung wurden 100 µl Probenverdünnung in jedes Well gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl der Proben erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. In einem ersten Waschschrift wurde fünf Mal für jeweils fünf Minuten mit 150 µl Wasch-Puffer 1, anschließend zwei Mal für fünf Minuten mit 150 µl Wasch-Puffer 2, jeweils bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken auf dem Rüttler gewaschen. Dann wurden 1,4 ml Probenverdünnung zum Biotin gekoppelten Detektions- Antikörper zugegeben und 80 µl der Detektions-Antikörperlösung in jedes Well pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut ein fünfmaliges Waschen für je fünf Minuten mit 150 µl Wasch-Puffer 1 und danach zweimaliges Waschen mit 150 µl Wasch-Puffer 2 unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur. Nach kurzem Zentrifugieren wurden 1,4 ml der Probenverdünnung zu Cy3-fluoreszenzmarkiertem Streptavidin gegeben und gemischt. Davon wurden je 80 µl in jedes Well gegeben. Um die Platte vor Belichtung zu schützen, wurde sie mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Es folgte erneut ein fünfmaliges Waschen mit 150 µl Waschpuffer 1 für fünf Minuten. Dann wurde die Glasplatte aus der Halterung genommen und für 15 Minuten in Waschpuffer 1, danach für 5 Minuten in Waschpuffer 2 bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gewaschen. Mit Hilfe einer Pipette sind Wassertropfen von der Oberfläche entfernt worden, ohne den Arrayträger zu berühren. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem Surescan Microarray Scanner G2505C (Agilent, USA).

Für jeweils zwei Proben der vier Membranen wurden die Konzentrationen von 40 unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (AR, BDNF, bFGF, BMP-4, BMP-5, BMP-7,  $\beta$ -NGF, EGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, FGF-5, GDF-15, GDNF, GH, HB-EGF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGF-1, Insulin, MCF R, NGF R, NT-3, NT-4, OPG, PDGF-AA, PIGF, SCF, SCF R, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3, VEGF, VEGF R2, VEGF R3, VEGF-D) bestimmt.

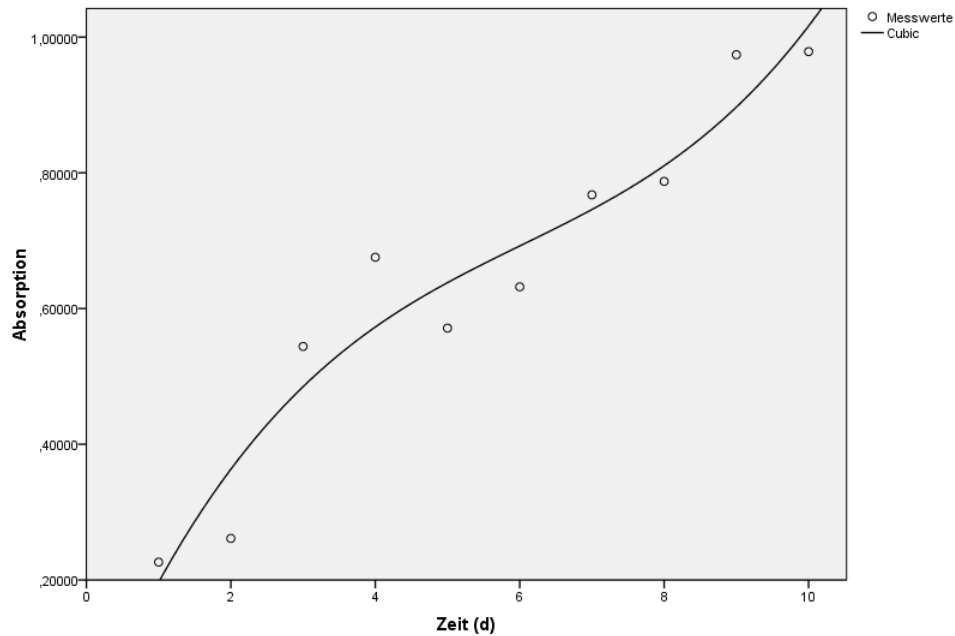
### 3.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS (IBM, USA). Die Mittelwerte der Versuchsgruppen wurden bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$  mittels One-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur statistisch verglichen (Spinell et al. 2019). Der One-Way ANOVA wurde verwendet, da die Prüfung der Normalverteilung und Varianzhomogenität aufgrund der geringen Stichprobenzahl in den Hintergrund tritt. Zudem erfolgt mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur eine Absicherung gegenüber falsch-positiven Ergebnissen, da das Bonferroni-Verfahren grundsätzlich zur Nullhypothese tendiert. Es wurden auch der Shapiro-Wilk und der Levene Test durchgeführt. Von 36 Versuchsgruppen ( $n=4$ ) die mit dem Shapiro-Wilk Test untersucht wurden, lag bei 33 eine Normalverteilung vor ( $p>0,05$ ). Der Levene Test hat ergeben, dass keine Homogenität der Varianzen gegeben ist ( $p<0,01$ ).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ergebnis Wachstumskurve PDL-hTERT**

Um die Proliferation der PDL-hTERT Zellen zu bestimmen, wurde unter Verwendung des Zellproliferationsreagenzes WST1 und der ermittelten Absorptionswerte eine Wachstumskurve über einen Zeitraum von 12 Tagen erstellt. Das Wachstum der parodontalen Ligamentzellen ist in Abbildung 6 dargestellt, welche den Verlauf der Zellzahl über einen Zeitraum von 0 bis 400 Stunden dokumentiert.

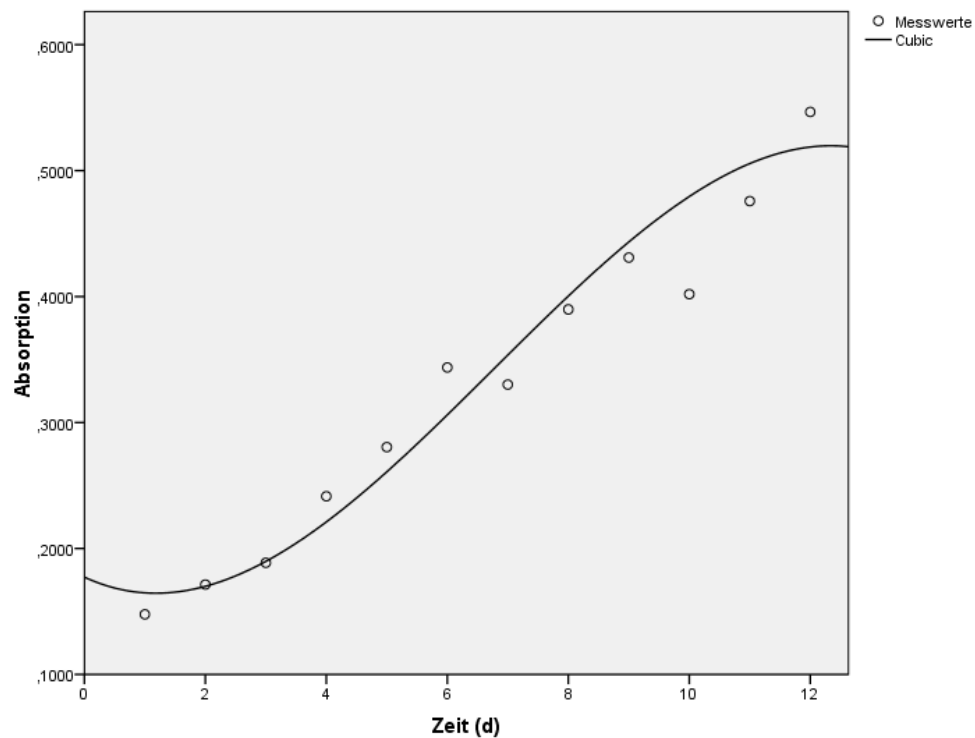


**Abb. 6:** Kubische Wachstumskurve PDL-hTERT Zellen über einen Zeitraum von 12 Tagen. Die y-Achse zeigt die Absorption (nm), die x-Achse die Zeit (Tage), das maximale Zellwachstum wird nach 6-7 Tagen erreicht.

Die graphische Auswertung der Wachstumskurve zeigt, dass PDL-hTERT Zellen relativ linear wachsen. Sie erreichen ihr maximales Wachstum nach ca. 6 bis 7 Tagen (144 bis 168 Stunden), danach flacht das Wachstum ab, ist aber noch nachweisbar. Der Versuch zur Untersuchung der Zytotoxizität von Membranen auf PDL-hTERT Zellen erfolgte daher im Hauptversuch 7 Tage nach Versuchsstart.

## 4.2. Ergebnis Wachstumskurve hMSCs

Auch für humane mesenchymale Stammzellen wurde unter Verwendung von WST1 das Zellwachstum bestimmt. Das Wachstum der hMSC Zellen ist in Abbildung 7 dargestellt, welche die Zunahme der Zellzahl über einen Zeitraum von 0 bis 14 Tagen dokumentiert.



**Abb. 7:** Kubische Wachstumskurve hMSC Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die y-Achse zeigt die Absorption (nm), die x-Achse die Zeit (Tage), das maximale Zellwachstum wird nach 5-7 Tagen erreicht.

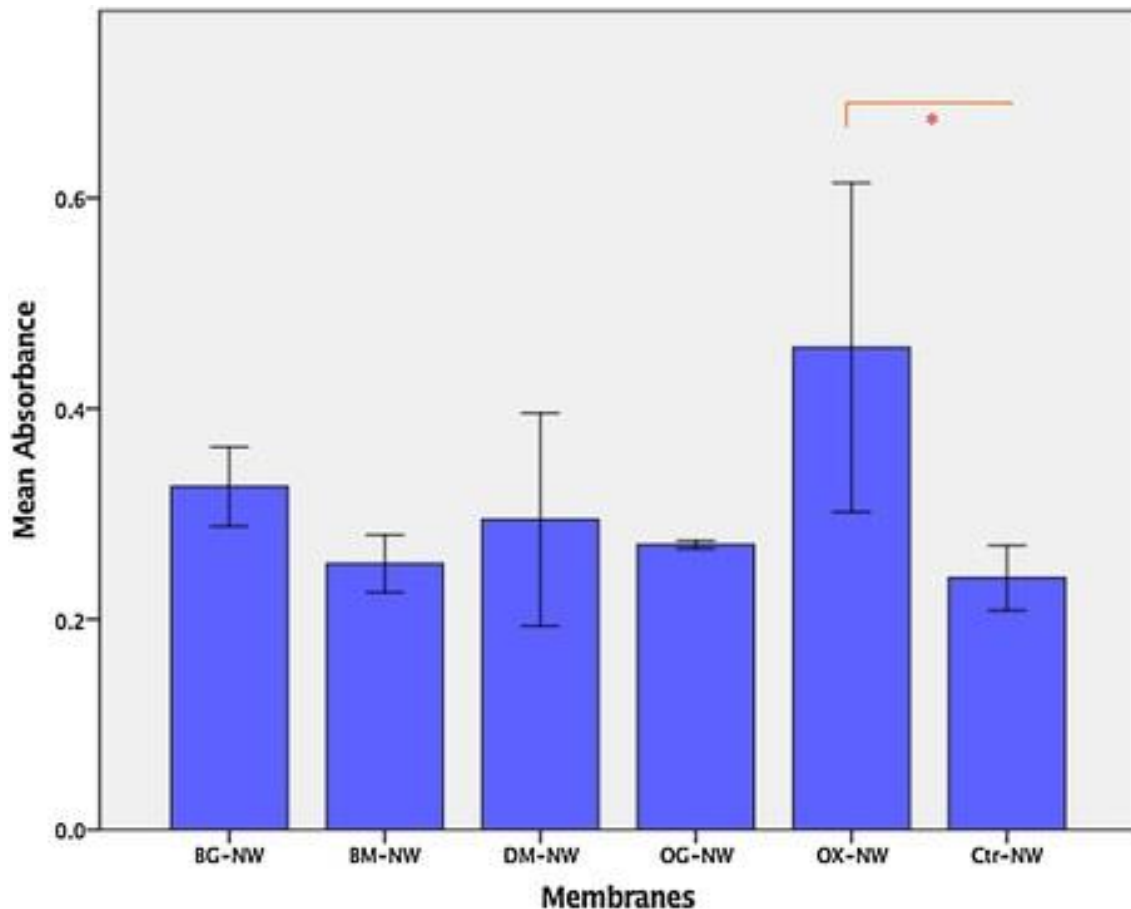
Die graphische Auswertung der Wachstumskurve zeigt, dass hMSC Zellen relativ linear wachsen. Sie erreichen ihr maximales Wachstum nach ca. 5 bis 7 Tagen, danach flacht das Wachstum ab, ist aber noch anzutreffen. Der Versuch zur Untersuchung der Zytotoxizität von Membranen auf humane mesenchymalen Stammzellen erfolgte daher im Hauptversuch 7 Tage nach Versuchsstart.

### 4.3. Zytotoxizität der Membranen auf hMSC Zellen

Untersucht wurde die Zytotoxizität von ungewaschenen und gewaschenen Membranen auf humane mesenchymale Zellen.

Die Auswertung der Ergebnisse des Zellwachstums nur im Well, sowie nur an den Membranen, ergibt, dass am Boden der Wells im Vergleich zur entsprechenden Membran mehr hMSC Zellen gewachsen sind. Das Wachstums der hMSC Zellen an den Membranen erreichte Werte zwischen 0,1 und 0,23 (24-46% der Gesamtabsorption).

Die Auswertung der Ergebnisse des Zellwachstums an ungewaschenen Membranen zeigt, dass die Zellproliferation an BioGide Membranen statistisch keinen Unterschied zum Wachstum an BioMend-, OsseoGuard- und DynaMatrix Membranen aufweist ( $p > 0,05$ ) ( $MW \pm SD$ : BG:  $1,36 \pm 0,16$ ; BM:  $1,06 \pm 0,11$ ; OG:  $1,13 \pm 0,02$ ; DM:  $1,23 \pm 0,42$ ). An BioGide Membranen werden 136% des Zellwachstums der Kontrolle erreicht, sie scheinen demnach eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum zu haben, ebenso wie BioMend (105%) -, OsseoGuard (113%)- und DynaMatrix (123%) Membranen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Die Zellproliferation bei OssixPlus Membranen ist statistisch unterschiedlich zu der bei allen anderen ungewaschenen Membranen ( $p > 0,05$ ), sie ist auch signifikant größer im Vergleich zur Kontrolle (OX:  $1,92 \pm 0,65$ ,  $p < 0,05$ ).



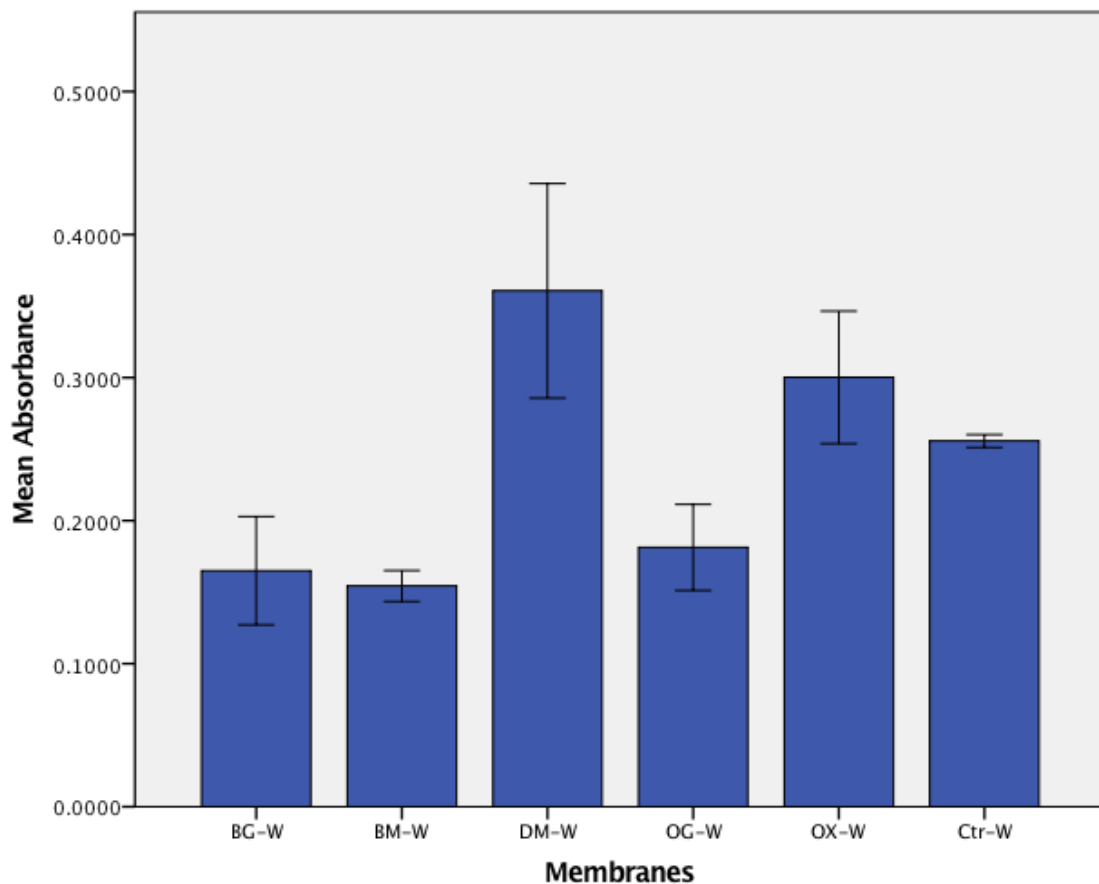
**Abb. 8:** Darstellung der WST-1 Absorption der hMSC Zellen bei ungewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm 1$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-NW, BM-NW, DM-NW, OG-NW, OX-NW) sowie die Kontrolle (Ctr-NW). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). Alle ungewaschenen Membranen haben im Vergleich zur Kontrolle eine stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation von hMSC Zellen (Spinell et al. 2019).

Die Auswertung der Ergebnisse der Zellproliferation der gewaschenen Membranen zeigt, dass das Wachstum der Zellen bei BioMend-, OsseoGuard- und BioGide Membranen keine statistischen Unterschiede aufweist (OG:  $0,70 \pm 0,14$ ; BG:  $0,76 \pm 0,17$ ). Das Zellwachstum bei OssixPlus Membranen zeigt statistisch keinen Unterschied zum Wachstum bei DynaMatrix Membranen ( $p > 0,05$ ), es ist größer als bei BioMend-, OsseoGuard- und BioGide Membranen (OX:  $1,26 \pm 0,16$ ; DM:  $1,32 \pm 0,23$ ).

Der Vergleich des Zellwachstums an den beiden Platten welche gewaschene



Membranen enthielten mit dem Wachstum bei der Kontrolle, zeigt, dass an allen Membranen kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht. Bei OssixPlus- und DynaMatrix Membranen ist jedoch ein Trend zur wachstumsstimulierenden Wirkung zu erkennen, wohingegen BioMend-, OsseoGuard- und BioGide Membranen eine Tendenz zu geringerem Zellwachstum aufweisen.



**Abb. 9:** Darstellung der WST-1 Absorption der hMSC Zellen bei gewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm 1$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-W, BM-W, DM-W, OG-W, OX-W) sowie die Kontrolle (Ctr-W). Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p=1$ ). Gewaschene DynaMatrix- und OssixPlus Membranen (DM-W, OX-W) zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine wachstumsstimulierende Wirkung auf hMSC Zellen, an BioGide- und OsseoGuard Membranen wurde ein geringeres Zellwachstum als an der Kontrolle festgestellt (Spinell et al. 2019).

Durch den Vergleich der Zellproliferation von hMSC Zellen an ungewaschenen und gewaschenen Membranen wird deutlich, dass bei BioGide-, BioMend-, OsseoGuard- und OssixPlus Membranen das Zellwachstum bei ungewaschenen und gewaschenen Membranen statistisch unterschiedlich ist ( $p < 0,05$ ). Das Wachstum der Zellen wird durch die Vorbehandlung (Waschen) der Membranen nicht verändert (ungewaschene BG:  $1,36 \pm 0,16$ ; gewaschene BG:  $0,76 \pm 0,17$ ), (ungewaschene BM:  $1,06 \pm 0,1$ ; gewaschene BM:  $0,61 \pm 0,08$ ). Bei Membranen vom Typ DynaMatrix ist die Zellproliferation bei gewaschenen und ungewaschenen Membranen ebenfalls statistisch nicht unterschiedlich (ungewaschene DM:  $1,23 \pm 0,42$ ; gewaschene DM:  $1,32 \pm 0,23$ ) (Abb. 13).

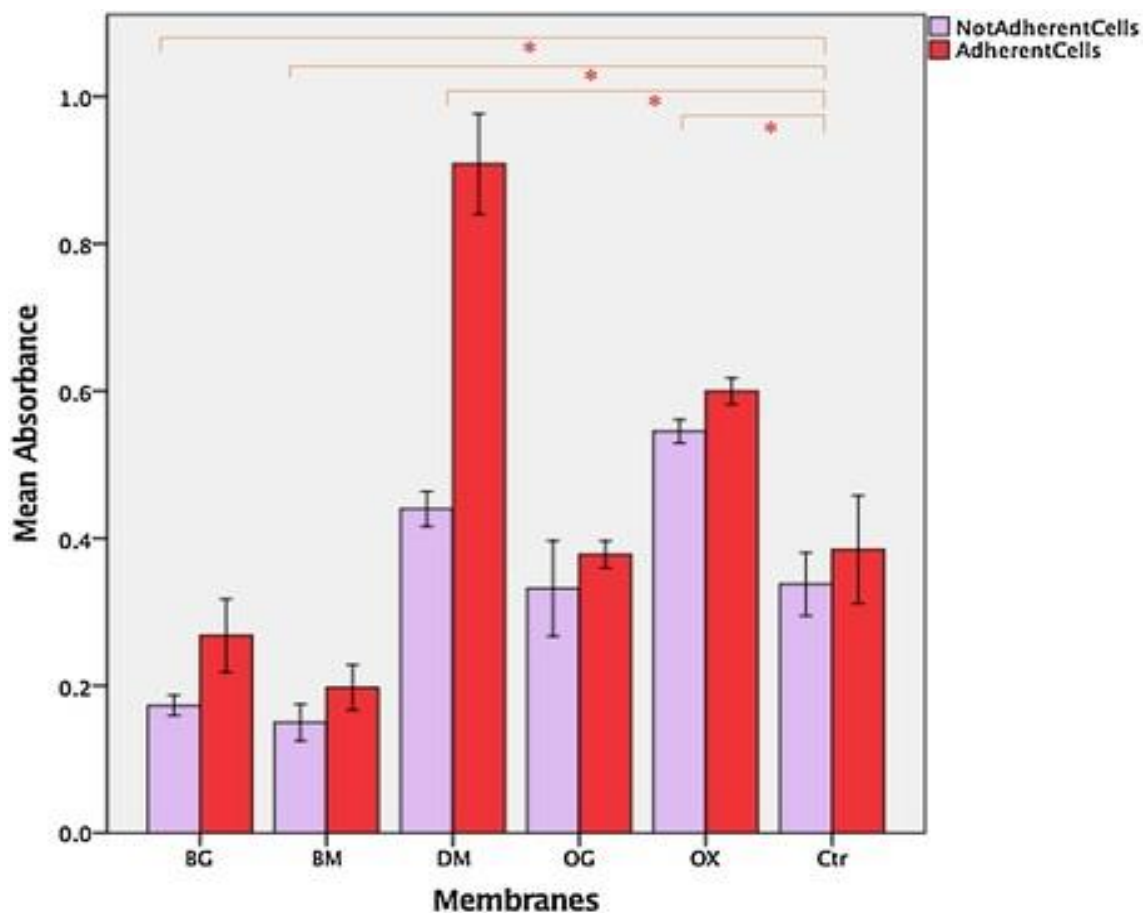
### **4.4 Vergleich des Zellwachstums von adhärennten und nicht adhärennten hMSC-Zellen im Wascheluat**

Untersucht wurde das Zellwachstum im Eluat von adhärennten und nicht adhärennten hMSCs. Die Auswertung der Ergebnisse des Zellwachstums im Eluat der nicht adhärennten hMSCs zeigt, dass an BioMend Membranen 44% des Zellwachstums erreicht werden, sie haben demnach, verglichen mit der Kontrolle, eine wachstumshemmende Wirkung auf das Zellwachstum, ebenso wie BioGide (51%) und OsseoGuard (98%) Membranen. DynaMatrix (130%) und OssixPlus (161%) Membranen haben dagegen eine stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation. Der Unterschied ist bei BioGide-, BioMend-, DynaMatrix und OssixPlus Membranen statistisch unterschiedlich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ), bei OsseoGuard Membranen statistisch ähnlich ( $p > 0,05$ ).

Die Auswertung der Ergebnisse des Zellwachstums im Eluat der adhärennten hMSC-Zellen zeigt, dass an BioMend Membranen 51% des Zellwachstums erreicht werden. Sie haben also, verglichen mit der Kontrolle, eine zytotoxische Wirkung auf das Zellwachstum, gleiches gilt für BioGide (69%) - und OsseoGuard (98%) Membranen. OssixPlus (156%) und DynaMatrix (263%) Membranen hingegen haben eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum, verglichen mit der Kontrolle. Der

Unterschied ist bei BioGide, BioMend, DynaMatrix und OssixPlus Membranen statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), bei OsseoGuard Membranen nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

Das Eluat der gewaschenen Membranen beeinflusst demnach sowohl bei adhärennten als auch bei nicht adhärennten hMSC Zellen das Zellwachstum. Nur bei DynaMatrix Membranen hat der Zeitpunkt der Eluatzugabe zu den Zellen eine Auswirkung auf die Zellproliferation (Spinell et al. 2019).



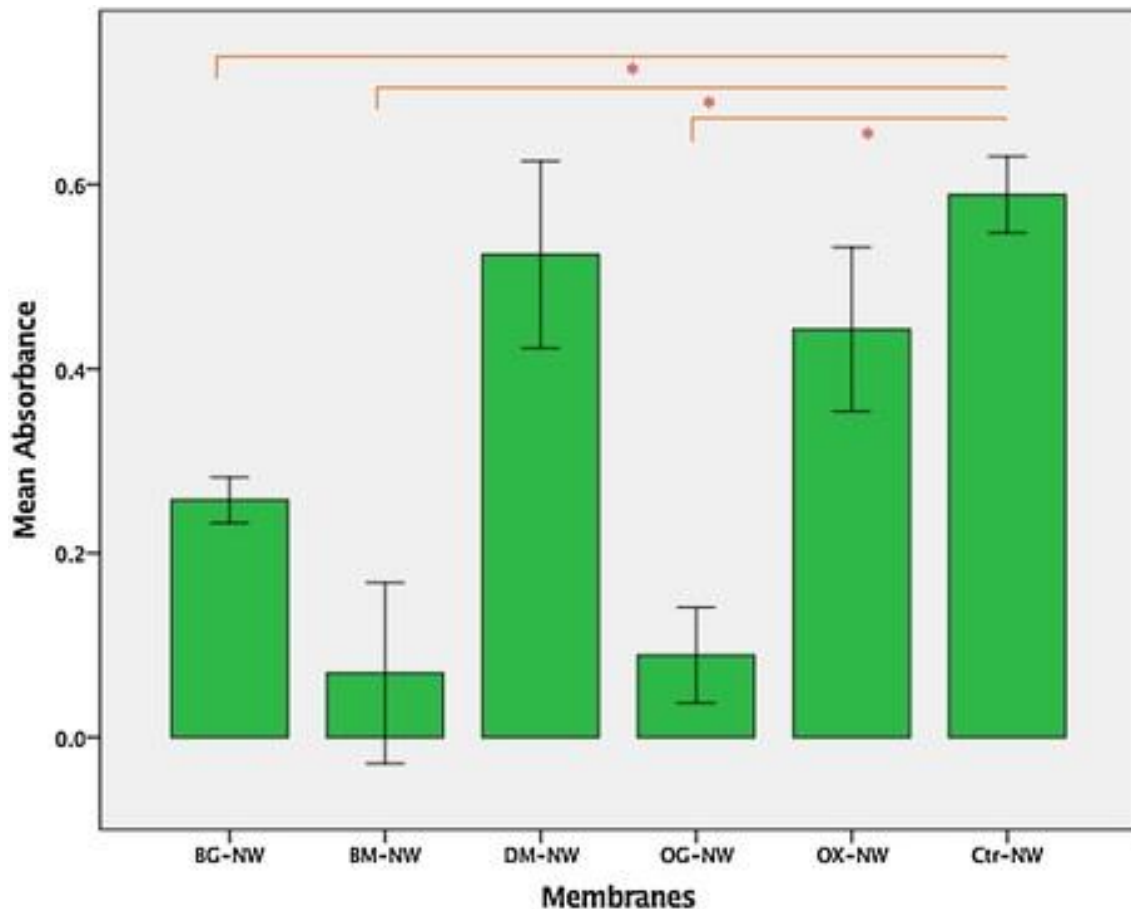
**Abb. 10:** Darstellung der WST-1 Absorption im Eluat von adhärennten und nicht adhärennten hMSC Zellen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm 1$ ), die x-Achse zeigt das Eluat von adhärennten und nicht adhärennten Zellen der untersuchten Membranen (BG, BM, DM, OG, OX) sowie die Kontrolle (Ctr). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p = 0,05$ ) (Spinell et al. 2019).

Das Zellwachstum im Eluat der nicht adhärennten Zellen war an BioMend-, BioGide- und OsseoGuard Membranen (BM, BG, OG) geringer als an der Kontrolle. An DynaMatrix- und OssixPlus Membranen (DM, OX) war das Zellwachstum im Eluat der nicht adhärennten Zellen größer als an der Kontrolle. Das Zellwachstum im Eluat der adhärennten Zellen war an BioMend-, BioGide- und OsseoGuard Membranen (BM, BG, OG) geringer als an der Kontrolle. An OssixPlus- und DynaMatrix Membranen (OX, DM) war das Zellwachstum im Eluat der adhärennten Zellen größer als an der Kontrolle.

### **4.5. Zytotoxizität der Membranen auf PDL-h TERT Zellen**

Das Wachstum der PDL-hTERT Zellen an den Membranen erreichte Werte zwischen 0,08 und 0,29 (21- 62% der Gesamtabsorption).

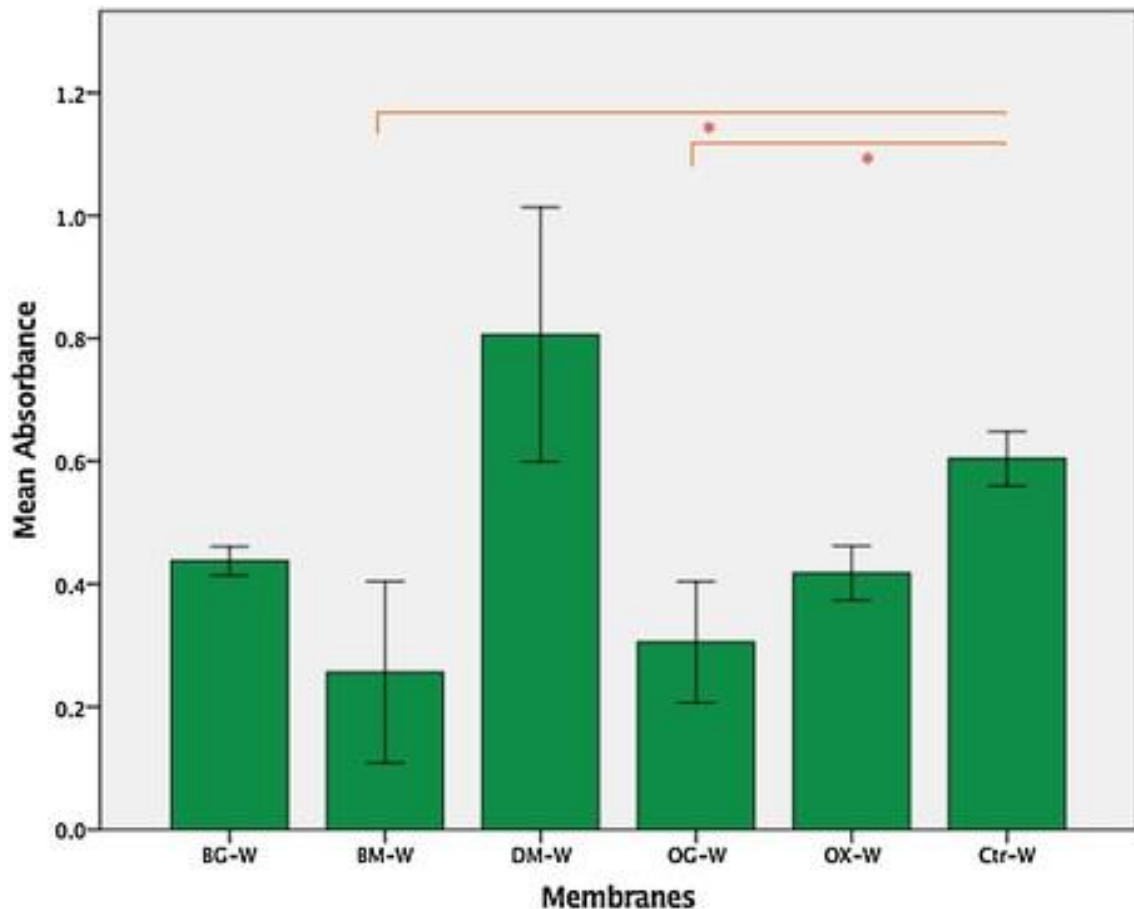
Die Ergebnisse des Zellwachstums bei ungewaschenen Membranen belegen, dass das Wachstum der PDL-hTERT Zellen bei BioGide Membranen höher als bei BioMend- und OsseoGuard Membranen, sowie geringer als bei OssixPlus- und DynaMatrix Membranen ist. Bei BioMend Membranen war die Zellproliferation nicht unterschiedlich zur Proliferation bei OsseoGuard Membranen. An BioGide Membranen werden 43,7% des Zellwachstums der Kontrolle erreicht. Sie haben demnach, verglichen mit der Kontrolle, eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation, ebenso wie OsseoGuard (15,1%) und BioMend (11,8%) Membranen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Das Zellwachstum bei ungewaschenen DynaMatrix (89%) und OssixPlus Membranen (75%) ist zwar geringer als jenes der Kontrolle, jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 11:** Darstellung der WST-1 Absorption der PDL-hTERT Zellen bei ungewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm 1$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-UW, BM-UW, DM-UW, OG-UW, OX-UW) sowie die Kontrolle (Ctr-UW). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). An allen ungewaschenen Membranen wurde ein geringeres Zellwachstum der PDL-hTERT Zellen festgestellt als an der Kontrolle (Spinell et al. 2019).

Die Analyse des Gesamtwachstums bei gewaschenen Membranen zeigt, dass das Zellwachstum von PDL-hTERT Zellen bei BioGide Membranen statistisch nicht unterschiedlich zum Wachstum bei OssixPlus Membranen und der Kontrolle der gewaschenen Membranen ist (BG:  $p=0,054$ , OX:  $p=0,365$ ; WST1 Absorption 0,59). Bei BioMend Membranen ist die Zellproliferation statistisch vergleichbar mit der Proliferation bei OsseoGuard Membranen (OG:  $0,38 \pm 0,21$ ). Bei gewaschenen DynaMatrix Membranen ist das Zellwachstum

statistisch unterschiedlich zum Wachstum bei allen anderen Membranen und der Kontrollgruppe. Das Gesamtzellwachstum ist bei DynaMatrix signifikant höher (DM:  $1,41 \pm 0,26$ ) (WST1 Absorption 0,83;  $p < 0,001$ ). Der Vergleich des Zellwachstums an den beiden Platten, welche gewaschene Membranen enthielten, mit dem Wachstum bei der Kontrolle zeigt, dass an beiden Platten das Zellwachstum an BioMend und OsseoGuard Membranen signifikant schlechter war als an der Kontrolle. Sie hemmen das Zellwachstum ( $p < 0,001$ ). Die Zellproliferation an OssixPlus ( $p = 0,054$ ) und BioGide ( $p = 0,365$ ) Membranen war an beiden untersuchten Platten vergleichbar mit der Kontrolle (WST1 Absorption 0,59), wobei eine Tendenz zur Zellzytotoxizität erkennbar ist. DynaMatrix Membranen haben als einzige das Zellwachstum der PDL-hTERT-signifikant stimuliert (WST1 Absorption 0,83;  $p < 0,001$ ).



**Abb. 12:** Darstellung der WST-1 Absorption der PDL-hTERT Zellen bei gewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm 1$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-W, BM-W, DM-W, OG-W, OX-W) sowie die Kontrolle (Ctrl-W). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). An gewaschenen BioMend- und OsseoGuard Membranen (BM-W, OG-W) wurde ein geringeres Zellwachstum als an der Kontrolle festgestellt. Das Wachstum der PDL-hTERTs an BioGide- und OssixPlus Membranen (BG-W, OX-W) ist vergleichbar mit dem Wachstum an der Kontrolle, wobei ein Trend zur Zytotoxizität zu erkennen ist. An DynaMatrix Membranen (DM-W) ist das Zellwachstum größer als an der Kontrolle (Spinell et al. 2019).

Der Vergleich des Zellwachstums von PDL-hTERT Zellen bei gewaschenen und ungewaschenen Membranen verdeutlicht, dass bei Membranen vom Typ BioGide, BioMend, OsseoGuard und DynaMatrix ein vorangehendes Waschen einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat, die gewaschenen

zeigen ein stärkeres Wachstum als die ungewaschenen (ungewaschene DM: 89,0%/ gewaschene DM: 141,2%, ungewaschene BM: 11,8%/ gewaschene BM: 39,1%, ungewaschene BG: 43,7%/ gewaschene BG: 72,2%). Für OssixPlus Membranen zeigte das Zellwachstum bei gewaschenen und ungewaschenen Membranen keinen signifikanten Unterschied (ungewaschene OX: 75%/ gewaschene OX: 77%).

## 4.6. Nachweis freier Hyaluronsäure in den Membranen

Die Ergebnisse der Hyaluronsäurebestimmung zeigen, dass fast alle untersuchten Membranen Hyaluronsäuren freisetzen, einzige Ausnahme stellen die OssixPlus Membranen dar (Tab. 9). Die Messwerte wurden aus den Rohdaten über die inverse Standardkurve berechnet (Abb. 14). Aufgrund der geringen Fallzahl wurde keine statistische Analyse vorgenommen.

Zwischen den Membranen vom Typ BioGide, BioMend, DynaMatrix und OssixPlus bestehen deutliche Unterschiede in der Menge und der Molekülgröße des im Eluat nachgewiesenen Hyalurons.

Membranen vom Typ BioGide, BioMend und OssixPlus setzen kein niedermolekulares Hyaluron frei. OssixPlus Membranen enthalten zudem auch kein hochmolekulares Hyaluron. BioMend Membranen setzen nur geringe Mengen an hochmolekularem Hyaluron frei (BM: 0,2 mg/ml), bei BioGide Membranen hingegen ist die Konzentration von hochmolekularem Hyaluron relativ hoch (BG: 1,8 mg/ml). Die untersuchten DynaMatrix Membranen setzten sowohl hohe Konzentrationen von niedermolekularem-, als auch bedeutende Mengen (DM: >30mg/ml) von hochmolekularem Hyaluron frei. DynaMatrix ist somit die einzige Membran, in deren Eluat sich niedermolekulares Hyaluron in größeren Mengen nachweisen lässt.



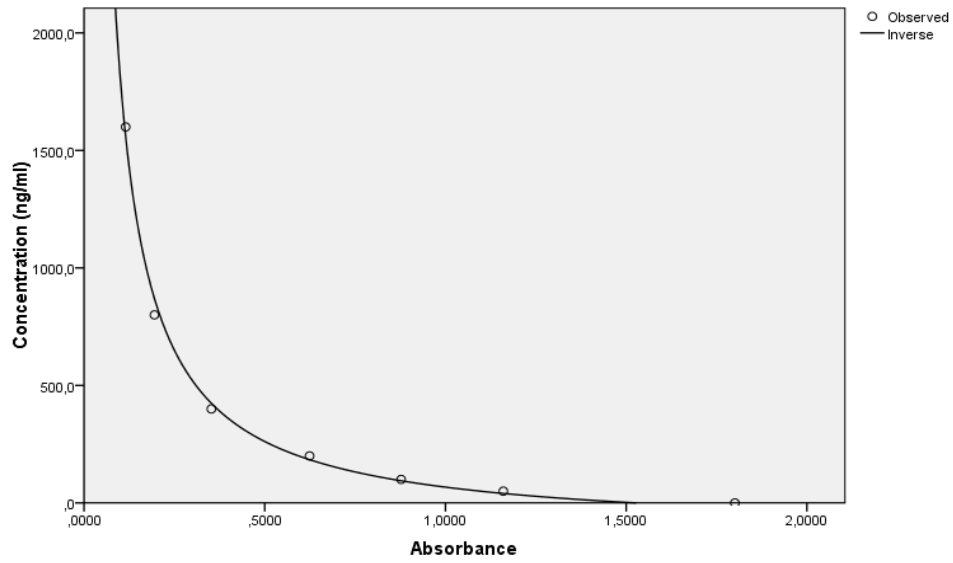
	<b>MW Absorption</b>	<b>SD Absorption</b>	<b>Konzentration (ng/ml)</b>	<b>Molekulargewicht (kDa)</b>
<b>BG</b>	1,4806	0,1219	4,045376739	<30
<b>BG</b>	0,0988	0,0638	1838,110429	>30
<b>BM</b>	1,6766	0,1317	0	<30
<b>BM</b>	0,599	0,0474	197,0515726	>30
<b>DM</b>	0,4653	0,0347	290,191473	<30
<b>DM</b>	0,0063	0,0048	30692,27308	>30
<b>OX</b>	1,6556	0,055	0	<30
<b>OX</b>	1,6863	0,0582	0	>30

**Tab. 9:** Hyaluronsäurekonzentrationen der verschiedenen Membranen nach Molekulargewicht.

Für BioGide (BG)-, BioMend (BM)-, DynaMatrix (DM)- und OssixPlus (OX)- Membranen ist jeweils der Mittelwert der Absorption (MW), die Standardabweichung der Absorption (SD), die Hyaluronsäurekonzentration (ng/ml) und das Molekulargewicht der Hyaluronsäure (kDa) dargestellt. BG, BM und OX setzen kein niedermolekulares Hyaluron frei, OX auch kein hochmolekulares Hyaluron. Nur in DM Membranen wurden signifikante Mengen von niedermolekularem Hyaluron festgestellt.

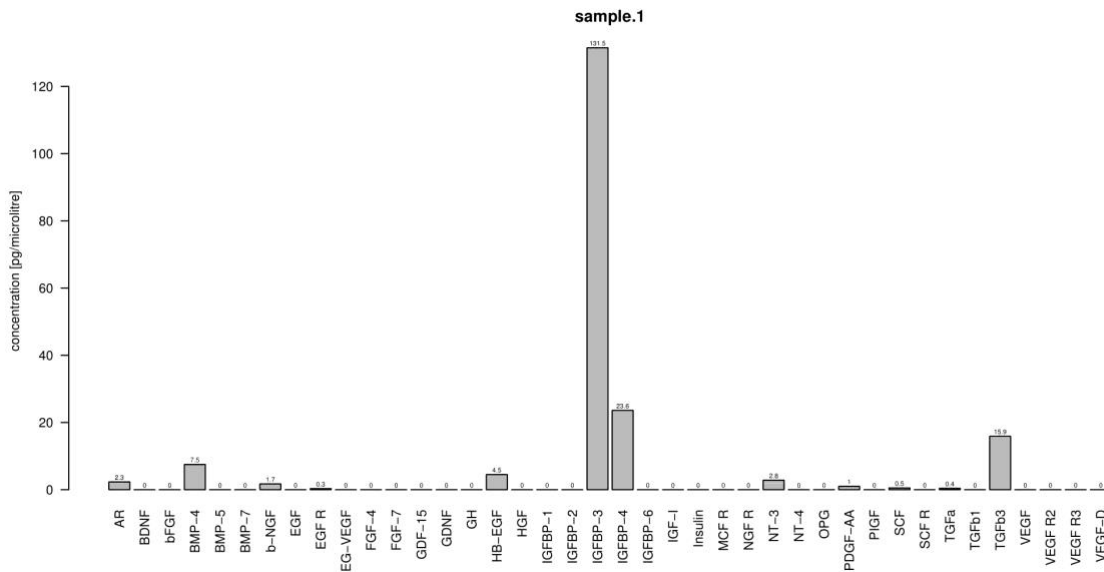
## Ergebnisse

---

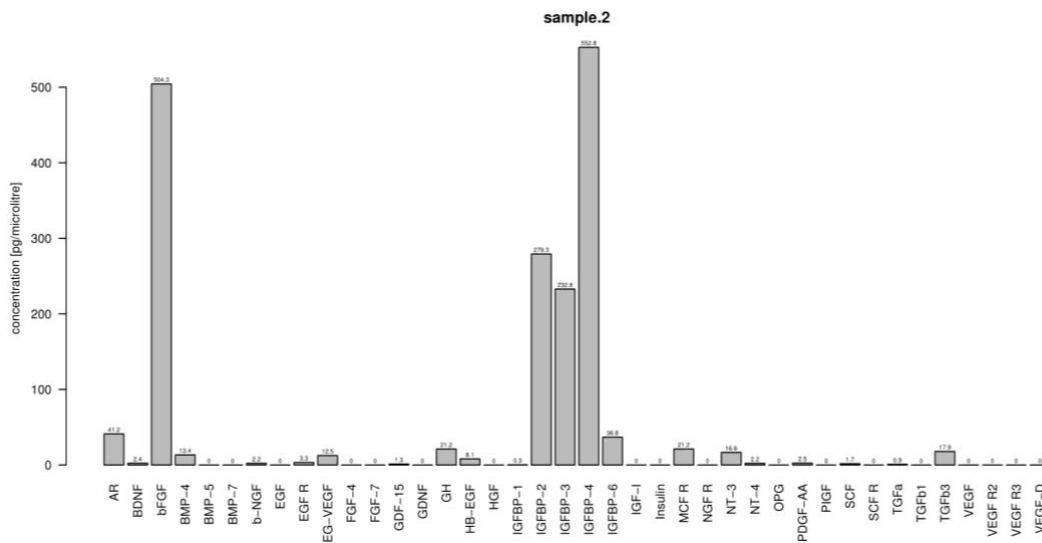


**Abb. 13:** Inverse Konzentrationskurve zur Bestimmung der Konzentration der freigesetzten Hyaluronsäure. Die y-Achse zeigt die Konzentration (ng/ml), die x-Achse die Absorption.

## 4.7. Bestimmung freier Wachstumsfaktoren in den Barrieremembranen



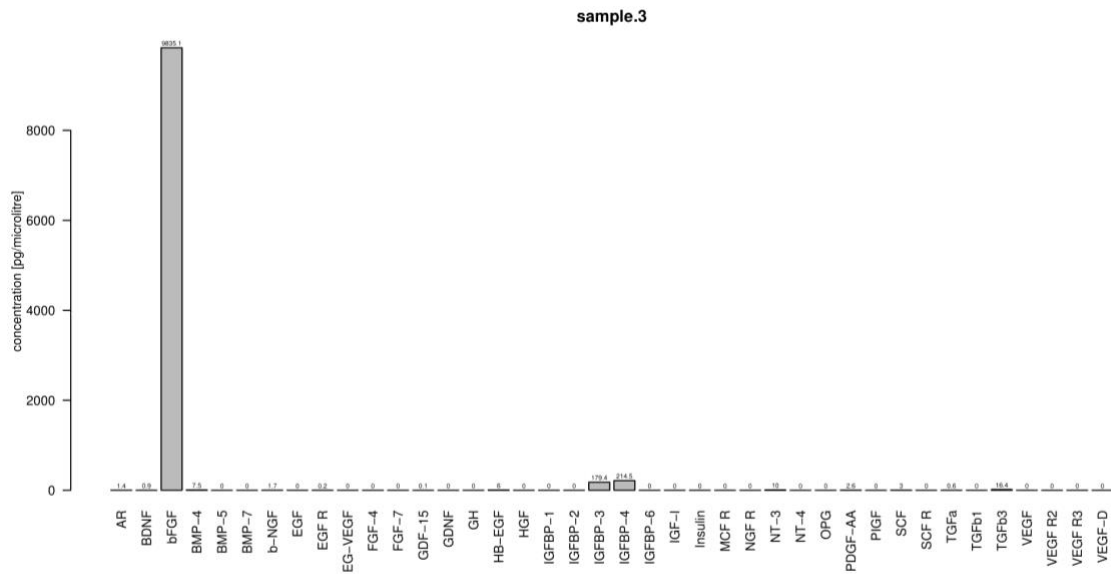
**Abb. 14:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten OssixPlus Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/μl), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BMP-4, b-NGF, EGF R, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, PDGF-AA, SCF, TGFa und TGFβ.



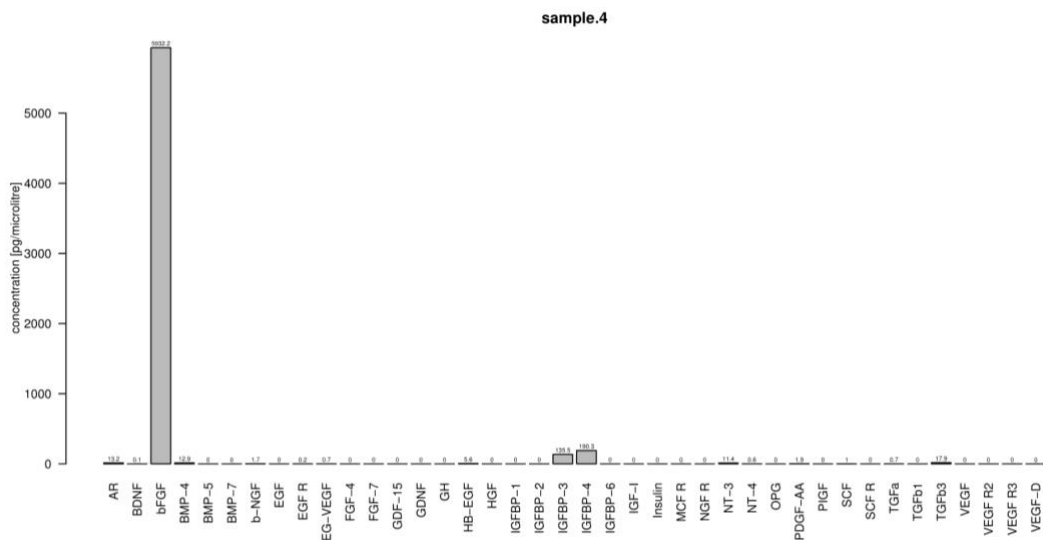
**Abb. 15:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten OssixPlus Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ l), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, GDF-15, GH, HB-EGF, IGFBP-1, IGFBP2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$ , und TGF $\beta$ 3.

Im Eluat der OssixPlus Membran konnten 12 der 40 Wachstumsfaktoren, nämlich AR, BMP-4, b-NGF, EGF R, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3, nachgewiesen werden (Abb.15).

Im Eluat einer weiteren OssixPlus Membran wurden 22 der 40 Faktoren detektiert: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, GDF-15, GH, HB-EGF, IGFBP-1, IGFBP2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$ , und TGF $\beta$ 3 (Abb. 16). Die höchste Konzentration der im Eluat der beiden OssixPlus-Membranen nachgewiesenen Wachstumsfaktoren haben IGFBP-3 (131,5 pg/ $\mu$ l) und IGFBP-4 (23,6 pg/ $\mu$ l) sowie IGFBP-4 (552,8 pg/ $\mu$ l) und bFGF (504,3 pg/ $\mu$ l).



**Abb. 16:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten DynaMatrix Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ l), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  sowie TGF $\beta$ 3.

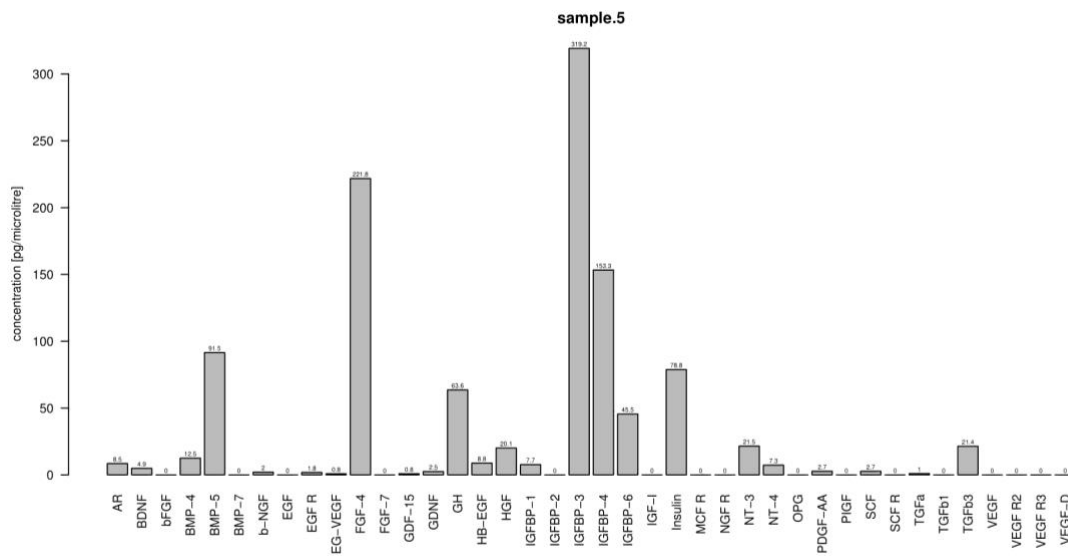


**Abb. 17:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten DynaMatrix Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/μl), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3.

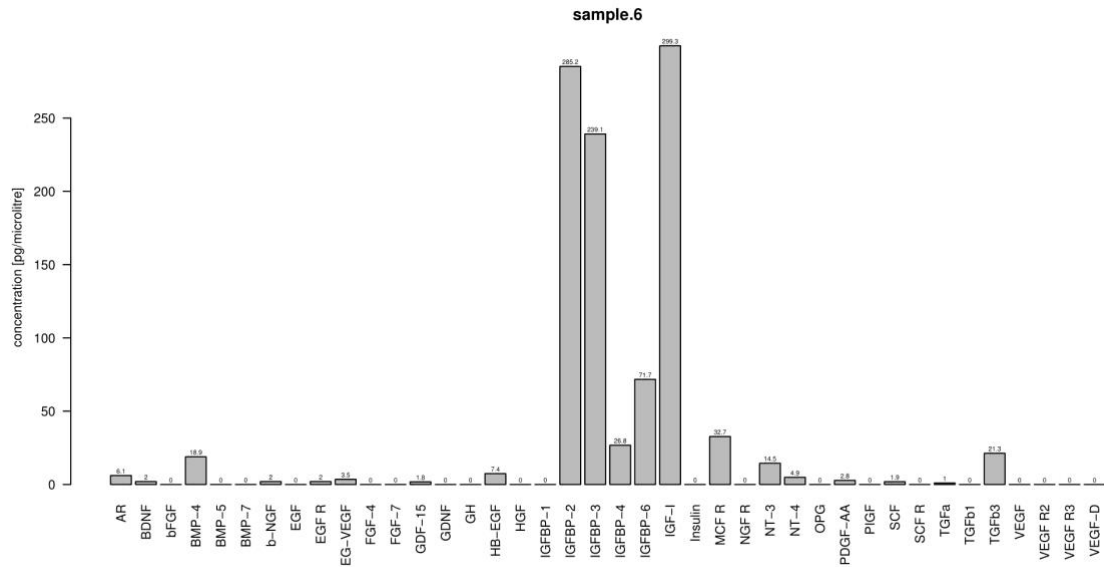
Im Eluat der DynaMatrix Membran wurden 15 Wachstumsfaktoren detektiert: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  sowie TGF $\beta$ 3 (Abb. 17).

Das Eluat einer weiteren DynaMatrix Membran enthielt 16 der 40 untersuchten Faktoren, nämlich AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3 (Abb. 18).

Im DynaMatrix-Eluat lag der Faktor bFGF in der höchsten Konzentration vor (9835,1 pg/μl und 5932,2 pg/μl), gefolgt von IGFBP-4 und IGFBP-3.



**Abb. 18:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten BioMend Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ l), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, GDF-15, GDNF, GH, HB-EGF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, Insulin, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3.

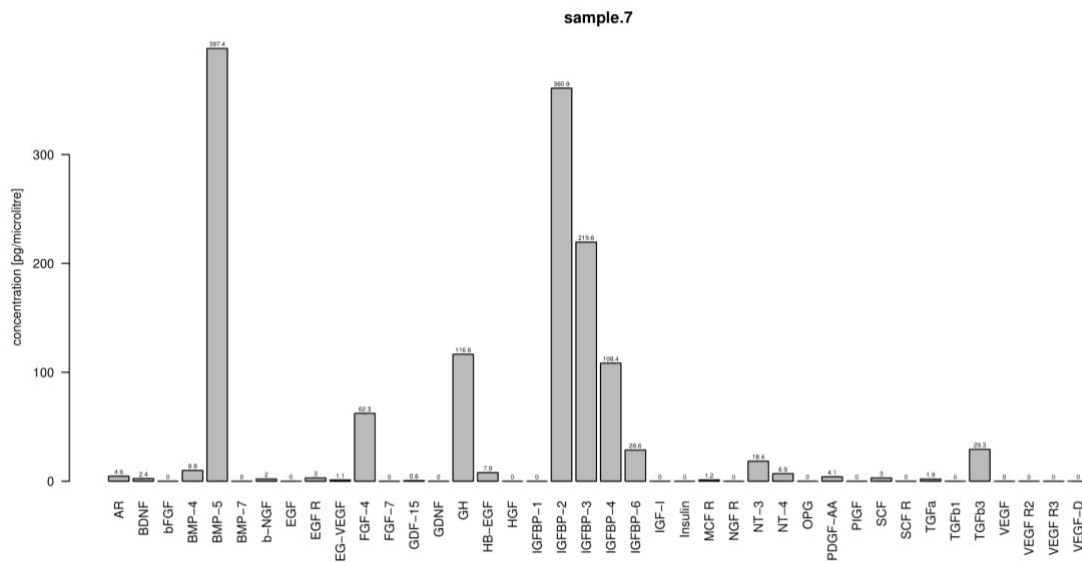


**Abb. 19:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten BioMend Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/μl), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGF-I, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3.

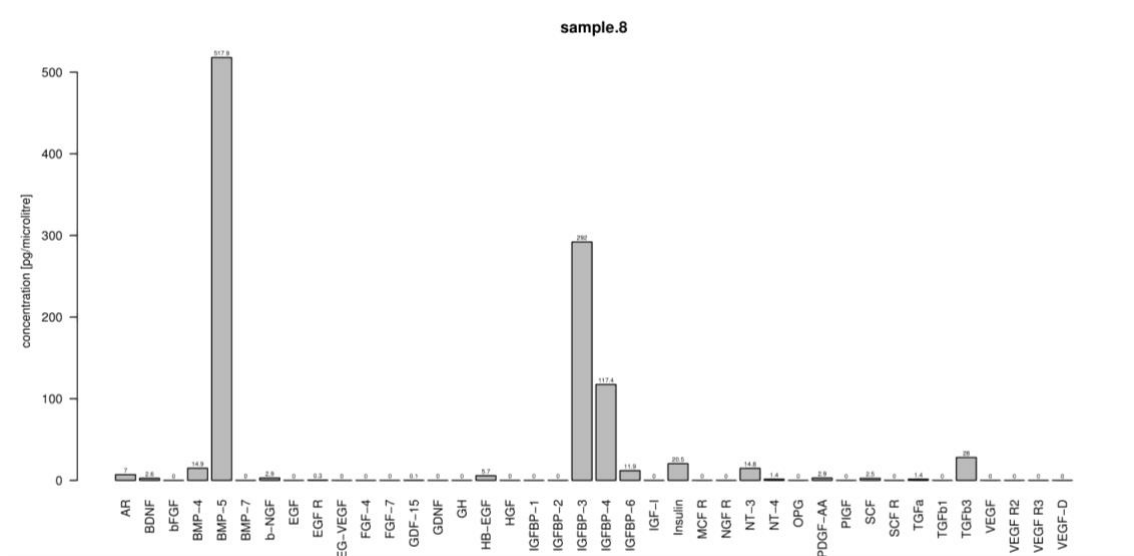
Im Eluat der BioMend Membran sind 24 der untersuchten Wachstumsfaktoren ermittelt worden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, GDF-15, GDNF, GH, HB-EGF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, Insulin, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3 (Abb. 19).

Das Eluat einer weiteren BioMend Membran enthielt 20 von 40 Faktoren: AR, BDNF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGF-I, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3 (Abb. 20). Die höchste Konzentration der im Eluat der BioMend Membranen nachgewiesenen Wachstumsfaktoren haben IGFBP-3 (319,2 pg/μl) und FGF-4 (221,8 pg/μl) sowie IGF-I (299,3 pg/μl) und IGFBP-2 (285,2 pg/μl).





**Abb. 20:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten BioGide Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ l), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, GDF-15, GH, HB-EGF, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3.



**Abb. 21:** Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten BioGide Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/µl), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, Insulin, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3.

Das Eluat der BioGide Membran enthielt 22 der untersuchten 40 Faktoren, nämlich AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, GDF-15, GH, HB-EGF, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3 (Abb. 21). Im Eluat einer weiteren BioGide-Membran wurden 18 Faktoren gemessen: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, Insulin, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3 (Abb. 22). Auf beiden Objektträgern lag der Faktor BMP-5 jeweils in der höchsten Konzentration (517,9 pg/µl und 397,3 pg/µl) und GDF-15 in der niedrigsten (0,6 pg/µl und 0,1 pg/µl) vor.

Bei allen vier untersuchten Membranen konnten die Wachstumsfaktoren IGFBP-3, IGFBP-4, BMP-4 und TGF $\beta$ 3 nachgewiesen werden. IGFBP-3 und IGFBP-4 lagen dabei in allen Membranproben in hohen Konzentrationen vor, nur bei DynaMatrix-Membranen waren die ermittelten Konzentrationen vergleichsweise gering (214,5 pg/µl und 190,3 pg/µl). Die höchste Konzentration von IGFBP-4 wurde in OssixPlus Membranen (552,8 pg/µl) nachgewiesen. Die Konzentration von TGF $\beta$ 3 war in allen 8 Membranproben gering, mit Werten zwischen 15,9 und 29,3 pg/µl. Die ermittelten

## Ergebnisse

---

Werte für BMP-4 lagen zwischen 7,5 und 18,9 pg/ $\mu$ l. Auffallend hohe Konzentrationen konnten für bFGF in DynaMatrix- Membranen festgestellt werden (9835,1 pg/ $\mu$ l und 5932,2 pg/ $\mu$ l).

Die meisten Wachstumsfaktoren wurden im Eluat der BioMend- Membranen nachgewiesen. An zweiter Stelle folgt das Eluat der Membranen vom Typ BioGide.

## 5. Diskussion

### 5.1. Versuchsaufbau

Gegenstand der vorliegenden Studie war die Untersuchung der biologischen Wirkungen von resorbierbaren Barrieremembranen xenogenen Ursprungs, die routinemäßig im Rahmen der GBR-/ GTR Verfahren klinisch eingesetzt werden (Shi und Ronfard 2013, Wang et al. 2002 Rothamel et al. 2004). Es wurden Membranen untersucht und verglichen, welche sich sowohl in ihrem Ursprung (Kollagen und extrazelluläre Matrix) als auch in der Art der Quervernetzung (Formaldehyd/Glutaraldehyd/Polysaccharide) unterscheiden (Spinell et al. 2019). Für die Untersuchung der Zytotoxizität wurden zwei verschiedene Zelllinien, PDL-hTERT Zellen und hMSC Zellen herangezogen, da diese als adulte Stammzellen, beziehungsweise als Zellen mit Stammzeleigenschaften (PDL-hTERT), in die parodontale Regeneration involviert sind (Sanchez-Lara und Warburton 2012, Docheva et al. 2010). Diese Zellen können sich zu Zementoblasten, Osteoblasten und parodontalen, ligamentären Fibroblasten differenzieren (Pittenger et al. 1999, Docheva et al. 2010, Fujii et al. 2008). Beide Zelllinien wurden gemeinsam mit gewaschenen und mit ungewaschenen Membranen kultiviert und das Zellwachstum sowohl an der Membran als auch im Probengefäß bestimmt. Zusätzlich wurde das von den gewaschenen Membranen gewonnene Eluat getrennt von den Membranen auf Zytotoxizität getestet. Eine mögliche Schwäche dieser Untersuchung könnte in dem mechanischen Einfluss der Membranen auf die Zellen liegen, da die schwimmenden Membranen das Zellwachstum der adhärennten Zellen unter Umständen negativ beeinflusst haben. Dies erschwert auch den Vergleich mit den Versuchsergebnissen der Untersuchung des Eluats, da das Zellwachstum hier von keinen Membranen potentiell beeinflusst wurde. Eine weitere Schwäche der vorliegenden Studie liegt in der geringen Probenzahl (n=4 pro Gruppe). Eine höhere Fallzahl wäre vorteilhaft

gewesen, weshalb die Ergebnisse in weiteren unabhängigen Studien verifiziert werden sollten.

Ebenfalls Gegenstand der Studie war die Untersuchung der Hyaluronsäurefreisetzung aus Barrieremembranen. Aufgrund ihrer antiödematösen- und in Abhängigkeit von der Molekülgröße antiinflammatorischen Wirkung, sowie der Fähigkeit zur Regulation von Zellteilungsmechanismen und Zellproliferation fördert HA die Wundheilung, die Angiogenese und Knochenneubildung und ist ein geeignetes Mittel zur Behandlung pathologischer Veränderungen des Parodontiums (David-Raoudi et al. 2008; Laurent et al. 1995; Toole et al. 2002). Entscheidend für die Wirkung von Hyaluronsäure auf Zellproliferation und Angiogenese ist dabei ihre Molekülgröße (West und Kumar 1989; Gao et al. 2010). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie nicht nur untersucht, ob Membranen Hyaluronsäure freisetzen, sondern zusätzlich gezielt der Gehalt an niedermolekularen und hochmolekularen Hayluronsäuren analysiert.

Der Einfluss von löslichen Proteinanteilen, insbesondere Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, in Kombination mit Knochenersatzmaterialien und Membranen auf die parodontale Regeneration ist bekannt (Hauser et al. 2012, Kawese et al. 2003, Kapp und Smola 2006), vor allem die Faktoren PDGF, welcher die Fibroblastenproliferation fördert, TGF  $\beta$ , IGF und bFGF, welcher die Proliferation von Zellen mesenchymalen Ursprungs steigert, sind dabei von entscheidender Bedeutung (Okuda et al. 2003; Hodde et al. 2007; Claffey et al. 2001). Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Barrieremembranen ist dagegen in der Literatur bisher nahezu nicht untersucht worden und war deshalb ebenfalls ein bedeutender Aspekt dieser Studie. Es wurde das Vorkommen von 40 verschiedenen Zytokinen in den Barrieremembranen analysiert. Allerdings war in der vorliegenden Studie aufgrund der limitierten Probenzahl (n=2) eine statistische Bewertung der Wachstumsfaktorenkonzentration nicht möglich.

## 5.2. Zellproliferation in Abhängigkeit von der Art der Barrieremembran

Die Untersuchung der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Art der Membran hat ergeben, dass Membranen des Typs DynaMatrix und OssixPlus sowohl bei humanen mesenchymalen Stammzellen als auch bei parodontalen Ligamentzellen die Zellproliferation am wenigsten beeinträchtigen (Spinell et al. 2019). Eine mögliche Erklärung für das stärkere Zellwachstum in Anwesenheit der DynaMatrix Membranen könnte in der anatomischen Herkunft dieses Membrantyps zu sehen sein. Als einzige der hier untersuchten Membranen wird diese Barrieremembran aus intestinaler extrazellulärer Matrix gewonnen, welche möglicherweise eine höhere biologische Aktivität entfaltet als Sehngewebe und damit die Migration, Differenzierung und Proliferation verschiedener Zellarten stärker fördert (Shi und Ronfard 2013; Nihsen 2008; Mc Devitt, 2003). Ein weiterer Grund für die starke Zellproliferation könnte in der, ebenfalls in dieser Studie nachgewiesenen, vergleichsweise großen Menge des in DynaMatrix Membranen vorkommenden Wachstumsfaktors bFGF begründet sein (Spinell et al. 2019). Auch hinsichtlich dieses Aspekts, scheint der anatomische Ursprung von DynaMatrix Membranen entscheidend zu sein, da intestinale Matrix möglicherweise einen höheren natürlichen Gehalt an bFGF aufweist als Sehngewebe. Viele Studien bestätigen das Vorkommen von bFGF in small intestinale submucosa, dem Ursprung von DynaMatrix Membranen (Hodde et al. 2001; Hodde et al. 2007, McDevitt et al. 2003; Shapiro et al. 2015; Voytik- Harbin et al. 1997; de la Fuente et al. 2003). Das Vorkommen von bFGF in Sehngewebe wurde in diversen Studien untersucht. Chang et al. konnten in einer Untersuchung zur Quantifizierung von bFGF-mRNA an einem Kaninchenmodell zeigen, dass bFGF sowohl von Tenozyten als auch den Zellen der umgebenden Sehnscheide produziert wird (Chang et al. 1998, Hofmann 2016). Eine Studie von Molloy et al. belegt das Vorkommen und die vermehrte Produktion und Freisetzung von bFGF und anderen Wachstumsfaktoren im Rahmen von Sehnenverletzungen (Molloy et al. 2003). Die Zugabe des Wachstumsfaktors bFGF zu verletztem Sehngewebe fördert demnach die Zellproliferation und ist somit von Bedeutung für die Wundheilung. Eine Studie von Chan et al. bestätigt die Steigerung der Zellproliferation durch bFGF. Durch Zugabe von bFGF in einer Dosis von 2 µg/L und 10 µg/L wurde die Zellproliferation

signifikant erhöht beziehungsweise ein nahezu vollständiger Wundverschluss erreicht (Chan et al. 1997, Hofmann 2016). Die in den genannten Studien untersuchten bFGF-Dosen, welche die Zellproliferation positiv begünstigt haben, entsprechen den bFGF-Mengen, welche in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnten. In dieser Studie wurde bFGF in einer Dosis von 5-8 ng/ml aus den Membranen gelöst, was in etwa der gleichen Größenordnung entspricht. In einer Untersuchung von Chan et al. wurden ebenfalls verschiedene Mengen bFGF in Patellarsehendefekte injiziert und eine dosisabhängige Steigerung der Zellproliferation beobachtet (Chan et al. 2000). Die Ergebnisse decken sich mit einer Studie von Fukui et al., welche eine dosisabhängige Verbesserung der Bildung von Sehngewebe durch bFGF feststellen konnte. Diverse Untersuchungen haben ergeben, dass niedrige Dosierungen von bFGF die Sehnenheilung positiv beeinflussen, während sich höhere bFGF Dosen negativ auf die Gewebeheilung auswirken (Fukui et al. 1998; Hankemeier et al. 2005; Chan et al. 1997, Hofmann 2016). Im Kontrast zu den bereits genannten Studien, in welchen bFGF die Sehnenheilung begünstigt hat, stehen Untersuchungen, welche keinen signifikanten Einfluss von bFGF auf die Sehnenheilung beobachten konnten (Kraus et al. 2014, Hofmann 2016). Insgesamt scheint in Sehngewebe eher die Zugabe von bFGF entscheidend für die Steigerung der Zellproliferation zu sein, während small intestinale submucosa das Zellwachstum direkt durch einen hohen natürlichen Gehalt an bFGF positiv beeinflusst.

Ohne FGF wäre eine physiologische Zelldifferenzierung nicht möglich, es induziert die Proliferation und Migration von Fibroblasten, mesenchymalen Stammzellen, Endothel- und Epithelzellen und fördert die Regeneration und Neubildung von Gewebe und Gefäßen (Ornitz und Itoh 2001; Shu et al. 2016; Xie et al. 2006; Folkman und Klagsbrun 1987; Chan et al 1997). Verschiedene Studien belegen den Einfluss von bFGF auf Zelllinien, welche bei parodontalen Heilungsprozessen von großer Bedeutung sind (Takayama et al. 1997, Murakami et al. 1999, Shimazu und Morishita 2003). Takayama et al. konnten in einer Untersuchung zeigen, dass bFGF die Proliferation von PDL Zellen dosisabhängig beeinflusst. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml war der Einfluss von bFGF auf die PDL- Zellproliferation am größten (Takayama et al. 1997). In einer Untersuchung von Tan et al. wurde der Einfluss von bFGF auf die Proliferation und Migration von Osteoblasten und PDL Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen in Medium mit und ohne bFGF kultiviert. Sowohl das Zellwachstum der Osteoblasten als auch das der PDLs wurde durch bFGF stimuliert (Tan et al. 2005). Eine Studie von Murakami et al. hat ebenfalls gezeigt, dass bFGF die

Proliferation von PDL Zellen fördert und somit die parodontale Regeneration positiv beeinflusst (Murakami et al. 1999). Auch das Zellwachstum von hMSCs wird durch bFGF beeinflusst. Diverse Studien haben gezeigt, dass bFGF die Proliferation und Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen begünstigt (Ying et al. 2005, Solchaga et al. 2005, Tsutsumi et al. 2001, Zaragosi et al. 2006). Der Einfluss von bFGF auf die Proliferation der hMSCs scheint dosisabhängig zu sein, geringe bFGF Dosen haben das Zellwachstum signifikant gesteigert (Ying et al. 2005).

Die Vermutung, dass die Stimulierung des Zellwachstums bei DynaMatrix- und OssixPlus Membranen auf bFGF zurückzuführen ist, kann durch die vorliegende Studie allerdings nur bedingt bestätigt werden. So konnte einerseits nachgewiesen werden, dass die Zellproliferation der PDLs bei DynaMatrix Membranen, welche singnifikante Mengen an bFGF enthalten, am größten war, bei hMSC Zellen hingegen war dies nicht der Fall. Stattdessen zeigen die Ergebnisse, dass die Zellproliferation der hMSCs an ungewaschenen OssixPlus Membranen bessere Resultate erzielt hat. In OssixPlus Membranen, welche kollagenen Ursprungs sind, konnte in dieser Untersuchung jedoch kein bFGF nachgewiesen werden, weshalb das starke Zellwachstum hier auf eine andere Ursache zurückzuführen sein muss. Es kann daher nur tendenziell angenommen werden, dass bFGF das Zellwachstum beeinflusst. Bei DynaMatrix Membranen scheint dies der Fall zu sein. Nachdem jedoch auch andere in den Membranen enthaltene Bestandteile wie Hyaluronsäure oder weitere Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Proliferation der Zellen spielen könnten und es durch die Abhängigkeit vom jeweiligen Spendergewebe zu starken Abweichungen in der Konzentration von bFGF kommt, kann in dieser Studie keine eindeutige Aussage bezüglich des tatsächlichen Einflusses von bFGF auf das Zellwachstum getroffen werden. Es sollte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, den effektiven Einfluss von bFGF und anderen Einflussfaktoren auf die Zellproliferation im Vergleich zu Membranen ohne bFGF zu spezifizieren.



## **5.3. Zellproliferation in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und Quervernetzung der Membran**

### **5.3.1. Zellproliferation in Abhängigkeit von der Vorbehandlung (Waschen) der Membran**

Die Analyse der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Membran (Waschen) zeigt, dass bei PDL-hTERT Zellen das Zellwachstum durch Waschen von DynaMatrix Membranen signifikant stimuliert wird. Bei hMSC Zellen hingegen wurde die Zellproliferation bei keiner der untersuchten Membranen durch vorangehendes Waschen gesteigert. Die Steigerung der Proliferation der PDL-hTERT Zellen durch das Waschen von DynaMatrix Membranen könnte darin begründet liegen, dass beim Waschvorgang weitere, ohne das Waschen eventuell nicht wirkende Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Des Weiteren könnten möglicherweise zytotoxisch wirkende Inhaltsstoffe durch das Waschen eliminiert und dadurch das Zellwachstum positiv beeinflusst worden sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass durch das Waschen der Membranen die enthaltenen Wachstumsfaktoren ausgewaschen werden und die Zellproliferation an den anderen Membranen dadurch beeinträchtigt wurde. Bisher gibt es nicht viele Studien, die den Einfluss eines vorangehenden Waschens der Membranen auf das Wachstum von Zellen untersucht haben. Eine Studie von Liu et al. hat den Einfluss von Kollagenmembranen sowie deren Wascheluat auf die Proliferation von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Unter Verwendung des Zellproliferationsreagenzes WST-1 sollte festgestellt werden, ob durch das Waschen der Membranen in Zeiträumen von 10 Minuten, einer Stunde und 24 Stunden toxische Substanzen freigesetzt werden, welche die Zellproliferation der hMSCs beeinflussen. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Zytotoxizität der Wascheluate insgesamt gering war und mit zunehmender Inkubationsdauer abgenommen hat. Zudem ist festgestellt worden, dass ein vorangehendes Waschen der Membranen die Zellproliferation der humanen mesenchymalen Stammzellen positiv beeinflussen könnte (Liu et al. 2011). Bei der Entscheidung, ob eine Membran vor der Applikation in den Defekt gewaschen werden

sollte oder nicht, müssen auch die entsprechenden Herstellerangaben berücksichtigt werden. Andernfalls besteht die Gefahr, dass die Membranen durch das Waschen beim Zuschneiden auf die entsprechende Defektgröße reißen oder nicht richtig adaptiert werden können. BioGide Membranen sollten gemäß Herstellerangabe trocken appliziert werden. BioMend Membranen können sowohl trocken als auch hydratisiert durch vorangehendes Waschen in sterilem Wasser oder Kochsalzlösung verwendet werden. OsseoGuard Membranen können ebenfalls trocken oder feucht in den Defekt eingebracht werden. Für die Verwendung in hydratisierter Form empfiehlt der Hersteller ein fünfminütiges Waschen in sterilem Wasser oder Kochsalzlösung. OssixPlus Membranen sollten feucht angewandt und hierfür vor dem Gebrauch drei Minuten in Kochsalzlösung gewaschen werden. DynaMatrix Membranen sollten idealerweise trocken appliziert werden, alternativ ist laut Hersteller auch die Verwendung von in steriler Kochsalzlösung oder isotonischer Lösung gewaschenen Membranen möglich. In der vorliegenden Studie hatte einzig das Waschen von DynaMatrix Membranen einen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum der PDLs, bei den anderen Membranen konnte durch ein vorangehendes Waschen kein signifikanter Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen werden. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass wenn überhaupt sowohl zytotoxische, als auch neutrale und wachstumsstimulierende Stoffe in gleichen Mengen aus den Membranen herausgelöst werden. Die Membranen wurden in dieser Studie über einen Zeitraum von 72 Stunden gewaschen, was deutlich länger als die von den Herstellern empfohlene Zeitangabe ist, trotzdem wurde kein signifikanter Einfluss auf die Zellproliferation festgestellt. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass das Waschen der Membranen im klinischen Gebrauch, bei welchem die Membranen nur für wenige Minuten befeuchtet werden, Einfluss auf das Zellwachstum hat. Ein interessanter Gegenstand weiterer Studien wäre die Untersuchung, zu welchem Zeitpunkt welche Komponente der Membran im Laufe der Wundheilung nach Platzierung der Membran unter der Schleimhaut zum Tragen kommt.

### **5.3.2. Zellproliferation in Abhängigkeit von der Quervernetzung der Membran**

Der Vergleich des Zellwachstums an den Membranen hat ergeben, dass bei

ungewaschenen OssixPlus Membranen nicht nur in den Wells, sondern auch an den Membranen selbst ein deutlich erkennbares Zellwachstum stattfand (Spinell et al. 2019). Dies war bei den anderen Membrantypen nicht in diesem Ausmaß erkennbar, die unter Verwendung von WST-1 gemessene Zellzahl war an der Membran meist geringer als an der Wand des Probengefäßes. Die Erkenntnis, dass das Wachstum der an OssixPlus Membranen haftenden Zellen größer als das Wachstum an den anderen untersuchten Membranen ist, zeigt, dass eine Quervernetzung des Kollagens sich im Vergleich zu nativen Kollagenmembranen nicht per se negativ auf die Gewebe- und Knochenregeneration auswirken muss. Stattdessen könnte es ein Hinweis darauf sein, dass sich die verschiedenen Aufbereitungs- und Vernetzungstechniken des Kollagens unterschiedlich auf die Biokompatibilität der Membranen auswirken und eine Quervernetzung über Polysaccharide wie bei OssixPlus Membranen im Gegensatz zur Quervernetzung über Glutaraldehyd oder Formaldehyd, wie es bei BioMend- bzw. OsseoGuard Membranen der Fall ist, das Zellwachstum deutlich weniger beeinträchtigt. Dass eine Quervernetzung über Glutaraldehyd die Biokompatibilität herabsetzt und zytotoxische Effekte verursacht, konnte bereits in früheren Studien nachgewiesen werden (Speer et al. 1980; Wiebe et al. 1988; Ichikawa et al. 1997; Jorge-Herrero et al. 2010).

Bisher gibt es nur wenige Studien, die die Biokompatibilität von nativen und quervernetzten Kollagenmembranen untersucht haben. Marinucci et al. konnten in einer Studie zur Beurteilung der Biokompatibilität verschiedener Kollagenmembranen feststellen, dass an über Glutaraldehyd quervernetzten Biomed Extend Membranen und nicht quervernetzten BioGide Membranen ein geringeres Zellwachstum stattfand als an Membranen, die über Diphenylphosphorylazid (DPPA) quervernetzt sind (Marinucci et al. 2003). Dies stimmt mit den in unserer Untersuchung ermittelten Ergebnissen zum Zellwachstum an BioGide Membranen überein. Interessanterweise haben diese Membranen trotz fehlender Quervernetzung eine relativ hohe Zytotoxizität.

In einer Studie von Wang et al. wurde ebenso die Anlagerung und Proliferation von tierischen Osteoblasten der Maus (MC3T3-E1-Osteoprogenitorzellen) an sechs verschiedenen GBR/GTR Membranen nach 1,5 Stunden und nach 24 Stunden untersucht. Eine Zellulose-Ester-Membran (MF) diente als Kontrolle. Nach 1,5 Stunden ist an MF eine mittlere Zellzahl von  $27,5 \pm 2,1$  (MW  $\pm$  SD) und nach 24 Stunden von  $67,7 \pm 3,6$  (MW  $\pm$  SD) ermittelt worden. Das Zellattachement war signifikant höher als an allen GBR/GTR Membranen, so betrug die Zellzahl beispielsweise an der BioMend

Membran nur  $14,5 \pm 1,4$  (MW  $\pm$  SD) nach 1,5 Stunden und  $15,4 \pm 0,9$  (MW  $\pm$  SD) nach 24 Stunden (Wang et al. 2002). Die quervernetzte BioMend Kollagenmembran fördert demnach initial die Anlagerung der Osteoblasten, ein weiteres Zellwachstum nach 1,5 Stunden konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die Ursache dafür könnte in der Quervernetzung der Kollagenmembran zur Verlängerung ihrer Resorptionsdauer liegen.

In eine Studie von Rothamel et al. wurde die Proliferation von humanen PDL-Fibroblasten und SaOs-2 Osteoblasten an Kollagenmembranen untersucht. Beide Zelllinien wiesen an BioMend Membranen die geringste Zellproliferation auf. An BioGide- und Ossix Membranen war das Zellwachstum signifikant höher (Rothamel et al. 2004).

Die Ergebnisse der Studien variieren, was in der Verwendung der beiden verschiedenen menschlichen Zelllinien begründet sein kann. Auch die Tatsache, dass es sich bei SaOs-2-Zellen um keine primäre Osteoblastenzelllinie, sondern um immortalisierte Zellen aus einem Osteosarkom handelt, kann zu Einschränkungen der knochenähnlichen Eigenschaften, wie beispielsweise verringerten Kalzifizierungsraten führen (Rothamel et al. 2004). Die Studien bestätigen das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung, dass das Zellwachstum an quervernetzten Kollagenmembranen nicht per se schlechter als an nativen Kollagenmembranen ist. Auch in dieser Studie wurden Unterschiede in der Membranzytotoxizität auf hMSCs und PDLs beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass die Membranen das Zellwachstum der PDLs relativ stark beeinflussen, während sie kaum Einfluss auf die Proliferation der hMSC Zellen haben. Im Eluat hingegen sind die hMSC Zellen unterschiedlich gewachsen.

## **5.4. Nachweis von Hyaluronsäure in den Barrieremembranen**

Die Funktion und Wirkung von Hyaluronsäure ist abhängig von deren Molekulargewicht. Es wird zwischen hochmolekularem HA ( $>1.000.000$  Da) und niedermolekularem HA ( $<500.000$  Da) unterschieden (Petrey und De la Motte 2014).

Je nach molekularer Größe kann Hyaluron unterschiedliche biologische Wirkungen wie die Regulation von Entzündungsgeschehen, Wundheilung, Angiogenese sowie Zellproliferation und -migration beeinflussen (De la Motte et al. 2003; Toole 2004; Powell und Horton 2005; West und Kumar 1989). Im Rahmen von Entzündungsvorgängen besitzt hochmolekulare Hyaluronsäure die Fähigkeit, intrazellulär sog. Stress-Kabel auszubilden, welche Entzündungszellen abfangen, sie wirkt anti-inflammatorisch und immunsuppressiv (De la Motte et al. 2003). HA-Oligosaccharide induzieren in dendritischen Zellen die Expression von inflammatorischen Genen (Termeer et al 2000), ihnen wird eine proinflammatorische Wirkung sowie Immunstimulation zugeschrieben (Toole 2004). Niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente fungieren bei Entzündungen oder Verletzungen als sog. „Gefahren-Moleküle“ (Sun 2002). Auch bei der Regulation der Wundheilung ist Hyaluronsäure von Bedeutung, sie wird in verletztem Gewebe, verglichen mit gesundem Gewebe, verstärkt synthetisiert (Whitby et al. 1992, Weitzhandler et al. 1992, Lawrence et al. 1994) und regt die Fibroblastenmigration (Toole et al. 1993) und Zellproliferation an (Knudson et al., 1985, Sherman et al. 1994). Auch bei der Angiogenese, der Neubildung von Blutgefäßen, sowie der Zellproliferation und Zellmigration spielt Hyaluronsäure eine wichtige Rolle. Niedermolekulare Hyaluronsäure scheint die Angiogenese, Neovaskularisation, Zellproliferation und Zellmigration zu fördern (West und Kumar 1989; Pistorius et al. 2005; Gao et al. 2010). Einige Studien konnten übereinstimmend eine Steigerung der Zelldifferenzierung durch niedermolekulare Hyaluronsäure zeigen (Fujioka-Kobayashi et al. 2017, Zhao et al. 2016, Zou et al. 2008, Gu et al. 2010). Niedermolekulares HA und HA Oligosaccharide stimulieren die Endothelzellproliferation und fördern dadurch die Angiogenese (Toole und Hascall 2002). Bei der Wirkung von hochmolekularer Hyaluronsäure auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen variieren die Ergebnisse verschiedener Studien. Einige Untersuchungen haben ergeben, dass hochmolekulare Hyaluronsäure die Angiogenese und Zellproliferation hemmt und die Osteoblastenanreicherung sowie Regeneration von Knochen fördert (Sasaki und Watanabe 1995, Fujioka-Kobayashi et al. 2017; West und Kumar 1987; West und Kumar, 1989; Folkmann 1987; Kaneko et al. 2015). Eine Untersuchung von Takeda et al. hat dagegen ergeben, dass hochmolekulares Hyaluron die Proliferation und Adhäsion von PDL Zellen steigert (Takeda et al. 2011). Auch eine Studie von Fujioka-Kobayashi et al., welche den Einfluss von quervernetzter und nicht quervernetzter hochmolekularer Hyaluronsäure auf parodontale Ligamentzellen untersucht hat, konnte zeigen, dass die Zellzahl durch

hochmolekulares Hyaluron signifikant angestiegen ist, weshalb ein positiver Einfluss von hochmolekularer Hyaluronsäure auf die parodontale Geweberegeneration vermutet wird (Takeda et al., Fujioka-Kobayashi et al. 2017). Eine weitere Studie belegt ebenso, dass hochmolekulares Hyaluron die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen fördert (Hempel et al. 2012). Die widersprüchlichen Ergebnisse der Wirkung von hochmolekularer Hyaluronsäure könnten durch die Unterschiede im Molekulargewicht und der Konzentration der untersuchten Hyaluronsäure begründet sein (Fujioka-Kobayashi et al. 2017). Die Untersuchung des Hyaluronsäuregehalts in der vorliegenden Studie hat ergeben, dass hinsichtlich der Menge und molekularen Größe des Hyalurons deutliche Unterschiede zwischen den Membrantypen bestehen. Die Studie hat gezeigt, dass BioMend- und BioGide Membranen nur hochmolekulares Hyaluron freisetzen. DynaMatrix Membranen sind die einzigen, die größere Mengen sowohl an nieder als auch an hochmolekularem Hyaluron freisetzen. Insgesamt haben jedoch alle getesteten Membranen mit Ausnahme von OssixPlus Membranen Hyaluronsäure enthalten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich das Quervernetzungsverfahren der OssixPlus Membranen, welche als einzige der untersuchten Membranen über Polysaccharide quervernetzt sind, negativ auf den Hyaluronsäuregehalt auswirkt. Zudem hat Hyaluronsäure in erster Linie Einfluss auf die Angiogenese (Toole et al. 20022), weniger auf das von uns untersuchte Zellwachstum. Dennoch scheint es möglich, dass ein hoher Gehalt an niedermolekularem Hyaluron auch das Wachstum der Zellen fördert, da bei DynaMatrix Membranen, welche den größten Anteil an niedermolekularem Hyaluron aufwiesen, sowohl bei hMSC Zellen als auch bei PDL Zellen ein großes Zellwachstum festgestellt werden konnte. Was dagegensprechen könnte, ist die Tatsache, dass in unserer Studie in OssixPlus Membranen keine Hyaluronsäure nachgewiesen werden konnte, andererseits das Wachstum der hMSC Zellen an ungewaschenen OssixPlus Membranen am größten war. Es muss berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Studie nur eine vergleichsweise geringe Probenzahl von Membranen im Rahmen einer Pilotstudie hypothesengenerierend auf ihren Hyaluronsäuregehalt untersucht wurde. Es scheint derzeit keine anderen Studien zu geben, die den Hyaluronsäuregehalt in GBR/GTR Membranen untersucht haben, weshalb ein Vergleich der Daten nicht möglich ist. Inwiefern der Gehalt an Hyaluronsäure einen Einfluss auf die Wundheilung hat, muss in weiteren Studien spezifiziert werden.

## 5.5. Nachweis von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in den Barrieremembranen

In der vorliegenden Studie variiert die Menge der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, welche aus den Membranen freigesetzt werden, stark. Der Vergleich von Proben verschiedener Membranen lieferte unterschiedliche Werte im Vorkommen und in der Menge der nachgewiesenen Wachstumsfaktoren. Dies kann verschiedene Ursachen haben, als problematisch kann insbesondere jedoch die sehr geringe Probenzahl angesehen werden. Ein Grund für die Varianz der nachgewiesenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren könnte in der Entnahmestelle des verwendeten Materials liegen. Eine Studie von Herrmann hat beispielsweise gezeigt, dass bei autologem Knochenersatzmaterial die für die Knochenregeneration förderlichen Wachstumsfaktoren sowohl in der Spülflüssigkeit, welche beim Bohren anfällt, als auch im thrombozytenreichen Plasma (Platelet Rich Plasma, PLP) und dem aufbereiteten thrombozytenarmen Plasma (Platelet Poor Plasma, PPP), nachgewiesen werden konnten (Herrmann 2015). Der in den Materialien enthaltene Gehalt an Wachstumsfaktoren könnte somit vom anatomischen Ursprung des zur Membranherstellung herangezogenen Gewebes abhängen. Einschränkend haben bisher nur wenige Studien den Gehalt an Wachstumsfaktoren in den unterschiedlichen Materialien vergleichend untersucht. In einer Arbeit von Wildemann et al. konnte gezeigt werden, dass die Menge von Wachstumsfaktoren in drei unterschiedlichen allogenen Knochentransplantaten schwankt (Wildemann et al. 2007). Eine Studie aus dem Jahr 2015 analysierte den Gehalt von acht Wachstumsfaktoren, nämlich BMP-2, BMP-4, TGF- $\beta$ 1, FGFa, bFGF, IGF- 1, PDGF und VEGF in Beckenkammknochen, Bohrmehl, Spülflüssigkeit, PRP und PPP. Die Konzentrationen von FGFa, PDGF, IGF-1, BMP-2 und TGF- $\beta$ 1 in Beckenkammknochen und Bohrmehl waren vergleichbar, bFGF und VEGF kamen im Beckenkammknochen in deutlich höherer Konzentration vor. Die Menge der in der Spülflüssigkeit enthaltenen Wachstumsfaktoren waren teilweise vergleichbar mit der im PRP. Zwischen PRP und PPP gab es deutliche Unterschiede im Gehalt der Faktoren VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 (Herrmann 2015).

Eine weitere Ursache für die voneinander abweichenden Konzentrationen der untersuchten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren könnte im Geschlecht des Spenders liegen. In einer Studie von Pietrzak et al. wurde festgestellt, dass die Konzentration von BMP-2 und BMP-4 von weiblichen Spendern signifikant größer war als die von männlichen Spendern (Pietrzak et al. 2006).

Auch das Alter der Spender könnte Einfluss auf den Gehalt an Wachstumsfaktoren nehmen. Mit zunehmendem Alter scheint der Gehalt an Wachstumsfaktoren im Knochen abzunehmen (Boonen et al. 1997).

Ebenso können die Verarbeitung und interindividuelle Unterschiede der Spender eine Erklärung für die Varianz der Wachstumsfaktoren sein (Kalen et al. 2008). Zusätzlich muss bei der Analyse der gewonnenen Daten berücksichtigt werden, dass der in unserer Studie verwendete Test zum Nachweis humaner Wachstumsfaktoren dient, die untersuchten Membranen aber tierischen Ursprungs sind und somit tierische Faktoren enthalten.

DynaMatrix Membranen werden aus Dünndarmmukosa von Schweinen hergestellt (Keystone Dental). In SIS konnten unter anderem die Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- $\beta$  und bFGF nachgewiesen werden (Hodde et al. 2001; McDevitt et al. 2003; Shapiro et al. 2015; Voytik-Harbin et al. 1997). Dies stimmt zum Teil mit den in unserer Studie gewonnenen Ergebnissen überein. Sowohl bFGF als auch TGF wurden in DynaMatrix Membranen detektiert, VEGF konnte dagegen nicht angetroffen werden.

BioGide und OssixPlus Membranen werden aus Kollagen porcinen Ursprungs gewonnen, BioMend- sowie OsseoGuard Membranen stammen aus bovinen Achillessehnen (Geistlich; Zimmerdental). Im Kollagen gesunder Sehnen scheint der Wachstumsfaktor IGF-1 anzutreffen zu sein, zusätzlich konnten im Rahmen von Heilungsprozessen in Sehnen die Faktoren bFGF, VEGF, TGF- $\beta$  sowie BMPs nachgewiesen werden (James et al. 2008; Petersen et al. 2003; Scott et al. 2008). Vor allem bFGF scheint hinsichtlich der Regeneration von Sehnengewebe von Bedeutung zu sein. Diverse Studien belegen das Vorkommen von bFGF in Sehnengewebe (Chang et al. 1998, Hofmann 2016). Untersuchungen von Molloy et al. und Chan et al. konnten das Vorkommen sowie die vermehrte Produktion und Freisetzung von bFGF im Rahmen von Sehnenverletzungen zeigen, wobei hauptsächlich niedrige bFGF Dosen die Zellproliferation und somit die Sehnenheilung positiv zu beeinflussen scheinen (Molloy et al. 2003, Chan et al. 1997, Fukui et al. 1998).

In unserer Studie enthielten die Membranen aus Schweinekollagen weder IGF-1 noch VEGF, es konnten jedoch in BioGide Membranen TGF- $\beta$  und BMPs, in OssixPlus



Membranen TGF- $\beta$ , bFGF und BMPs festgestellt werden. BioMend Membranen aus Rinderkollagen enthielten kein VEGF und kein bFGF, die Faktoren IGF-1, TGF- $\beta$  sowie BMPs wurden dagegen nachgewiesen.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der gesteuerten Gewebe- und Knochenregeneration finden verschiedene, nach unterschiedlichen Quervernetzungsverfahren vorbehandelte chirurgische Barrieremembranen Verwendung. Ziel dieser Studie war es, Membranen hinsichtlich ihrer biologischen Wirkungen auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und parodontale Ligamentzellen (PDL-hTERT) zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Gehalt an löslichen Hyaluronsäuren mit niedrigem und hohem Molekulargewicht sowie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren bestimmt werden.

Untersucht wurden fünf Membrantypen xenogenen Ursprungs, darunter vier aus Kollagen (BioGide, Geistlich Pharma AG; BioMend, Zimmer Dental; OsseoGuard, Zimmer Biomet; OssixPlus, Datum Dental) und eine aus extrazellulärer Matrix (DynaMatrix, Keystone Denta). hMSCs und PDLs wurden mit gewaschenen und ungewaschenen Membranen kultiviert und das Zellwachstum mit Hilfe des WST-1 Tests ermittelt. Die Bestimmung der Hyaluronsäurefreisetzung erfolgte mittels ELISA, der Gehalt der Barrieremembranen an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wurde mit einem Multiplex-ELISA gemessen (Spinell et al. 2019).

Die Untersuchung der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Art der Barrieremembran hat ergeben, dass DynaMatrix- und OssixPlus Membranen die Proliferation von hMSCs und PDLs am stärksten fördern, ebenso hat das Waschelut der extrazellulären DynaMatrix Membran die Zellproliferation gefördert. Die Vorbehandlung (Waschen) von DynaMatrix Membranen stimuliert die Proliferation von PDL-hTERT Zellen zusätzlich. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Quervernetzung von Kollagenmembranen das Zellwachstum nicht beeinträchtigt, da an quervernetzten OssixPlus Membranen die größte Menge von direkt an den Membranen haftenden Zellen nachgewiesen werden konnte, es zeigt sich ein Trend zur Stimulierung des Zellwachstums.

Die Untersuchung des Hyaluronsäuregehalts der Membranen ergab, dass alle Membranen außer OssixPlus Membranen Hyaluronsäure enthalten. DynaMatrix Membranen sind dabei die einzigen, die sowohl hochmolekulares- als auch niedermolekulares Hyaluron in signifikanter Menge freisetzen.

Auch die Freisetzung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren hat zwischen den Membranen stark variiert und scheint von verschiedenen Einflussfaktoren wie der Entnahmestelle des Ursprungsgewebes der Barrieremembranen, der Verarbeitung sowie interindividuellen Faktoren abzuhängen. Die Konzentration der meisten Faktoren lag zwischen 10-500 ng/ml, eine deutlich höhere Konzentration des Faktors bFGF wurde in DynaMatrix Membranen ermittelt (Spinell et al. 2019).

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AR	Amphiregulin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Fibroblast Growth Factor b
BG	BioGide Membran
BM	BioMend Membran
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSSC	Bone marrow stromal stem cells
b-NGF	Brain nerve growth factor
DBBM	Deproteinized bovine bone mineral
DFDBA	Demineralized freezedried bone allograft (= demineralisierter, entkalkter, gefriergetrockneter Knochen)
DFDBM	Demineralized freezedried bone matrix (= demineralisierte, entkalkte Knochenmatrix)
DM	DynaMatrix Membran
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
e-PTFE	Expandiertes Polytetrafluorethylen
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GBR	Guided bone regeneration (= gesteuerte Knochenregeneration)
GDF	Growth and differentiation factor

GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GH	Growth hormone
GTR	Guided tissue regeneration (= gesteuerte Geweberegeneration)
HA	Hyaluronsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IGF-II	Insulin-like Growth Factor-II
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
MCF	Macrophage Chemotactic Factor Receptor
MEM	Minimum Essential Medium
NGF	Nerve Groth Factor
NT	Neutrophin
NW	Nicht gewaschen
OG	OsseoGuard Membran
OPG	Osteoprotegrin
OX	OssixPlus Membran
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet- Derived Growth Factor
PDL	Parodontales Ligament
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglycolide (= Polyglykolide)
P.g.	Porphyromonas gingivalis
PIGF	Placental Growth Factor
PLA	Polyactic acid (= Polylaktide)
SCF	Stem Cell Factor
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
TGF- $\beta$ 2	Transforming Growth Factor $\beta$ 2
TGF- $\beta$ 3	Transforming Growth Factor $\beta$ 3
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
WST1	Tertazoliumsalz
W	Gewaschen

## 7.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über die verwendeten Membranen mit Angabe von Zusammensetzung, Ursprung, Gewebe und Quervernetzung (Spinell et al. 2019)	27
Tabelle 2	Übersicht über die verwendeten Membranen mit Angabe des Herstellers	27
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers	28
Tabelle 4	Übersicht über die verwendeten Materialien mit Angabe des Herstellers	29
Tabelle 5	Übersicht über die verwendeten Geräte mit Angabe der Typenbezeichnung und des Herstellers	30
Tabelle 6	Protokoll zur Passagierung der Zellen	33
Tabelle 7	Membrananordnung in allen Versuchen. In den 24-Wellplatten befinden sich in der ersten Spalte je vier BioGide Membranen, in der zweiten Spalte je vier BioMend Membranen, in der dritten Spalte je vier DynaMatrix Membranen, in der vierten Spalte je vier OsseoGuard Membranen, in der fünften Spalte je vier OssixPlus Membranen und in der sechsten Spalte je vier Positivkontrollen.	36
Tabelle 8	Übersicht über 40 Proteinanteile, die mit dem „Human Growth	

- Factor Array 1“ (RayBiotech, USA) nachgewiesen werden können. 48
- Tabelle 9 Hyaluronsäurekonzentrationen der verschiedenen Membranen nach Molekulargewicht. Für BioGide (BG-), BioMend (BM)-, DynaMatrix (DM)- und OssixPlus (OX)- Membranen ist jeweils der Mittelwert der Absorption (MW), die Standardabweichung der Absorption (SD), die Hyaluronsäurekonzentration (ng/ml) und das Molekulargewicht der Hyaluronsäure (kDa) dargestellt. BG, BM und OX setzen kein niedermolekulares Hyaluron frei, OX auch kein hochmolekulares Hyaluron. Nur in DM Membranen wurden signifikante Mengen von niedermolekularem Hyaluron festgestellt. 68
- Abbildung 1 Reaktionsweg des Tetrazoliums Salzes WST-1 zu Formazan. Das Enzym Succinat-Tetrazolium-Reduktase (=RS) spaltet das Tetrazolium-Salz WST1 in einer Reduktionsreaktion zum Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoff; EC= Elektronenaufnehmer (übernommen aus Roche Applied Science, Februar 2011). 32
- Abbildung 2 Modifizierte Neubauer Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl; die Platte besteht aus zwei breiten Außenfeldern und drei schmalen Innenfeldern. Im mittleren Innenfeld befindet sich der Mittelsteg, in diesen sind zwei Zählnetze eingraviert (Baussmerth 2014). 34
- Abbildung 3 Aufbau des Zählfeldes, das Zählnetz besteht aus neun großen Quadraten mit je 1mm Seitenlänge. Die vier in den Ecken liegenden Großquadrate bestehen aus je 16 Quadraten mit 0,25 mm Seitenlänge. Das mittige Großquadrat besteht aus 25 Gruppenquadraten mit je 0,2 mm Seitenlänge. Die

Gruppenquadrate wiederum bestehen aus 16 Kleinstquadraten mit je 0,05 mm Seitenlänge (übernommen aus P+W Medizintechnik 2012). 34

Abbildung 4 Funktionsprinzip des ELISAs zum Nachweis von Hyaluronsäure. Ein Antikörper, der gegen die gesuchte Hyaluronsäure gerichtet ist, wird am Boden der Mikrotiter-Platte gebunden. Die Hyaluronsäure (=Antigen) wird vom Antikörper gebunden. Es bildet sich ein Komplex aus Antikörper und Antigen. Ein zweiter gegen die Hyaluronsäure gerichteter Antikörper (=Detektionsantikörper), welcher mit einem Enzym (=Rezeptorenzym) gekoppelt ist, wird zugegeben. Das Enzym aktiviert durch Spaltung einen Farbstoff. Durch Messung der Absorption kann die gesuchte Hyaluronsäure quantifiziert werden (Hessling 2016). 45

Abbildung 5 Funktionsprinzip RayBiotech ELISA. Aus nachzuweisender Substanz und oberflächengebundenem Antikörper bildet sich ein Antikörper-Zytokin-Komplex, dieser bindet an einen Biotin-gekoppelten Antikörper. Durch Inkubation mit Streptavidin als Substrat für das gekoppelte Enzym ist die Nachweisreaktion möglich (übernommen aus RayBiotech, 2001-2019). 51

Abbildung 6 Kubische Wachstumskurve PDL-hTERT Zellen über einen Zeitraum von 12 Tagen. Die y-Achse zeigt die Absorption (nm), die x-Achse die Zeit (Tage), das maximale Zellwachstum wird nach 6-7 Tagen erreicht. 55

Abbildung 7 Kubische Wachstumskurve hMSC Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die y-Achse zeigt die Absorption (nm), die x-Achse die Zeit (Tage), das maximale Zellwachstum wird nach 5-7 Tagen erreicht. 56



Abbildung 8 Darstellung der WST-1 Absorption der hMSC Zellen bei ungewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-NW, BM-NW, DM-NW, OG-NW, OX-NW) sowie die Kontrolle (Ctr-NW). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). Alle ungewaschenen Membranen haben im Vergleich zur Kontrolle eine stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation von hMSC Zellen. 58

Abbildung 9 Darstellung der WST-1 Absorption der hMSC Zellen bei gewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-W, BM-W, DM-W, OG-W, OX-W) sowie die Kontrolle (Ctr-W). Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p=1$ ). Gewaschene DynaMatrix- und OssixPlus Membranen (DM-W, OX-W) zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine wachstumsstimulierende Wirkung auf hMSC Zellen, an BioGide- und OsseoGuard Membranen wurde ein geringeres Zellwachstum als an der Kontrolle festgestellt. 60

Abbildung 10 Darstellung der WST-1 Absorption im Eluat von adhären-ten und nicht adhären-ten hMSC Zellen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm$ ), die x-Achse zeigt das Eluat von adhären-ten und nicht adhären-ten Zellen der untersuchten Membranen (BG, BM, DM, OG, OX) sowie die Kontrolle (Ctr). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). 62

Abbildung 11 Darstellung der WST-1 Absorption der PDL-hTERT Zellen bei ungewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm$ ),

die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-UW, BM-UW, DM-UW, OG-UW, OX-UW) sowie die Kontrolle (Ctr-UW).

Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). An allen ungewaschenen Membranen wurde ein geringeres Zellwachstum der PDL-hTERT Zellen festgestellt als an der Kontrolle. 64

Abbildung 12 Darstellung der WST-1 Absorption der PDL-hTERT Zellen bei gewaschenen Membranen. Die y-Achse zeigt die Mittelwerte der WST-1 Absorption und Standardabweichungen ( $\pm$ ), die x-Achse zeigt die untersuchten Membranen (BG-W, BM-W, DM-W, OG-W, OX-W) sowie die Kontrolle (Ctr-W). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe sind mit \* markiert ( $p=0,05$ ). An gewaschenen BioMend- und OsseoGuard Membranen (BM-W, OG-W) wurde ein geringeres Zellwachstum als an der Kontrolle festgestellt. Das Wachstum der PDL-hTERTs an BioGide- und OssixPlus Membranen (BG-W, OX-W) ist vergleichbar mit dem Wachstum an der Kontrolle, wobei ein Trend zur Zytotoxizität zu erkennen ist. An DynaMatrix Membranen (DM-W) ist das Zellwachstum größer als an der Kontrolle. 66

Abbildung 13 Inverse Konzentrationskurve zur Bestimmung der Konzentration der freigesetzten Hyaluronsäure. Die y-Achse zeigt die Konzentration (ng/ml), die x-Achse die Absorption. 69

Abbildung 14 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten OssixPlus Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BMP-4, b-NGF, EGF R, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ . 70

Abbildung 15 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten OssixPlus Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, GDF-15, GH, HB-EGF, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 71

Abbildung 16 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten DynaMatrix Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, GDF 15, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 72

Abbildung 17 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten DynaMatrix Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, bFGF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 73

Abbildung 18 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten BioMend Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, GDF-15, GDNF, GH, HB-EGF, HGF, IGFBP-1, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, Insulin, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 74

Abbildung 19 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten BioMend Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration

der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGF-I, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 75

Abbildung 20 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der ersten BioGide Membran. Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, EG-VEGF, FGF-4, GDF-15, GH, HB-EGF, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, MCF R, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 76

Abbildung 21 Konzentration der untersuchten Wachstumsfaktoren im Eluat der zweiten BioGide Membran . Die y-Achse zeigt die Konzentration der Faktoren (pg/ $\mu$ g), die x-Achse die untersuchten Wachstumsfaktoren. Nachgewiesen wurden: AR, BDNF, BMP-4, BMP-5, b-NGF, EGF R, GDF-15, HB-EGF, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, Insulin, NT-3, NT-4, PDGF-AA, SCF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 3. 77

## 8. Literaturverzeichnis

- Aghaloo TL, Moy PK (2007). Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants*; 22 Suppl:49-70.
- Albrektsson T, Johansson C (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*; 10:96-101.
- An YZ, Heo YK, Lee JS, Jung UW, Choi SH (2017). Dehydrothermally Cross-Linked Collagen Membrane with a Bone Graft Improves Bone Regeneration in a Rat Calvarial Defect Model. *Materials*; 10(8):927.
- Bartee BK (1995). The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent*; 4:21-6.
- Baussmerth C (2014). Molekularbiologische und biochemische Nachweismethoden des Tuberkulose- Komplexes aus Blut und klinischem Material. URL: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:gbv:46-00104619-10> (Zugriff am 12.05.2019).
- Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, Sanchez R (1992). A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor -I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*; 63(11):929-40.
- Becker W, Dahlin C, Lekholm U, Bergstrom C, van Steenberghe D, Higuchi K, Becker BE (1999). Five-Year Evaluation of Implants Placed at Extraction and with Dehiscences and Fenestration Defects Augmented with ePTFE Membranes: Results from a Prospective Multicenter Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*; 1(1):27-32.
- Bergsma EJ, Rozema FR, Bos RRM, Bruijn WCD (1993). Foreign body reactions to resorbable poly(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 51(6):666-670.

- Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R (2003). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp. Cell Res*; 287:98-105.
- Black BS, Gher ME, Sandifer JB, Fucini SE, Richardson AC (1994). Comparative Study of Collagen and Expanded Polytetrafluoroethylene Membranes in the Treatment of Human Class II Furcation Defects. *Journal of Periodontology*; 65(6):598-604.
- Bonassar LJ, Vacanti CA (1998). Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl*; 30-31:297-303.
- Boonen S, Aerssens J, Dequeker J, Nicholson P, Cheng X-G, Lowet G, Verbeke G, Bouillon R (1997). Age-Associated Decline in Human Femoral Neck Cortical and Trabecular Content of Insulin-Like Growth Factor I: Potential Implications for Age-Related (Type II) Osteoporotic Fracture Occurrence. *Calcified Tissue International*; 61(3):173-178.
- Bornstein MM, Bosshardt D, Buser D (2007). Effect of Two Different Bioabsorbable Collagen Membranes on Guided Bone Regeneration: A Comparative Histomorphometric Study in the Dog Mandible. *Journal of Periodontology*; 78(10):1943-1953.
- Bornstein MM, Bosshardt D, Buser D (2007). Effect of Two Different Bioabsorbable Collagen Membranes on Guided Bone Regeneration: A Comparative Histomorphometric Study in the Dog Mandible. *Journal of Periodontology*; 78(10):1943-1953.
- Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S (1996). Regeneration of Rat Calvarial Defects Using a Bioabsorbable Membrane Technique: Influence of Collagen Cross-linking. *Journal of Periodontology*; 67(12):1342-1348.
- Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC (1999). Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol 2000*; 19:151-63.
- Buser D (2010). *Membrangeschützte Knochenregeneration in der Implantologie*. Quintessenz-Verlag.
- Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC, Sanchez R (1994). Guided Tissue Regeneration: Comparison of Bioabsorbable and Non-Bioabsorbable Membranes. Histologic and Histometric Study in Dogs. *Journal of Periodontology*; 65(6):583-591.

- Caton J, Nyman S (1980). Histometric evaluation of periodontal surgery. I. The modified Widman flap procedure. *Journal of Clinical Periodontology*; 7(3):212-223.
- Chan BP, Chan KM, Maffulli N, Webb S, Lee KK (1997). Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*; 239-247.
- Chan BP, Fu SC, Qin L, Rolf C, Chan KM (1998). Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing: an animal study. *J Orthop*; 16:597-603.
- Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K (2000). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand*; 71:513-518.
- Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC (1998). Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *J Hand Surg Am*; 23:1052-1058.
- Christgau M, Moder D, Hiller KA, Dada A, Schmitz G, Schmalz G (2006). Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. *J Clin Periodontol*; 33(11):837-45.
- Claffey N, Motsinger S, Ambruster J, Egelberg J (1989). Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *J Clin Periodontol*; 16(1):12-6.
- Claffey KP, Abrams K, Shih S-C, Brown LF, Mullen A, Keough M (2001). Fibroblast Growth Factor 2 Activation of Stromal Cell Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis. *Lab Invest*; 81(1):61-75.
- Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*; 81(5):672-6.
- Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S (1990). Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*; 24(1):13-9.
- Dahlin C, Alberius P, Linde A (1991). Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery*; 74(3):487-491.

- Dahlin C, Sandberg E, Alberius P, Linde A (1994). Restoration of mandibular nonunion bone defects: An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 23(4):237-242.
- Dannan A (2009). Dental-derived Stem Cells and whole Tooth Regeneration: An Overview. *J Clin Med Res*; 1(2):63-71.
- David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol JP (2008). Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen*; 16(2):274-87.
- Dehnavi SS, Mehdikhani M, Rafienia M, Bonakdar, S (2018). Preparation and in vitro evaluation of polycaprolactone/PEG/bioactive glass nanopowder nanocomposite membranes for GTR/GBR applications. *Elsevier*; Volume 90:236-247.
- De la Fuente SG, Gottfried MR, Curtis Lawson D, Harris MB, Mantyh CR, Pappas TN (2003). Evaluation of porcine-derived small intestine submucosa as a biodegradable graft for gastrointestinal healing. *The Society for Surgery of the Alimentary Tract*: Volume 7:96-101.
- De la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA (2003). Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid. Inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am. J. Pathol.* 163:121-133.
- Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV (2012). The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*; 10:81.
- Docheva D, Padula D, Popov C, Weishaupt P, Pragert M, Miosge N, Hickel R, Bocker W, Clausen-Schaumann H, Schieker M (2010). Establishment of immortalized periodontal ligament progenitor cell line and its behavioural analysis on smooth and rough titanium surface. *Eur Cell Mater*; 19:228-41.
- Donos N, Kostopoulos L, Karring T (2002). Augmentation of the mandible with GTR and onlay cortical bone grafting. An experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*; 13(2):175-84.



- Ebel C (2006). Der Einfluss des Implantatlagers auf die Erfolgsquote enossaler Implantate – Eine Nachuntersuchung des betreffenden Patientenkollektivs mit BoneLock®- Implantaten an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Würzburg. Med. Diss.; Würzburg.
- Eickhoff M (2005). Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde bei Klein- und Heimtieren. Enke.
- Folkman J, Klagsbrun M (1987a). Angiogenic factors. *Science*; 235:442-447.
- Folkman J, Klagsbrun M (1987b). Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*; 329:671-672.
- Friedmann A, Strietzel FP, Marezki B, Pitaru S, Bernimoulin JP (2002). Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clin Oral Implants Res*; 13(6):587-94.
- Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A (2008). Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*; 215(3):743-9.
- Fujioka-Kobayashi M, Müller HD, Lussi A, Sculean A, Schmidlin PR, Miron RJ (2017). In vitro effects of hyaluronic acid on human periodontal ligament cells. *BMC Oral Health*;17(1):44.
- Fukui N, Katsuragawa Y, Sakai H, Oda H, Nakamura K (1998). Effect of local application of basic fibroblast growth factor on ligament healing in rabbits. *Rev Rhum Engl Ed*; 65:406-414.
- Gao F, Liu Y, He Y, Yang C, Wang Y, Shi X, Wei G (2010). Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biol*; 29(2):107-16.
- Garcia JJ, Berghezan S, Caramês JM, Dard MM, Marques DN (2017). Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on bone: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*; 52(6):955-964.
- Geistlich, in: <https://www.geistlich.de/de/dental/membranen/bio-gide/produktlinie/>  
Zugriff am 01.06.2017.
- Ghensi P, Stablum W, Bettio E, Soldini M, Tripi T, Soldini C (2017). Management of the exposure of a dense PTFE (d-PTFE) membrane in guided bone regeneration (GBR): a case report. *Oral Implantol*; 10(3):335-342.

- Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR (2008). Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Implants Res*; 19(5):516-21.
- Gotfredsen K, Nimb L, Hjørting-hansen E (1994). Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910. An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*; 5(2):83-91.
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J (1984). New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*; 11(8):494-503.
- Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Ruter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*; 84-a(12):2123-34.
- Greenstein G, Caton JG (1993). Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. *Periodontology 2000*; 1(1):36-45.
- Gu H, Huang L, Wong YP, Burd A (2010). HA modulation of epidermal morphogenesis in an organotypic keratinocyte-fibroblast co-culture model. *Exp Dermatol*; 19(8):e336-339.
- Günther KP, Scharf H-P, Pesch H-J, Puhl W: Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. Tierexperimentelle Untersuchung. *Der Orthopäde* 2: 105-117 (1998).
- Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ (1995). Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 53(2):167-174.

- Hämmerle CH, Jung RE (2003). Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol* 2000; 33:36-53.
- Hanel KC, McCabe C, Abbott WM, Fallon J, Megerman J (1982). Current PTFE grafts: a biomechanical, scanning electron, and light microscopic evaluation. *Annals of Surgery*; 195(4):456-463.
- Haney JM, Nilvéus RE, McMillan PJ, Wikesjö UME (1993). Periodontal Repair in Dogs: Expanded Polytetrafluoroethylene Barrier Membranes Support Wound Stabilization and Enhance Bone Regeneration. *Journal of Periodontology*; 64(9):883-890.
- Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, Krettek C, Van Griensven M (2005). Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng*; 11:41-49.
- Hardwick R, Scantlebury TV, Sanchez R, Whitley N, Ambruster J (1994). Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, eds. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Chicago, Berlin: Quintessenz; 101-136.
- Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, Rassow J (2012). *Duale Reihe Biochemie*. Thieme.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T (2013). *Einführung in die Zahnerhaltung*. Köln: Zahnärztl. Verlag.
- Hempel U, Moller S, Noack C, Hintze V, Scharnweber D, Schnabelrauch D, Dieter P (2012). Sulfated hyaluronan/ collagen I matrices enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in vitro even in the absence of dexamethasone. *Acta Biomater*; 8(11).
- Herrmann S (2015). *Quantifizierung von Wachstumsfaktoren in Bohrmehl, Beckenkamm-Spongiosa, Platelet Poor und Platelet Rich Plasma*. Freie Universität Berlin.
- Herten M, Jung RE, Ferrari D, Rothamel D, Golubovic V, Molenberg A, Hämmerle CHF, Becker J, Schwarz F (2009). Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: an immunohistochemical study in rats. *Clinical Oral Implants Research*; 20(2):116-125.

- Hessling VH (2016). Entwicklung einer Multiplex-PCR zum Nachweis ausgewählter europäischer Nutztiere in der forensischen Genetik. URL: <https://d-nb.info/1153768577/34>.
- Hisada N, Satsu H, Mori A, Totsuka M, Kamei J, Nozawa T, Shimizu M (2008). Low-molecular-weight hyaluronan permeates through human intestinal Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Biosci Biotechnol Biochem*; 72:1111-1114.
- Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF (2001). Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium*; 8(1):11-24.
- Hodde J, Janis A, Ernst D, Zopf D, Sherman D, Johnson C (2007). Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. *J Mater Sci Mater Med*; 18(4):537-43.
- Hofmann A (2016). Biomechanische Analyse nach Achillessehnenheilung durch bFGF-transduzierte Stammzellen im Langzeitversuch an der Ratte.
- Hogan BL (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*; 10(13):1580-94.
- Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM (2000). Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontology*; 59:203-227.
- Ichikawa Y, Noishiki Y, Kosuge T, Yamamoto K, Kondo J, Matsumoto A (1997). Use of a bovine jugular vein graft with natural valve for right ventricular outflow tract reconstruction: A one-year animal study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*; 2(114):224-233.
- Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A (2004). Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*; 83(8):590-5.
- James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008). Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am*; 33(1):102-12.
- Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Gocke R (2003). Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol*; 30(2):159-64.
- Jonsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO (2011). The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontal Res*; 46(2):153-7.

- Jorge-Herrero E, Fernández P, Turnay J, Olmo N, Calero P, García R, Freile I, Castillo-Olivares JL (1999). Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*; 6(20):539-545.
- Jorge-Herrero E, Fonseca C, Barge AP, Turnay J, Olmo N, Fernández P, Lizarbe MA, Garcia Paez JM (2010). Biocompatibility and calcification of bovine pericardium employed for the construction of cardiac bioprostheses treated with different chemical crosslink methods. *Artif Organs*; 34(5):E168-76.
- Jung RE, Hälg GA, Thoma DS, Hämmerle CH (2009). A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. *Clin Oral Implants Res*; 20(2):162-8.
- Kalen A, Wahlstrom O, Linder CH, Magnusson P (2008). The content of bone morphogenetic proteins in platelets varies greatly between different platelet donors. *Biochem Biophys Res Commun*; 375(2):261-4.
- Kaneko K, Higuchi C, Kunugiza Y, Yoshida K, Sakai T, Yoshikawa H, Nakata K (2015). Hyaluronan inhibits BMP-induced osteoblast differentiation. *FEBS Lett*; 589(4):447-454.
- Kapp H, Smola H (2006). Regulation der Wundheilung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine. *HARTMANN WundForum*; 1:8.
- Karring T, Nyman S, Lindhe J (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *Journal of Clinical Periodontology*; 7(2):96-105.
- Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J (1985). New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *Journal of Clinical Periodontology*; 12(1):51-60.
- Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H (2004). Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*; 75(9):1281-7.
- Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H (2003). Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*; 74(6):858-64.
- Keystone Dental, in <http://www.keystonedental.com/dynamatrix>; Zugriff am 01.06.2017.

- Khan WS, Rayan F, Dhinsa BS, Marsh D (2012). An Osteoconductive, Osteoinductive, and Osteogenic Tissue-Engineered Product for Trauma and Orthopaedic Surgery: How Far Are We?. *Stem Cells International*; Article ID 236231, 7 pages.
- Knudson CB, Toole BP (1985). Changes in pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Devel. Biol.*; 112:308-318.
- Kostopoulos L, Karring T (1994a). Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clinical Oral Implants Research*; 5(2):66-74.
- Kostopoulos L, Karring T (1994b). Augmentation of the rat mandible using the principle of guided tissue regeneration. *Clinical Oral Implants Research*; 5(2): 75-82.
- Kraus TM, Imhoff FB, Wexel G, Wolf A, Hirsch D, Lenz L, Stöckle U, Buchmann S, Tischer T, Imhoff AB, Milz S, Anton M, Vogt S (2014). Stem cells and basic fibroblast growth factor failed to improve tendon healing: an in vivo study using lentiviral gene transfer in a rat model. *J Bone Joint Surg*; 96:761-769.
- Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science*; 260(5110):920-926.
- Laurent TC, Fraser JR (1992). Hyaluronan. *Faseb J*; 6(7):2397-404.
- Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR (1995). Functions of hyaluronan. *Annals of the Rheumatic Diseases*; 54(5):429-432.
- Lawrence WT, Diegelmann RF (1994). Growth factor in wound healing. *Clin. Dermatology*; 12:157.
- Lee JY, Lee J, Kim YK (2013). Comparative analysis of guided bone regeneration using autogenous tooth bone graft material with and without resorbable membrane; *Journal of Dental Sciences*; 8(3):281-286.
- Lee JH (2015). Development of osteoconductive and osteoinductive bone healing materials. *Bone Abstract*; 5:SS4.3.
- Lee SJ, Park YJ, Park SN, Lee YM, Seol YJ, Ku Y, Chung CP (2001). Molded porous poly (L-lactide) membranes for guided bone regeneration with enhanced effects by controlled growth factor release. *J Biomed Mater Res*; 55(3):295-303.
- Linde A, Hedner E (1995). Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int*; 56(6):549-53.

- Linhart W, Meenen NM, Rueger JM. Knochenersatzmaterialien: Neue Möglichkeiten und Techniken. *OP-Journal* 2000; (16):294-300.
- Liu J, Kerns DG (2014). Mechanism of Guided Bone Regeneration: A Review. *The Open Dentistry Journal*; 8:56-65.
- Liu Q, Humpe A, Kletsas D, Warnke F, Becker ST, Douglas T, Sivananthan S, Warnke PH (2001). Proliferation assessment of primary human mesenchymal stem cells on collagen membranes for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*; 26(5):1004-1010.
- Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*; 26(4):1065-73.
- Lundgren D, Sennerby L, Falk H, Friberg B, Nyman S (1994). The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. Case reports. *Clinical Oral Implants Research*; 5(3):177-184.
- Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN (1991). The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*; 62(7):458-67.
- Macke S (2000). Klinischer Vergleich von GTR-behandelten Patienten mit vertikalen Defekten: Vergleich verschiedener resorbierbarer Membranen. Tectum-Verlag.
- Magnusson I, Batich C, Collins BR (1988). New Attachment Formation Following Controlled Tissue Regeneration Using Biodegradable Membranes. *Journal of Periodontology*; 59(1):1-6.
- Marinucci L, Lilli C, Guerra M, Belcastro S, Becchetti E, Stabellini G, Calvi E, Locci P (2003). Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: an in vitro study. *J Biomed Res A*; 67(2):504-9.
- Matzen M, Kostopoulos L, Karring T (1996). Healing of osseous submucous cleft palates with guided bone regeneration. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*; 30:161-167.
- McDevitt CA, Wildey GM, Cutrone RM (2003). Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J Biomed Mater Res A*; 67(2):637-40.

- Melcher A, Bowen WH (1969). *Biology of the Periodontium*.
- Meyer K, Palmer JW (1934). THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. *Journal of Biological Chemistry*; 107(3):629-634.
- Molloy T, Wang Y, Murrell G (2003). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.*; 33:381-394.
- Moseley R, Waddington RJ, Embery G (2002). Hyaluronan and its potential role in periodontal healing. *Dent Update*; 29(3):144-8.
- Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE (2005). Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Implants Res*; 16(2):210-9.
- Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H (1999). Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*; 34(7):425-430.
- Myint P, Deeble DJ, Beaumont PC, Blake SM, Phillips GO (1987). The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid: steady-state and pulse radiolysis studies. *Biochim Biophys Acta*; 925(2):194-202.
- Nanci A, Bosshardt DD (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease\*. *Periodontology 2000*; 40(1):11-28.
- Nihsen ES, Johnson CE, Hiles MC (2008). Bioactivity of small intestinal submucosa and oxidized regenerated cellulose/collagen. *Adv Skin Wound Care*; 10(21):479-68.
- Nogami H, Urist MR (1975). Transmembrane bone matrix gelatin-induced differentiation of bone. *Calcif Tissue Res*; 19(2):153-63.
- Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S (1980). Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*; 7(5):394-401.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J (1982a). The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*; 9(3):257-65.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H (1982b). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*; 9(4):290-6.
- Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H (2003). Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth



- factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*; 74(6):849-57.
- Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, ten Dijke P, Sakou T (1998). Distinct and Overlapping Patterns of Localization of Bone Morphogenetic Protein (BMP) family Members and a BMP Type II Receptor During Fracture Healing in Rats. *Bone*; 22(6):605-612.
- Ornitz DM, Itoh N (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol*; 2(3):reviews 3005.1-reviews3005.12.
- Park JY, Jeon SH, Choung PH (2011). Efficacy of Periodontal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Advanced Periodontitis. *Cell Transplantation*; 20(2):271-285.
- Petersen W, Pufe T, Unterhauser F, Zantop T, Mentlein R, Weiler A (2003). The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg*; 123(9):475-80.
- Petry AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*. 2014 Mar 11;5:101.
- Pietrzak WS, Woodell-May J, McDonald N (2006). Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg*; 17(1):84-90.
- Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A, Bernard GW (1999). Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol*; 70(4):370-4.
- Pistorius A, Martin M, Willershausen B, Rockmann P (2005). The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. *Quintessence Int*; 36(7-8):531-8.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284(5411):143-7.
- Powell JD, Horton MR (2005). Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol. Res.*;31:207-218.
- P+W Medizintechnik (2012), Platz & Co Handels GmbH. Medizin-Labor-Umwelttechnik. URL: <http://www.medizintechnik-pw.de/images/thumbnail/produkte/xlarge/Art11424.jpg> (Zugriff am 12.05.2019).

- Quteish D, Dolby AE (1992). The use of irradiated-crosslinked human collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*; 19(7):476-84.
- Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K (2013). Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research*; 57:3-14.
- Rao SM, Ugale GM, Warad SB (2013). Bone Morphogenetic Proteins: Periodontal Regeneration. *North American Journal of Medical Sciences*; 5(3):161-168.
- RayBiotech (2007-2019). Quantibody Multiplex ELISA Array. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf> (Zugriff am 12.05.2019).
- Roche Applied Sciences (2011). URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf> (Zugriff am 12.05.2019).
- Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J (2004). Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res*; 15(4):443-9.
- Rothamel D, Benner M, Fienitz T, Happe A, Kreppel M, Nickenig HJ, Zöller JE (2014). Biodegradation pattern and tissue integration of native and cross-linked porcine collagen soft tissue augmentation matrices- an experimental study in the rat. *Head Face Med*; 10:10.
- Sanchez-Lara PA, Warburton D (2013). Impact of stem cells in craniofacial regenerative medicine. *Front Physiol*; 3(188).
- Sasaki T, Watanabe C (1995). Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*; 16(1):9-15.
- Scantlebury TV (1993). 1982-1992: A Decade of Technology Development for Guided Tissue Regeneration. *Journal of Periodontology*; 64(11s):1129-1137.
- Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD (1998). Ability of Commercial Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft to Induce New Bone Formation Is Dependent on Donor Age But Not Gender. *Journal of Periodontology*; 69(4):470-478.
- Scott A, Lian Ø, Bahr R, Hart DA, Duronio V (2008). VEGF Expression in Patellar Tendinopathy: A Preliminary Study. *Clin Orthop Relat Res*; 466(7):1598-604.

- Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain ADH, Wikesjö UME, Nilvúus RE (1992). Regenerative Surgery of Intrabony Periodontal Defects Using ePTFE Barrier Membranes: Scanning Electron Microscopic Evaluation of Retrieved Membranes Versus Clinical Healing. *Journal of Periodontology*; 63(12):974-978.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*; 364(9429):149-55.
- Shapiro E, Grande D, Drakos M (2015). Biologics in Achilles tendon healing and repair: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*; 8(1):9-17.
- Sheikh Z, Abdallah M, Hamdan N, Javaid M, Khurshid Z, Matilinna K (2014). Barrier membranes for tissue regeneration and bone augmentation techniques in dentistry. Matilinna J, ed. *Handbook of oral biomaterials*; Singapore: Pan Stanfors Publishing: 605-636.
- Shi L, Ronfard V (2013). Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *International Journal of Burn and Trauma*; 3(4):173-179.
- Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE (1998). Creation Of Viable Pulmonary Artery Autografts Through Tissue Engineering. *The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery*; 45:536-545.
- Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Current Opinion in Cell Biology*; 6:726-733.
- Shimazu A, Morishita M (2003). Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Periodont Res*; 38:122-129.
- Shu K, Manabe Y, Hatori Y, Sugawara T (2016). Effect of Dietary Low-molecular-weight Hyaluronic Acid on Ear Swelling in 2,4-Dinitro-1-fluorobenzene-treated BALB/y Mice. *Trace Nutrients Research*; 33:100-105.
- Shu C, Smith SM, Little CB, Melrose J (2016). Use of FGF-2 and FGF-18 to direct bone marrow stromal stem cells to chondrogenic and osteogenic lineages. *Future Sci OA*; 4(2): FSO142.

- Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjo UM (1995). Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*; 66(2):131-8.
- Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D (1994). A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent*; 14(2):166-80.
- Simion M, Maglione M, Iamoni F, Scarano A, Piattelli A, Salvato A (1997). Bacterial penetration through Resolut resorbable membrane in vitro. An histological and scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res*; 8(1):23-31.
- Smeets R, Kolk A (2010). Osteokonduktive und –induktive Knochenersatzmaterialien, in: [https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/implantologie/story/osteokonduktive-und--induktive-knochenersatzmaterialien\\_\\_271.html](https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/implantologie/story/osteokonduktive-und--induktive-knochenersatzmaterialien__271.html); Zugriff am 27.05.2017.
- Soheilifar S, Soheilifar S, Bidgoli M, Torkzaban P (2014). Barrier Membrane, a Device for Regeneration: Properties and Applications. *Avicenna Journal of Dental Research*; 6(2):e21343.
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005). FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol*; 203:398-409.
- Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J (1980). Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*; 14(6):753-764.
- Spinell T, Saliter J, Hackl B, Unger K, Hickel R, Folwaczny M (2019). In-vitro cytocompatibility and growth factor content of GBR/GTR membranes. *Dent Mater*; pii: S0109-5641(18)30738-3.
- Stancu IC, Lunu A, Iovu H (2014). Hydrogels for bone regeneration. *Biomaterials for Bone Regeneration*; Volume 3:62-86.
- Takata T, Wang HL, Miyauchi M (2001). Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Clin Oral Implants Res*; 12(4):332-8.
- Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H (1997). Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.*; 32(8):667-675.
- Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, Iwata T, Matsuda S, Kawahara K, Kawaguchi H, et al. (2011). Characteristics of high-molecular-

- weight hyaluronic acid as a brain-derived neurotrophic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng A*; 17(7-8):955-967.
- Tammi R, Tammi M, Hakkinen L, Larjava H (1990). Histochemical localization of hyaluronate in human oral epithelium using a specific hyaluronate-binding probe. *Arch Oral Biol*; 35(3):219-24.
- Tan ZI, Gong P, Zhao Q (2005). Influence of basic fibroblast growth factors on the migration, proliferation of osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts. *West China journal of stomatology*; 23(3):201-203.
- Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjö UME (1999). Devices for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*; 19(1):59-73.
- Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC (2000). Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol.*; 165:1863-1870.
- Toole BP, Wight TN, Tammi MI (2002). Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem*; 277(7):4593-6.
- Toole BP (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev*; 4:528-539.
- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y (2001). Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 288:413-419.
- Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF (1997). Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*; 67(4):478-91.
- Wallace DG, Cruise GM, Rhee WM, Schroeder JA, Prior JJ, Ju J, Maroney M, Duronio J, Ngo MH, Estridge T, Coker GC (2001). A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol. *Journal of Biomedical Materials Research*; 58(5):545-555.
- Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87(6):2220-4.

- Wang HL, Miyauchi M, Takata T (2002). Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study. *J Periodontal Res*; 37(5):340-4.
- Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, Wie J (2016). Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers*; 8(4)115.
- Wehrhan F, Nkenke E, Srour S, Schlegel A (2008), Knochenersatzmaterialien, Biologischer Hintergrund und klinische Evidenz, in [http://www.zm-online.de/hefte/Knochenersatzmaterialien\\_25504.html#1](http://www.zm-online.de/hefte/Knochenersatzmaterialien_25504.html#1); Zugriff am 27.06.2017.
- Weibric G, Buch RS, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W (2002). Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors*; 20(2):93-7.
- Weitzhandler M, Bernfield MR (1992). Proteoglycan Conjugates. In: Cohen IK, Diegelmann, RF, Lindblad, WJ, (eds.). *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Saunders; 195-208.
- West DC, Kumar S (1989). The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res*; 183(1):179-96.
- Whitby DJ, Ferguson MWJ (1992). Immunohistochemical studies of the extrazellular matrix and soluble growth factors in fetal and adult wound healing. In: Adzick, N.S., Longaker, M.T, (eds.). *Fetal wound healing*. Elsevier; 161-179.
- Wiebe D, Megerman J, L'Italien GJ, Abbott WM (1988). Glutaraldehyde release from vascular prostheses of biologic origin. *Surgery*; 104(1):26-33.
- Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, Haas NP, Schmidmaier G (2007). Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank*; 8(2):107-14.
- Williams DF (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*; 29(20):2941-2953.
- Winn SR, Uludag H, Hollinger JO (1998). Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 31(3):303-318.
- Wozney JM (2002). Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976)*; 27(16 Suppl 1):2-8.

- Xie B, Tassi E, Swift MR, McDonnell K, Bowden ET, Wang S, Ueda Y, Tomita Y, Riegel AT, Wellstein A (2006). Identification of the fibroblast growth factor (FGF)-interacting domain in a secreted FGF-binding protein by phage display. *J Biol Chem*; 281(2):1137-44.
- Ying C, Xin Q, Lisha B, Zhongxin X, Hong Y (2005). Biological features of hMSC and effects of bFGF on its proliferation; 31(1):48-51.
- Younger EM, Chapman MW (1989). Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*; 3(3):192-5.
- Zaragosi LE, Alihaud G, Dani C (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem cells*; 24: 2412-2419.
- Zellin G, Gritli-linde A, Linde A (1995). Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials*; 16(8):601-609.
- Zhao N, Wang X, Qin L, Zhai M, Yuan J, Chen J, Li D (2016). Effect of hyaluronic acid in bone formation and its applications in dentistry. *J Biomed Mater Res A*; 104(6):1560-9.
- Zimmerdental, in: <http://www.zimmerdental.de/medizinischer-fachbereich/produkte-loesungen/regenerative-loesungen/membranen/biomendbiomend-extend/>, Zugriff am 01.06.2017.
- Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, Bunger C. Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro. *J Orthop Res*. 2008; 26(5):713-720.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller notwendigen Mittel zur Durchführung der Versuche, sowie die schnelle Korrektur der Arbeit danken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit, in seinem Hause promovieren zu dürfen.

Herrn Dr. Thomas Spinell möchte ich ganz besonders für die fachlich und menschlich ausgezeichnete Betreuung danken. Er war mir sowohl durch seine unterstützende Anleitung im Labor, als auch bei der Erarbeitung der benötigten Daten eine große Hilfe. Auch für den hohen persönlichen Einsatz, das Beantworten aller Fragen und die konstruktiven Vorschläge und Ideen nach Durchsicht meiner Dissertation, bedanke ich mich herzlich.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie für die emotionale Unterstützung während meines Studiums und im Speziellen während der Arbeit an meiner Dissertation bedanken. Sie haben mich immer ermutigt, niemals aufzugeben. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Bruder David Saliter für die Hilfe bei jeglichen technischen Herausforderungen beim Erstellen dieser Arbeit.



# 10. Eidesstattliche Versicherung

Saliter, Julia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Einfluss von quervernetzten und nicht quervernetzten xenogenen Barrieremembranen auf die Proliferation von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und immortalisierten multipotenten parodontalen Ligamentzellen (PDL-hTERT)“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Mühldorf, 13.05.2019

Julia Saliter