

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert R. Kübler

**Evaluierung der Biokompatibilität unterschiedlicher
Membranoberflächen mit humanen unrestringierten
somatischen Stammzellen und humanen Osteoblasten.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Felix Alfons Hans-Christian Paulßen von Beck

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Handschel

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Frank Schwarz

Tag der Disputation: 22.02.2018

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Naujoks C, Von Beck FP, Langenbach F, Hentschel M, Berr K, Hofer M, Depprich R, Kübler N, Handschel J. Biocompatibility of membranes with unrestricted somatic stem cells. *In Vivo*. 2013; 27(1): 41-47.

SUMMARY

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the best biocompatibility of six commercially available membranes (Bio-Gide[®], RESODONT[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™], GENTA-FOIL resorb[®] and GORE-TEX[®]) after the cultivation with human, osteogenic stimulated unrestricted somatic stem cells (USSC) and human osteoblasts (HOB). The attachment and proliferation (CyQuant[®] Cell Proliferation Assay Kit), the vitality of the cells (CellTiter Blue[®] Cell Viability Assay) as well as in the cell culture presented cytotoxicity (CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay) were investigated. The latter was determined in the Bio-Gide[®]-, RESODONT[®]-, GENTA-FOIL resorb[®]- and GORE-TEX[®]-cultures. A standard cell culture surface served as a control. In addition, the native and cultured membranes were analyzed in a scanning electron microscope (REM).

Compared with the USSC, the HOB reached significantly higher attachment on all tested membranes. This indicates an initially better adaptability of the HOB to the respective membrane surface. Bio-Gide[®] and RESODONT[®] proved to be the most suitable for the attachment of USSC and HOB. Between day 1 and 7, the USSC showed on Bio-Gide[®] a better proliferation than the HOB. Both cell types achieved a significant rise of the cell count only on Bio-Gide[®] and RESODONT[®]. Thus, these two membranes provide among the six tested membranes the best growth conditions for the cultivation of USSC and HOB.

After the attachment, the majority of the USSC and HOB on Bio-Gide[®] were significantly more vital. During the attachment, Bio-Gide[®] provides the best cultivation conditions for both cell types. On day 3 and 7, the vitality of the USSC on Bio-Gide[®] was significantly higher, followed by RESODONT[®]. In the HOB-membrane cultures, this was shown in the opposite order. Bio-Gide[®] and RESODONT[®] again showed the best conditions for cultivating USSC and HOB.

In comparison to the USSC-membrane cultures, all HOB-membrane cultures showed significantly lower cytotoxicities on day 3 and 7. This suggests an improved resistance of the HOB in comparison to the USSC. On day 3, the lowest cytotoxicity among the USSC-membrane cultures was found in the GORE-TEX[®]-culture and among the HOB-membrane cultures in the Bio-Gide[®]-culture. Four days later, this was independent of the cell type in the GENTA-FOIL resorb[®]-cultures.

Native Bio-Gide[®] has one-sided an extremely fibrous surface with loose collagen fibers, while the other collagen membranes present a mostly smooth surface. The native, mostly smooth surface of GORE-TEX[®] partially contains regions of parallel, collagen-like PTFE fibers. During the complete 7 days cultivation, Bio-Gide[®] retained its fibrous surface structure. In this period, RESODONT[®] and GENTA-FOIL resorb[®] showed a change in the surface structure from smooth to rough, while no surface changes were witnessed in BioMend[®] and BioMend[®] Extend[™] as well

as GORE-TEX®. During the cultivation on Bio-Gide® and RESODONT®, the USSC formed long cytoplasmatic extensions, which accumulated to collagen fibers. The HOB on Bio-Gide® showed a similar picture. On the remaining collagen membranes, only a few, considerably smaller cells with a predominantly round shape and short cytoplasmatic extensions were detectable.

In conclusion, Bio-Gide® and RESODONT® showed among the tested membranes the best biocompatibility in the *in vitro* cultivation of USSC and HOB. Nevertheless, these results can only be applied limitedly to a possible *in vivo* use and first have to prove themselves in a living organism. Especially in oral and maxillofacial surgery, the use of osteogenic stimulated stem cells in combination with biomembranes already plays an important role in bony wound healing. With regard to the *tissue engineering* (TE) of bone, they could be important in the near future as *scaffolds* to reduce the number of necessary autologous bone grafts.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>EINLEITUNG</i>	1
1.1	Rolle von Stammzellen in der regenerativen Medizin	3
1.1.1	unrestringierte somatische Stammzellen	5
1.2	humane Osteoblasten	7
1.3	Membranen	7
1.4	<i>guided tissue regeneration/guided bone regeneration</i>	10
1.5	Ziel der wissenschaftlichen Arbeit	11
2	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	12
2.1	Materialien und Geräte	12
2.1.1	Medien, Enzyme und Puffer für die Zellkultivierung	12
2.1.2	Chemikalien	12
2.1.3	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.4	Test-Kits/Enzymassays	14
2.2	Zellarten und Zelllinien	14
2.3	Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze	15
2.3.1	USSC-Nährmedium	15
2.3.2	USSC-Differenzierungsmedium (DAG)	15
2.3.3	HOB-Nährmedium	16
2.3.4	Trypsin	16
2.3.5	Einfríermedium	16
2.4	Anlage der Zellkulturen	16
2.4.1	Auftauen und Kultivierung der Zellen	16
2.4.2	Spaltung der Zellen.....	17
2.4.3	Bestimmung der Zellzahl	18
2.4.4	Kryokonservierung der Zellen.....	18
2.5	verwendete Membranen	18
2.5.1	Bio-Gide®	19
2.5.2	RESODONT®	19
2.5.3	GENTA-FOIL resorb®	20
2.5.4	BioMend® und BioMend® Extend™	20
2.5.5	GORE-TEX®	21
2.5.6	Überblick der verwendeten Membranen	22
2.6	Versuchsablauf	23
2.6.1	Zuschnitt der Membranen	23
2.6.2	Befüllung der Well-Platten.....	23
2.6.3	Zellaussaat.....	25
2.6.4	Platten- und Mediumwechsel	25
2.6.5	Probennahme, Einfrieren und Fixieren der Membranen	25
2.7	Testverfahren	26
2.7.1	Bestimmung der Zellzahl in den Kulturen	26
2.7.1.1	Erstellung der Kalibriergeraden und Ermittlung der Zellzahl.....	26
2.7.1.2	Berechnung der relativen Zellproliferation.....	27
2.7.2	Bestimmung der Zellvitalität in den Kulturen	28
2.7.2.1	Ermittlung der Vitalität pro Zelle	28
2.7.3	Bestimmung der Zytotoxizität in den Kulturen	28
2.7.4	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	29
2.7.4.1	Fixieren der Membranen mit Glutardialdehyd.....	29
2.7.4.2	Acetonreihe und kritische Punkt-Trocknung	29
2.7.4.3	Sputtern der Membranen	30

3	<i>ERGEBNISSE</i>	31
3.1	Zellproliferation	31
3.1.1	Attachment auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche	31
3.1.2	Proliferationsverhalten auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche	33
3.1.3	Wertigkeitsdiagramm zum Attachment und Proliferationsverhalten	35
3.2	Zellvitalität	36
3.2.1	Zellvitalität auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche	36
3.2.2	Wertigkeitsdiagramm zur Zellvitalität	38
3.2.3	Vitalität pro Zelle auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche	39
3.3	Zytotoxizität	40
3.3.1	zytotoxische Wirkung der Membranoberflächen und der Standardzellkulturoberfläche	41
3.3.2	Wertigkeitsdiagramme zur Zytotoxizität	42
3.4	Membranoberfläche und Zellmorphologie	44
3.4.1	native- und mit USSC besiedelte Membranoberflächen	44
3.4.2	native- und mit HOB besiedelte Membranoberflächen.....	47
3.5	Membranranking	49
4	<i>DISKUSSION</i>	50
4.1	Zellproliferation	50
4.2	Zellvitalität	54
4.3	Zytotoxizität	56
4.4	Membranoberflächen und Zellmorphologie	58
5	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	61
6	<i>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i>	63
7	<i>TABELLENVERZEICHNIS</i>	64
8	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	65
9	<i>DANKSAGUNG</i>	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1:10	im Verhältnis 1 zu 10
%	Prozent
®	registrierte Warenmarke
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3D	dreidimensional
BMP	bone morphogenetic protein
BMP-2	bone morphogenetic protein 2
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CD 34	hämatopoetisches Antigen
CD 45	hämatopoetisches Antigen
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Dexamethason, Ascorbinsäure und β-Glycerophosphat
DFBA	Freeze-Dried Bone Allograft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Em	Emission
ePTFE	expandiertes Polytetrafluorethylen
ESC	embryonale Stammzelle
Ex	Exzitation
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm
GBR	<i>guided bone regeneration</i>
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft
GTR	<i>guided tissue regeneration</i>
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
hESC	humane embryonale Stammzelle
HIV-1	humanes Immundefizienz Virus 1
HLA	humanes Leukozytenantigen
HOB	humaner Osteoblast

iPS	induzierte pluripotente Stammzelle
KGy	Kilogray
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
max.	maximal
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzelle
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoffdioxid
p<0,05	Signifikanzwert
p<0,005	Signifikanzwert
p<0,0005	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Polyglykosid
PLA	Polylaktid
PLA/PGA-co-Polymere	Kombination aus Polylaktid und Polyglykosid
PRF	<i>Platelet Rich Fibrin</i>
PUR	Polyesterurethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
StZG	Stammzellgesetzes
™	unregistrierte Warenmarke
U/min	Umdrehungen pro Minute
USSC	unrestringierte somatische Stammzelle
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 EINLEITUNG

Knochendefekte im Schädel- und Gesichtsbereich stellen meist nicht nur einen funktionell insuffizienten, sondern auch entstellenden Befund dar und verursachen einen hohen Leidensdruck beim Patienten. Operative Versorgungen an menschlichen Schädeln, wie z.B. nach curativer Trepanation, zählen dabei zu den ältesten nachgewiesenen Operationsverfahren der Menschheit überhaupt. Bereits die Inkas führten mit der Einbringung von Muschel- und Kürbisschalen sowie Silber- und Goldplatten in den Defektbereich eine Kranioplastie mittels alloplastischen Materials durch (Courville, 1959; Sanan and Haines, 1997).

Ziel in der heutigen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ist das Erreichen einer möglichst frühzeitigen adäquaten und korrektiven primären Wundheilung. Abhängig von der Defektgröße kommen dabei verschiedenste Verfahren und operative Techniken zum Einsatz. Im Falle großer ossärer Defekte ist jedoch zur knöchernen Wundheilung bzw. Wiederherstellung häufig ein augmentatives Verfahren notwendig.

Gegenwärtig entspricht das autologe Knochentransplantat, das aus dem Beckenkamm, der Fibula, der Tibia oder der Skapula entnommen sein kann, dem „Gold Standard“, da es eine optimale immunologische Toleranz besitzt (Taylor *et al.*, 1975; Riediger, 1988; Papadopoulos *et al.*, 2008). Autologes Knochenmaterial steht jedoch im menschlichen Körper nur begrenzt zur Verfügung. Zusätzlich ist bei dessen Verwendung die postoperative Morbidität an der Entnahmestelle zu berücksichtigen.

Bei anderen Verfahren, wie der *guided tissue regeneration* (GTR) oder *guided bone regeneration* (GBR), wird die Gewebe- bzw. die Knochenregeneration durch eine intraoperativ eingebrachte Membran unterstützt. Im Jahr 1959 beschrieben Hurley *et al.* erstmalig bei einem zugefügten knöchernen Defekt an der Kaninchenwirbelsäule die Nutzung einer Membran zur Verbesserung der Knochenregeneration, welche die Osteogenese von außen schützen sollte. Das Einwachsen von Zellarten wie z.B. Fibroblasten, das die Knochenneubildung negativ beeinflusst, sollte dadurch verhindert werden (Hurley *et al.*, 1959). Ebenso verwendeten Melcher und Dreyer 1962 aus Zelluloseacetat gefertigte Membranen, um das im Defektbereich gebildete Koagel vor äußerem Gewebedruck zu schützen. Gleichzeitig sollen so die Infiltration von schneller proliferierendem und dadurch verdrängend wachsendem angrenzenden Gewebe verhindert und die Osteoneogenese verbessert werden (Melcher and Dreyer, 1962). Das gleiche Verfahren nutzte Macpherson ein Jahr später, indem er ebenfalls Zellulosemembranen zur Knochenregeneration einsetzte (Macpherson, 1963). Die ersten angewandten Barrieremembranen bestanden aus vom menschlichen Körper nicht resorbierbaren Materialien, wie Zelluloseester und Polytetrafluorethylen (Nyman *et al.*, 1982; Gottlow *et al.*, 1984).

Die theoretischen Prinzipien dieser Eingriffe, die heute als GTR bzw. GBR bezeichnet werden, wurden erstmalig von Melcher 1976 vorgestellt (Melcher, 1976). Bei Knochendefekten ist die Technik der GBR hilfreich, um den ossären Mangel unter Nutzung einer Barrieremembran zu beheben. Die GTR beinhaltet die GBR und steht für die Regeneration eines parodontalen Defektes.

Beide Verfahren etablierten sich Ende der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts (Dahlin *et al.*, 1988; Nyman *et al.*, 1990; Buser *et al.*, 1993; Schenk *et al.*, 1994). Eine einfache und flexible Handhabung der verwendeten Membran ist dabei vorteilhaft (Gottlow, 1993). Das Prinzip der GTR und GBR wurde bereits in vielen Studien vorgestellt (Gottlow *et al.*, 1986; Hammerle and Karring, 1998; Hammerle and Lang, 2001).

Die Therapieergebnisse beider Verfahren sind abhängig von den unterschiedlichen Materialeigenschaften der verwendeten Membranen (Schwarz *et al.*, 2006). Idealerweise sollte die eingebrachte Membran biokompatibel sein, die Nähr- und Sauerstoffversorgung der eingeschlossenen Zellen gewährleisten sowie die Revaskularisierung des Defektbereiches fördern (Rothamel *et al.*, 2005).

Heute werden überwiegend resorbierbare Membranen verwendet, um den erforderlichen Zweiteingriff bei Nutzung nicht resorbierbarer Membranen und deren spätere Entfernung zu vermeiden. Dem Einwand, die resorbierbaren Membranen zeigten eine zu kurze Haltbarkeit, konnte durch die Entwicklung verschiedener Membranmaterialien, teils durch unterschiedliche Membranbeschichtungen als sog. quervernetzte kollagene Membranen oder als sog. Double-Layer, entgegengetreten werden (Kodama *et al.*, 1989).

Die medizinischen Langzeitergebnisse und die praktische Handhabung der GTR und GBR bieten seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts so gute Prognosen, so dass beide heute von vielen Ärzten bevorzugt angewendet werden (Richter *et al.*, 1992).

1.1 Rolle von Stammzellen in der regenerativen Medizin

Die aktuelle Definition von Stammzellen nach § 3 des Stammzellgesetzes (StZG) aus dem Jahr 2002 lautet:

“Stammzellen sind alle menschlichen Zellen, die die Fähigkeit besitzen, in entsprechender Umgebung sich selbst durch Zellteilung zu vermehren und die sich selbst oder deren Tochterzellen sich unter geeigneten Bedingungen zu Zellen unterschiedlicher Spezialisierung, jedoch nicht zu einem Individuum zu entwickeln vermögen.“

Nach deutschem Recht ist die Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen (hESC) untersagt. Die Rechtslage beruft sich dabei auf die Würde des Menschen sowie auf das Recht zum Leben. Nach § 4 StZG darf in Deutschland nur an hESC geforscht werden, die nachweislich vor dem 1. Januar 2002 gewonnen wurden.

Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden erstmals embryonale Stammzellen (ESC) aus einer Mausblastozyste isoliert (Evans and Kaufman, 1981). Knapp zwei Jahrzehnte später gelang es hESC zu isolieren (Thomson *et al.*, 1998).

Stammzellen werden in der Regel nach ihrem Entnahmeort und entsprechend ihres Differenzierungspotentials benannt.

Demzufolge werden die in dieser Studie verwendeten Stammzellen, da sie aus menschlichem Nabelschnurblut gewonnen wurden, als humane Nabelschnurblutstammzellen bezeichnet.

Entsprechend ihres zeitlichen Entwicklungsstadiums lassen sich Stammzellen weiter in embryonal, fetal und adult einteilen.

Ein bisher noch ungeklärtes Verfahren ermöglicht es Stammzellen, sich während ihrer Zellteilung in eine Stammzelle mit demselben Differenzierungspotential wie ihre Mutterzelle sowie in eine differenziertere Tochterzelle zu teilen (Potten and Lajtha, 1982; Hall and Watt, 1989; Morrison *et al.*, 1997).

Aus der befruchteten Eizelle entsteht eine ESC, die auch als Zygote bezeichnet wird. Die ESC der Zygote sind bis zum Erreichen des Vierzellstadiums totipotent (Abbildung 1). Dies bedeutet, dass sich aus jeder dieser vier Zellen

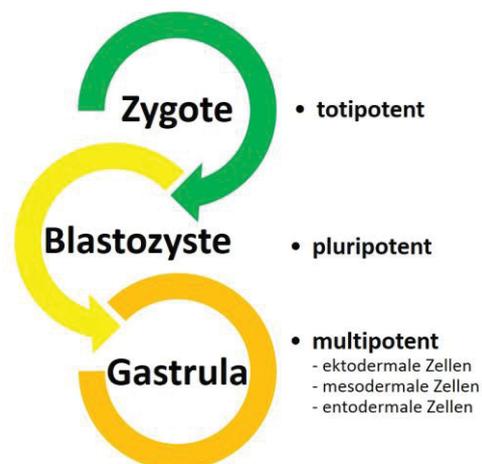


Abbildung 1: Die ersten drei Entwicklungsstadien nach der Befruchtung einer menschlichen Eizelle und ihre Entwicklungspotentiale.

noch ein vollständiger Organismus bilden könnte. Die Entstehung eineiiger Zwillinge ist nur durch die Totipotenz dieser frühen Teilungsstadien möglich und wird als spontanes Ereignis in der Natur beobachtet.

Mit der Reifung und den damit verbundenen weiteren Zellteilungen verringert sich das Differenzierungspotential der Stammzellen. Ab dem Achtzellstadium, bei dem der Zellhaufen als Blastozyste bezeichnet wird, verlieren die einzelnen Zellen ihre Totipotenz und werden pluripotent. Aus ihnen kann nun kein kompletter Organismus mehr hervorgehen. Solch pluripotente Stammzellen werden gegenwärtig vermehrt zu intensiven Forschungszwecken in der regenerativen oder zellbasierten Therapie verwendet (Mountford *et al.*, 2008).

Mit der Bildung der Gastrula erfolgt der Übergang zur Dreiblättrigkeit mit ihrem Ekdoderm, Mesoderm und Entoderm. Die Zellen der Gastrula können sich auf Grund ihrer fortgeschrittenen Differenzierung nur noch in Gewebezellen des Keimblattes, aus dem sie stammen, differenzieren (Sadler, 2003; Eckfeldt *et al.*, 2005).

Jedoch verlieren nicht alle Zellen im Laufe der Organogenese ihr gesamtes Differenzierungspotential. Im Gewebe verbleibt ein kleiner Anteil an undifferenziert gebliebenen Zellen, die die organotypischen Differenzierungen nicht durchlaufen haben. In verschiedensten menschlichen Geweben konnten multipotente adulte Stammzellen nachgewiesen werden (Jakob *et al.*, 2008), die bei auftretenden Gewebsdefekten über Chemotaxis aktiviert werden. Ein Beispiel sind mesenchymale Stammzellen (MSC), die beim Auftreten von Knochendefekten über den Blutkreislauf in den bestehenden Defektbereich gelangen, um sich dort zu den benötigten Zellen zu differenzieren (Shirley *et al.*, 2005).

Das adulte Knochenmark besitzt im menschlichen Körper die höchste Dichte an Stammzellen. Diese Stammzellen werden je nach Bedarf nach einem Trauma oder bei einer Geweberegeneration aktiviert und teilen sich in Tochterzellen, welche dann zur benötigten Zellart ausdifferenzieren (Cheng *et al.*, 2000).

Ohne adulte Stammzellen hätte der Mensch nur eine kurze Lebenserwartung, da diese Zellen täglich in vielen Organen, wie im Knochen, Knochenmark, Darm und in der Haut, als "Reparationszellen" abgestorbene Organzellen ersetzen. Multipotente Stammzellen sind demzufolge in der regenerativen Medizin heute ein besonderer Forschungsschwerpunkt.

Adulte Stammzellen lassen sich *in vitro* unter Zugabe osteogen wirksamer Substanzen im Kultivierungsmedium in osteoblastenähnliche Zellen differenzieren (Buttery *et al.*, 2001; zur Nieden *et al.*, 2003; Handschel *et al.*, 2010).

Takahashi und Yamanaka wiesen 2006 nach, dass auch nicht-pluripotente somatische Zellen unter Zugabe der vier Gen-Kombinationen *c-Myc*, *Klf-4*, *Oct-4* und *Sox-2* in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) differenziert werden können (Takahashi and Yamanaka, 2006). Inwieweit dabei eine vollkommene Übereinstimmung der iPS mit natürlichen Stammzellen vorliegt, ist noch

nicht vollständig geklärt. Aus menschlichen iPS können sich ebenfalls Zellen aller drei Keimblätter bilden (Park *et al.*, 2008).

1.1.1 unrestringierte somatische Stammzellen

Im Jahr 2004 separierten und untersuchten Kögler *et al.* am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich Heine Universität Düsseldorf Stammzellen aus Nabelschnurblut, die heute als unrestringierte somatische Stammzellen (USSC) bezeichnet werden (Kögler *et al.*, 2004).

Die zu den fetalen Stammzellen gehörenden USSC konnten lange Zeit nicht von MSC unterschieden werden. Heute ist wegen ihres unterschiedlichen Differenzierungspotentials eine Unterscheidung zwischen USSC und MSC anhand ihrer Hox-Gene, möglich (Kluth *et al.*, 2010). So wiesen Liedtke *et al.* 2010 nach, dass im Gegensatz zu MSC die fetalen USSC kein HoxA9, HoxB7, HoxC10 und HoxD8 exprimieren (Liedtke *et al.*, 2010). USSC weisen einen normalen Karyotyp (46XX oder 46XY) auf (Draper *et al.*, 2004).

Die USSC nehmen eine Stellung zwischen embryonalen und adulten Stammzellen ein (Kögler *et al.*, 2004; Sensken *et al.*, 2007; Greschat *et al.*, 2008). Ihre Telomere sind wesentlich länger als die von, aus dem Knochenmark stammenden MSC derselben Passage (Kouroupis *et al.*, 2014). Sie exprimieren keine hämatopoetischen Antigene wie CD34 oder CD45. Vermutlich stellen USSC Vorläuferzellen von MSC dar (Kögler *et al.*, 2004). Des Weiteren unterscheiden sich beide Zellarten in ihrem mRNA-Expressionsmuster, dem Differenzierungsspektrum und dem immunologischen Phänotyp.

Um an die für diese Studie benötigten humanen USSC zu gelangen, wurde mit dem Einverständnis der jeweiligen Mütter postnatal in verschiedenen regionalen Frauenkliniken Blut aus der Nabelschnurvene gesammelt und anschließend in der José Carreras Stammzellbank Düsseldorf aufbereitet und aufbewahrt. Für die Verwendung solchen Blutes als allogenes hämatopoetisches Stammzelltransplantat liegen die Richtlinien der Bundesärztekammer zu grunde. Die Verwendung von humanen USSC wird jedoch nicht durch das Stammzellgesetz reglementiert, da sie als ethisch unbedenklich einzustufen ist.

USSC lassen sich, ohne ihr pluripotentes Differenzierungsvermögen zu verlieren, *in vitro* kultivieren (Reimann *et al.*, 2009). Auf Grund ihres ontogenetisch jungen Ursprungs und ihrer weitestgehenden Undifferenziertheit weisen USSC kein humanes Leukozytenantigen (HLA) und somit *in vivo* nur geringe immunologische Reaktionen auf (Kögler *et al.*, 2004). Das Nabelschnurblut stellt somit eine ideale Quelle zur Gewinnung von Stammzellen dar. Im Schafmodell konnte gezeigt werden, dass sich USSC in hämatopoetische Zellen, Hepatozyten, Purkinjezellen und Kardiomyozyten differenzieren können (Flake *et al.*, 1986; Zanjani *et al.*, 1996;

Kögler *et al.*, 2004). So führte die Applikation von USSC bei einem iatrogen hervorgerufenen Herzinfarkt beim Schwein zu einer Myokardintegration mit anschließender Verbesserung der Herzfunktion (Kim *et al.*, 2005). Unter spezifischen Stimuli lassen sich USSC in Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, hämatopoetische- sowie neuronale Zellen differenzieren (Kögler *et al.*, 2004; Kluth *et al.*, 2013). Die Stimulation von USSC mit einer Lösung aus Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (DAG) führt somit sowohl *in vitro* (Lammers *et al.*, 2012) als auch *in vivo* (Handschele *et al.*, 2010) zur Bildung osteoblastenähnlicher Zellen.

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen induzieren USSC wahrscheinlich keine Teratome (Andrews *et al.*, 1998), worunter Tumore verstanden werden, die, da sie sich aus pluripotenten Stammzellen entwickeln, Komponenten aller drei Keimblätter enthalten können. In Tierversuchsmodellen konnten nach Verwendung von USSC keine Tumore nachgewiesen werden (Kögler *et al.*, 2004). Aus den oben angeführten Gründen stellen USSC ideale Stammzellen für Forschungszwecke dar.

USSC können auch ohne vollständige Übereinstimmung mit den Gewebemerkmale transplantiert werden (Kögler *et al.*, 2009). Bis heute konnten aus kryokonservierten Stammzellen keine relevanten Mengen an nicht-hämatopoetischen Stammzellen angezüchtet werden. Auch durch Anreicherung von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut kann kein kryokonservierter Pool gebildet werden, der spätere mögliche Organschäden gefahrlos ausgleichen könnte. (Reimann *et al.*, 2009).

Die Isolierung und Kultivierung von USSC erfolgt nach einem von Kögler *et al.* 2004 publizierten Verfahren (Kögler *et al.*, 2004). Hierzu werden Erythrozyten zunächst aus Nabelschnurblut abzentrifugiert. Die gewonnenen mononuklearen Zellen, zu denen auch die USSC gehören, werden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wird verworfen, das verbliebene Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und anschließend in Zellkulturflaschen angezüchtet. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank. Das Dexamethason enthaltende Nährmedium wird wöchentlich gewechselt, bis sich adhärierende USSC-Kolonien gebildet haben. Haben sich diese angeheftet, wird die Kultur anschließend mit dexamethasonfreiem Nährmedium versorgt. Unter Verwendung einer Gefrierschutzlösung werden die so gewonnenen USSC-Stammzellkonzentrate tiefgefroren und können bis zur Nutzung in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt werden.

Bis zur zwanzigsten Passage behalten USSC ihre Pluripotenz bei und sind in der Lage sich in ekto-, meso- und endodermale Richtungen zu differenzieren (Kögler *et al.*, 2004; Sensken *et al.*, 2007; Greschat *et al.*, 2008).

1.2 humane Osteoblasten

Der menschliche Knochen setzt sich zu zwei Dritteln aus anorganischen und zu einem Drittel aus organischen Bestandteilen zusammen (Robbins and Cotran, 2005). Hierzu gehören auch Zellen des Knochens, wie humane Osteoblasten (HOB).

Unter dem Einfluss entsprechender lokaler und systemischer Stimuli differenzieren HOB aus MSC (Lilienfeld-Toal, 1992; Aubin *et al.*, 1996; Schiebler, 2000) und lagern sich der periostalen und endostalen Knochenoberfläche sowie im Knochenmarkstroma den Knochenbälkchen palisadenförmig an (Hinrichs *et al.*, 1993). Die Osteoblasten sind miteinander verbunden und können über *gap junctions* miteinander kommunizieren (Miller *et al.*, 1980). Die primäre Aufgabe der Osteoblasten ist es, den Knochenaufbau aufrecht zu halten. Ihre Aktivität wird über Hormone gesteuert, zu denen das Parathormon, Östrogen, Androgen und das Vitamin D zählen (Hadjidakis and Androulakis, 2006).

Das von Osteoblasten synthetisierte und überwiegend aus Kollagen Typ I bestehende Osteoid dient bei der Knochenbildung als Matrix und beginnt ab dem 3. Tag zu verkalken. Unter normalen Umständen ist die Matrix nach 6 Wochen komplett mineralisiert (Marks *et al.*, 1988). Als nicht-kollagenes Protein synthetisieren Osteoblasten das knochen- und dentinspezifische Osteocalcin. Die Knochenneubildung kann bei der Osteoneogenese eine Geschwindigkeit von bis zu 1 μm pro Tag erreichen (Datta, 2008).

Während der Osteogenese mit ihrer Kollagensynthese und anschließenden Kalzifizierung verbleiben einige Osteoblasten in der neu gebildeten Knochenmatrix und werden zu sog. Osteozyten, die auch als *bone lining cells* bezeichnet werden (Aarden *et al.*, 1994; Aubin *et al.*, 1996).

1.3 Membranen

Eine Membran stellt eine Trennschicht zwischen zwei Kompartimenten dar, die jedoch weiterhin einen Stoffaustausch ermöglicht. Barrieremembranen werden in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zum Schutz von osteogen wirksamen Zellen vor destrukturierenden Wirkungen von schnell proliferierenden Gewebezellen, wie Fibroblasten, verwendet. Im Idealfall sollen eingebrachte Barrieremembranen biokompatibel, zellundurchlässig, gewebeintegrativ (bioadhärent) und leicht formbar sein. Darüber hinaus sind eine Formstabilität, einfache Handhabung sowie eine vollständige Sterilisierbarkeit erwünscht (Buser *et al.*, 1994).

Die Gewebereaktion auf die verwendeten Barrieremembranen ist stets unterschiedlich und sowohl abhängig vom Applikationsort, der Applikationszeit, dem Alter als auch dem Gesundheitszustand des Patienten (Schwarz *et al.*, 2006).

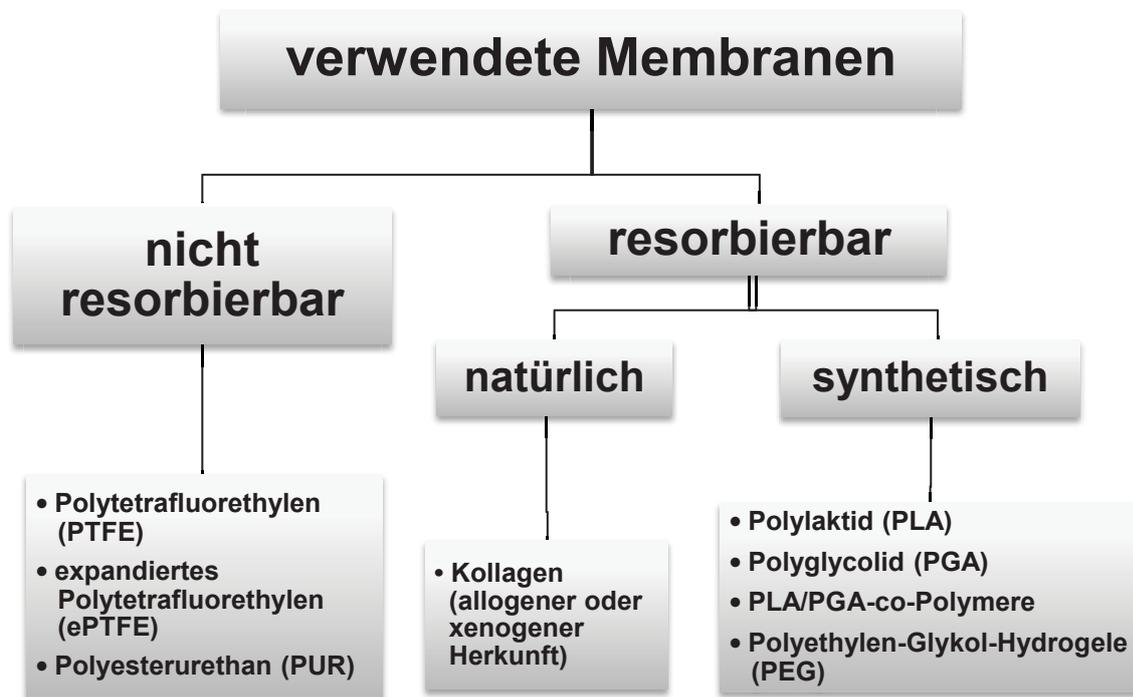


Abbildung 2: Einteilung der in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendeten Membranen.

Entsprechend ihres Ausgangsmaterials können Membranen in resorbierbare und nicht resorbierbare sowie in natürliche und synthetische Materialien eingeteilt werden (Abbildung 2).

Synthetische resorbierbare Membranen werden in der Regel aus Polymeren, wie z.B. Polylaktiden (PLA), Polyglykosiden (PGA) sowie deren Kombinationen (PLA/PGA-co-Polymere) oder aus Polyethylen-Glykol-Hydrogelen (PEG), hergestellt. Zu den natürlichen resorbierbaren Membranen zählen insbesondere die Kollagenmembranen allogener und xenogener Herkunft.

Die ersten für den oralen Bereich verwendeten Membranen waren nicht resorbierbar. Sie bestanden aus Zelluloseestern und expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) (Nyman *et al.*, 1982; Gottlow *et al.*, 1984). Nicht resorbierbare Membranen bestehen heute meist aus Polytetrafluorethylen (PTFE), expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) oder Polyesterurethan (PUR) (Buser *et al.*, 1994). Als nachteilig erweist sich hier jedoch der erforderliche Zweiteingriff zur späteren Membranentfernung mit Exposition des neugebildeten noch jungen Knochens im ehemaligen Defektbereich (Donnenfeld *et al.*, 1970).

Bei nicht resorbierbaren Membranen wird gehäuft von Membranexpositionen berichtet, die sich durch vermehrte bakterielle Infektionen negativ auf die Knochenregeneration auswirken können (Zitzmann *et al.*, 1997). Blumenthal sowie eine Forschergruppe um Christgau wiesen in Vergleichsstudien jedoch keine signifikanten Unterschiede anhand der klinischen und röntgenologischen Ergebnisse zwischen nicht resorbierbaren ePTFE-Membranen und resorbierbaren Membranen nach (Blumenthal, 1993; Christgau *et al.*, 1997).

Nach Buser *et al.* (1994) ist die nicht resorbierbare ePTFE-Membran GORE-TEX® biokompatibel und führt klinisch zu einem guten Defektverschluss.

Resorbierbare Membranen werden aus allogenem und xenogenem Kollagen oder synthetischen Polymeren hergestellt. Semipermeable Kollagenmembranen wirken chemotaktisch auf die Gewebeintegration und gewährleisten eine Versorgung des abgedeckten Knochengewebes sowohl mit Sauerstoff als auch mit Nährstoffen (Yaffe *et al.*, 1984; Hutmacher *et al.*, 1996; Locci *et al.*, 1997). Resorbierbare Membranen sollten keine toxischen Abbauprodukte enthalten und möglichst keine immunologischen Reaktionen im menschlichen Körper hervorrufen.

Kollagenmembranen werden in physiologischer Umgebung durch Enzyme, wie Kollagenasen oder Proteasen und anschließende Phagozytose von Makrophagen abgebaut (Tatakis *et al.*, 1999). Synthetische resorbierbare Membranen, die Polylaktide (PLA) oder Polyglykoxide (PGA) enthalten, werden *in vivo* zu Säuren abgebaut und teilweise mit Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht (Daniels *et al.*, 1992). Die aus der Hydrolyse entstandenen Fragmente werden schließlich phagozytiert (Heinz *et al.*, 1998). Dieses kann bei zu schneller Membranresorption zu einer verkürzten Barrierefunktion mit unzureichender Stabilität im Defektbereich führen, wodurch die Knochenregeneration negativ beeinflusst und die bakterielle Infektionsgefahr erhöht wird.

Der enzymatische Abbau durch Kollagenasen lässt sich durch eine Quervernetzung der Kollagenmembranen mittels UV-Licht, Diphenylphosphorylazid, Glutaraldehyd, Hexmethylenediisocyanat oder enzymatische Behandlungsverfahren hinauszögern und somit die Resorptionszeit verlängern (Kodama *et al.*, 1989). Bei diesem Vorgang wird die Membranoberfläche durch eine zusätzliche Queranordnung von Kollagenfibrillen so verändert, dass es zu einer längeren Degradationszeit kommt (Locci *et al.*, 1997). Die teils verstärkte Formstabilität steigt dabei proportional zum Grad der Quervernetzung an (Brunel *et al.*, 1996).

Somit hat die Quervernetzung einen direkten Einfluss auf die knöcherne Wundheilung (Minabe *et al.*, 1989; Quteish *et al.*, 1992; Zahedi *et al.*, 1998). Ein möglicher Nachteil der Quervernetzung ist in einer größeren Wunddehiscenzrate von 39 bis 64% sowie in einer verringerten Vaskularisierung zu sehen (Friedmann *et al.*, 2001; Moses *et al.*, 2005). Weitere Autoren wiesen nach, dass eine chemische Quervernetzung die Biokompatibilität von Membranen signifikant senken kann (Minabe *et al.*, 1989; Paul *et al.*, 1992; Rothamel *et al.*, 2004). Auch in tierexperimentellen Untersuchungen konnte nach Quervernetzung eine verminderte Biokompatibilität (Pitaru *et al.*, 1988; Paul *et al.*, 1992; Rothamel *et al.*, 2005) sowie zusätzlich eine vermehrte Anzahl von Entzündungen mit sekundären Wundheilungsstörungen nachgewiesen werden (Rothamel *et al.*, 2005).

Insgesamt zeigt das Verfahren der Quervernetzung jedoch nach primärer Wundheilung eine gute Gewebeverträglichkeit.

1.4 ***guided tissue regeneration/guided bone regeneration***

Die *guided tissue regeneration* (GTR) und die *guided bone regeneration* (GBR) bezeichnen chirurgische Verfahren, bei denen durch eine zusätzlich eingebrachte Barrieremembran die Regeneration eines Gewebe- bzw. Knochendefektes unterstützt werden und dieser gleichzeitig vor negativen Einfüssen des umgebenden Weichgewebes (Schleimhautepithel, Binde- und Narbengewebe) geschützt werden soll (Gottlow *et al.*, 1984; Dahlin *et al.*, 1994).

In der Medizin steht der Begriff "Regeneration" für die Bildung eines adäquaten körpereigenen Ersatzes für zuvor verlorengegangenes Gewebe. Im Idealfall besitzt Knochengewebe das Potential, sich vollständig zu regenerieren, welches auch als "restitutio ad integrum" bezeichnet wird.

Im günstigsten Fall reicht zur Regeneration eines parodontalen oder eines rein ossären Defektes die alleinige Einbringung einer Barrieremembran aus. Jedoch stellen das Bindegewebe als auch das Epithelgewebe auf Grund ihrer hohen Proliferation das Haupthindernis einer erfolgreichen Gewebe- bzw. Knochenregeneration dar. Ergebnisse hierzu wurden bereits 1959 von Hurley und Ham veröffentlicht (Hurley and Ham, 1959).

Für die Knochenregeneration ist neben dem Vorliegen eines Blutkoagels sowie vitaler Osteoblasten auch ein Kontakt zu vitalem Knochengewebe erforderlich (Murray *et al.*, 1957; Dahlin *et al.*, 1994). Außerdem ist für die schnelle ossäre Regeneration eine möglichst frühzeitige Angiogenese notwendig (Schwarz *et al.*, 2006).

Der Erfolg beider Verfahren hängt davon ab, ob der Defekt von vitalem Knochen umgeben ist, eine adäquate Vaskularisierung gewährleistet ist, das Wundgebiet über die gesamte Heilungsperiode mechanisch stabil bleibt, die Membran ausreichend Raum für die ossäre Regeneration ermöglicht sowie gleichzeitig ein Einwachsen von Zellen des angrenzenden Gewebes verhindert (Buser *et al.*, 1994).

Im Gegensatz dazu wird die Heilung eines parodontalen- bzw. eines reinen Knochendefektes jedoch durch das Aufeinandertreffen konkurrierender Gewebe mit unterschiedlich hohen Zellproliferationsraten, eine fehlende Vaskularisierung im Regenerationsbereich, die Größe des Defektes, eine mangelnde mechanische Stabilität im Defektbereich sowie eine möglicherweise lokal auftretende Wundinfektionen beeinträchtigt (Schenk *et al.*, 1994).

Bei der GTR/GBR wird zuerst das dem parodontalen Defekt/Knochendefekt aufliegende Bindegewebe/Mukoperiost ausreichend weit abpräpariert. Anschließend wird die zum Einsatz kommende Membran mittels Schere oder Skalpell dem Defekt angepasst. Scharfe Kanten und Ecken beim Zuschnitt sind dabei zu vermeiden. Die Membran sollte über den Defektbereich hinaus direkten Kontakt zum Knochen besitzen. Durch Benetzen des Randbereiches lassen sich insbesondere resorbierbare Membranen bis zu einem gewissen Grad dehnen und so dem Defekt im Operationsgebiet besser anpassen. Das Koagel, das sich im Hohlraum gebildet hat, kann

somit vor negativen Einflüssen von außen geschützt und die notwendige Nährstoffversorgung aufrechterhalten werden. Zum Schutz vor einer Infektion ist nach dem Verankern der Membran ein möglichst dichter Weichteilverschluss mit dem zuvor abpräparierten Mukoperiost anzustreben.

In den ersten Wochen nach einer Knochenaugmentation werden bei der GBR die Zellen zunächst ausschließlich über Diffusion versorgt bis sich ein versorgungsfähiges Gefäßsystem ausbildet (Liu and Kerns, 2014). Zu den Anwendungsgebieten der GTR/GBR zählen die Parodontologie, die zahnärztliche Implantologie sowie die knöchernen Defektchirurgie (Dahlin *et al.*, 1995; Hägewald, 1999).

1.5 Ziel der wissenschaftlichen Arbeit

Ziel dieser *in vitro* Studie war es, unter sechs kommerziell erhältlichen Membranen die Membran mit der besten Biokompatibilität zu ermitteln.

Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden dabei das Attachment, die Zellproliferation, die Zellvitalität an humanen, osteogen vordifferenzierten USSC und HOB sowie die in den Zellkulturen auftretende Zytotoxizitätsveränderung evaluiert. Als Kontrolle diente eine Standardzellkulturoberfläche. Die Zellmorphologie beider Zellarten auf den verwendeten Membranen wurde im Rasterelektronenmikroskop dargestellt und verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Medien, Enzyme und Puffer für die Zellkultivierung

Name	Firma	Sitz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 g/l Glucose, ohne L-Glutamine	Lonza Cologne GmbH	Köln / D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies GmbH	Darmstadt / D
Fetal Bovine Serum (FBS) (10%) aus Südamerika	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach / D
L-Glutamin (200mM)	Biochrom GmbH	Berlin / D
Osteoblast Growth Medium (Ready-to-use)	PromoCell GmbH	Heidelberg / D
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom GmbH	Berlin / D
Trypsin (2,5%)	Lonza Cologne GmbH	Köln / D

Tabelle 1: Auflistung der für die Zellkultivierung zum Einsatz gekommenen Medien, Enzyme und Puffer.

2.1.2 Chemikalien

Name	Firma	Sitz
Aceton	Merck KGaA	Darmstadt / D
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim / D
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim / D
DNase/RNase-Free Distilled Water	Life Technologies	Carlsbad / USA
Glutardialdehyd (25%)	Merck KGaA	Darmstadt / D
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim / D
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim / D

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

2.1.3 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Sitz
Heraeus Sorvall 7500	Heraeus Holding GmbH	Hanau / D
Autoklav D-65	Systec GmbH	Linden / D
Brutschrank Cytoperm 2 Heracell 240	Heraeus Holding GmbH	Hanau / D
Cell Scraper	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen / D
Critical Point Dryer CPD 030	BAL-TEC AG	Balzers / FL
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	Thermo Scientific™ Nalgene™	Rochester / USA
Feinwaage Chyo IL-180	A. Hartenstein GmbH	Würzburg / D
Gefrierschrank	Liebherr GmbH	Ochsenhausen / D
Fluorometer GENios	Tecan Group Ltd.	Männedorf / CH
Fluorometer infinite M200	Tecan Group Ltd.	Männedorf / CH
Kryoröhrchen (Cryo Tube™ Vials, 1ml)	Thermo Scientific™ Nalgene™	Rochester / USA
Kühlschrank	Liebherr GmbH	Ochsenhausen / D
Mikroliterpipette Research	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling / D
Mikroskop DM5000 B	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar / D
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG	Sondheim / D
Pipetten aus Polysterol (5, 10 und 25mL)	CORNING	Tewksbury / USA
Pipettenspitzen TipOne (0,1-10, 1-200 und 101-1000 µl)	STARLAB GmbH	Hamburg / D
Pipettierhelfer (accu-jet® pro)	BrandTech® Scientific Inc.	Essex / USA
Scanning-Electron-Microscope S-3000N	HITACHI	Tokio / J
Sputter Coater 108 auto	Cressington	Warford / GB
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau / D
Taumler: ProBlot™ Rocker 25	Labnet International Inc.	Edison / USA
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG	Uetze / D
Wellplatten schwarz (96 Well)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen / D
Wellplatten transparent (24, 48 und 96 Well)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen / D
Zellkulturflasche (25 und 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen / D
Zentrifuge: Multifuge 1S-R	Heraeus Holding GmbH	Hanau / D

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien.

2.1.4 Test-Kits/Enzymassays

Name	Firma	Sitz
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega GmbH	Mannheim / D
CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit	Life Technologies GmbH	Darmstadt / D
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assays	Promega GmbH	Mannheim / D

Tabelle 4: Auflistung der Test-Kits/Enzymassays.

2.2 Zellarten und Zelllinien

unrestringierte somatische Stammzellen (USSC)

Die bei dieser Studie verwendeten humanen USSC wurden in ihrer Verwendung als ethisch unbedenklich eingestuft (Ethikvotum 3376) und wurden als anonymisierte Spenderzellen ohne Rückschluss auf den Spender freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Gesine Kögler (Leiterin der José Carreras Stammzellbank) vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika zur Forschung überlassen. Folgende USSC-Linien wurden verwendet:

- **USSC-18** (♀, Passage 8)
- **USSC-8** (Passage 9)
- **USSC-8/77** (♂, Passage 8)

humane Osteoblasten (HOB)

Die in dieser Arbeit eingesetzten HOB stammten von der Fa. PromoCell GmbH (Heidelberg / D). Laut Herstellerangaben stammten die HOB aus den Spenderegionen Knie oder Beckenkamm. Vor der Auslieferung wurde jede HOB-Zellcharge nach standardisierten Qualitätskontrollen bez. ihres Adhärenzverhaltens, ihrer Zellmorphologie und ihrer Vitalität durch die Fa. PromoCell GmbH überprüft. Ferner erfolgten histochemische Testkontrollen zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase und der Knochenmineralisierung sowie Prüfungen des Zellwachstums über 10 Passagen unter Kulturbedingungen. Die Zellen wurden des Weiteren auf das Fehlen von HIV-1, HBV, HCV und auf evtl. weitere mikrobielle Verunreinigungen, wie z.B. Pilze, Bakterien und Mykoplasmen getestet. Folgende HOB-Linien wurden bezogen:

- **HOB-1** (57-jährige Spenderin, Passage 5; Lot.No. 8101502.1)
- **HOB-2** (72-jährige Spenderin, Passage 6; Lot.No. 9011508.1)
- **HOB-3** (62-jähriger Spender, Passage 7; Lot.No. 9021702)

2.3 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Das Ansetzen der nun folgenden Medien erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.3.1 USSC-Nährmedium

Ansetzung des USSC-Nährmediums (510ml):

350 ml	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
+ 150 ml	FBS (Fetal Bovine Serum)
+ 5 ml	Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)
+ 5 ml	L-Glutamine (200 mM)

2.3.2 USSC-Differenzierungsmedium (DAG)

Die Stammlösungen setzten sich wie folgt zusammen:

50µM Dexamethason in DMEM (bei 4°C maximal eine Woche haltbar)

50mM Ascorbinsäure in PBS (bei 4°C maximal 4 Wochen haltbar)

1M β-Glycerophosphat in PBS (bei 4°C maximal 4 Wochen haltbar)

Das Differenzierungsmedium wurde wie folgt hergestellt:

Menge	Komponente	Arbeitskonzentration
100ml	USSC Nährmedium	n.a.
+ 0,2ml	50µM Dexamethason	100nM
+ 0,1ml	50mM Ascorbinsäure	50µM
+ 1ml	1M β-Glycerophosphat	10mM

2.3.3 HOB-Nährmedium

Ansetzung des HOB-Nährmediums (555ml):

500 ml	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
+ 50 ml	FBS (Fetal Bovine Serum)
+ 5 ml	Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)

2.3.4 Trypsin

Die 2,5%ige Trypsinlösung wurde mit PBS auf 0,25%ige Trypsinlösung verdünnt.

2.3.5 Einfriermedium

Ansetzung des Einfriermediums (7,5ml):

5 ml	USSC bzw. HOB Nährmedium
+ 2,5 ml	FBS (Fetal Bovine Serum)

2.4 Anlage der Zellkulturen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37°C mit 21% O₂- und 5% CO₂-Sättigung.

Das Zentrifugieren der USSC erfolgte für 7 min bei 4°C mit 1.500U/min, das der HOB für 3 min bei 4°C mit 220U/min im Heraeus Sorvall Ausschwingrotor.

2.4.1 Auftauen und Kultivierung der Zellen

USSC:

Die im Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen USSC wurden solange im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut bis von außen nur noch ein winziger Eisklumpen im Kryoröhrchen

sichtbar war. Die anschließende Desinfektion des Kryoröhrchen erfolgte mit 70%igem Ethanol. Nach dem Öffnen des Röhrchens unter der Sterilbank wurde der Inhalt in ein 14ml USSC-Nährmedium enthaltendes Falcon Tube überführt, zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde in 15ml frischem Nährmedium suspendiert und schließlich in einer 75 cm² Zellkulturflasche im Brutschrank kultiviert. Der erste Nährmediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Nach Erreichen einer 70- bis 90%igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet.

Vor dem Aussäen der USSC auf den Membranen bzw. einer Standardzellkulturoberfläche wurde das USSC-Nährmedium für 3 Tage durch 15ml des angesetzten USSC-Differenzierungsmediums ersetzt.

HOB:

Zunächst wurden 9ml des Osteoblast Growth Mediums in eine 75 cm² Zellkulturflasche pipettiert und im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Nun wurde das Kryoröhrchen mit den HOB aus dem Tank mit dem flüssigen Stickstoff entnommen, im Wasserbad bei 37°C für 90 Sekunden erwärmt, anschließend mit 70%igem Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank geöffnet. Der Inhalt wurde in die vorbereitete Zellkulturflasche pipettiert und diese zur Kultivierung in den Brutschrank zurückgestellt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Sobald die HOB eine 70- bis 90%ige Konfluenz erreicht hatten erfolgte eine Zellsplittung.

2.4.2 Splittung der Zellen

Mit dem Erreichen einer 70 bis 90%igen Konfluenz wurden die adhärent wachsenden USSC und HOB gesplittet. Nach Abgießen des Mediums, kurzem Waschen der Zellen mit 15ml PBS sowie erneuter Zugabe von 15ml PBS in die Zellkulturflasche erfolgte deren Inkubation für 7 Minuten im Brutschrank. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit 7ml 0,25%iger Trypsinlösung überschichtet und diese erneut für weitere 8 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch weitere Zugabe von 8ml Nährmedium erfolgte eine Sättigung des Trypsins. Die restlichen am Flaschenboden adhärierenden Zellen wurden unter Zuhilfenahme eines Cell Scrapers abgelöst. Die Zellsuspension konnte nun in ein 50ml Falcon Tube überführt und anschließend zentrifugiert werden. Der so entstandene Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet in einer definierten Menge Nährmedium gelöst. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

Nun konnten die Zellen in gewünschter Menge in einem Kryoröhrchen tiefgefroren sowie in einer neuen Zellkulturflasche oder auf den getesteten Membranen ausgesät werden.

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Nach dem Lösen des Zellpellets in einer bekannten Menge Nährmedium wurden 20µl der Zellsuspension mit 20µl Trypan-Blau versetzt, eine Neubauer-Zählkammer damit befüllt und anschließend die Zellzahl in 100µl bestimmt. Die Berechnung der Gesamtzellzahl ($Zellzahl_{Ges}$) in der Zellsuspension erfolgte nach folgender Formel:

$$Zellzahl_{Ges} = (Zellzahl \text{ in } 100\mu\text{l}) \times 2 \times 10^4 \times \text{Volumen der Zellsuspension in ml}$$

2.4.4 Kryokonservierung der Zellen

Zur Zwischenlagerung der Zellen wurden diese bis zu 4 Wochen im Gefrierschrank bei -80°C oder danach in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert.

Hierzu wurden zunächst 100µl DMSO in ein 1ml fassendes Kryoröhrchen pipettiert und auf 4°C abgekühlt. Das durch das Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde in 1ml, auf 4°C temperiertes Einfriermedium, bestehend zu zwei Dritteln aus Nährmedium und zu einem Drittel aus FBS, aufgelöst. Es folgte die Zellzahlbestimmung. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Einfriermedium verdünnt, bis eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro 900µl Einfriermedium vorlag. Nun konnten 900µl dieser Lösung in das mit DMSO vorgefüllte Kryoröhrchen gefüllt, kurz durchgemischt und anschließend in eine auf 4°C vortemperierte Kryobox (Mr. Frosty™) gestellt werden, die beim Lagern in einem Gefrierschrank ein gleichmäßiges abkühlen um 1°C/min bewirkte.

Nach dem Erreichen einer Temperatur von -20°C wurden die Kryoröhrchen in einen auf -80°C abgekühlten Gefrierschrank gebracht. Aus diesem konnten die Kryoröhrchen nach 24 Stunden für eine längerfristige Lagerung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C überführt werden.

2.5 verwendete Membranen

Bei der Membranwahl wurde auf bereits zugelassene Medizinprodukte zurückgegriffen, um eine hohe Vergleichbarkeit mit bereits publizierten und zukünftigen Studien zu ermöglichen.

Die unten genannten Membranen wurden von den jeweiligen Herstellern großzügig zur Verfügung gestellt und ermöglichten so die Durchführung dieser Arbeit.

Dabei wurden sowohl resorbierbare als auch nicht resorbierbare Membranen eingesetzt. Folgende resorbierbare Membranen wurden getestet:

- **Bio-Gide®**
- **RESODONT®**
- **GENTA-FOIL resorb®**
- **BioMend®**
- **BioMend® Extend™**

Als nicht resorbierbare Membran wurde eingesetzt:

- **GORE-TEX®**

2.5.1 Bio-Gide®

Laut der Fa. Geistlich Pharma AG (Wolhusen / CH) soll die nicht quervernetzte porcine Kollagenmembran Bio-Gide® die Bildung neuen Knochengewebes fördern und somit die Knochenregeneration beschleunigen. Während der Heilungsphase soll sie in das angrenzende Gewebe integriert und schrittweise vom Körper resorbiert werden sowie bereits nach wenigen Monaten vollständig vom menschlichen Körper abgebaut sein. Darüber hinaus soll die natürliche Proteinstruktur der Bio-Gide®-Membran die Wundheilung fördern, indem sie als Schutzbarriere fungiert.

Bio-Gide® besitzt eine glatte und eine raue Oberfläche. Letztgenannte soll während der Einbringung in Richtung Defekt positioniert werden.

Sie ist gamma-sterilisiert in den Größen 25 x 25mm und 30 x 40mm erhältlich.

2.5.2 RESODONT®

Nach Angaben der Fa. RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG (Nürnberg / D) soll die beidseits verwendbare, nicht quervernetzte equine RESODONT®-Membran nach ihrer Einbringung schrittweise in körpereigenes Gewebe umgebaut werden. Sie soll in Form eines dünnen Gewebestückes eine nach strengsten Qualitätsanforderungen gefertigte komprimierte reißfeste Kollagenmembran aus aufbereiteter Pferdesehne darstellen, wobei 1cm² 2,8mg native Kollagenfibrillen enthalten. Darüber hinaus soll sie strukturstabil sein und auch im feuchten

Zustand ihre Form behalten. RESODONT® soll sich dem menschlichen Gewebe ähnlich zeigen und somit eine bessere Verträglichkeit und Einheilung bewirken.

Die RESODONT®-Membran ist Ethylenoxidgas-sterilisiert in den Größen 30 x 35mm, sowie 30 x 70mm erhältlich.

2.5.3 GENTA-FOIL resorb®

Die ebenfalls nicht quervernetzte Kollagenmembran GENTA-FOIL resorb® der Fa. RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG (Nürnberg / D) wird aus equiner Sehne hergestellt. Als bakteriellen Schutz enthält sie das Antibiotikum Gentamicin. 1cm² enthält 5,6mg Kollagen sowie 4mg Gentamicinsulfat. Nach kurzem Anfeuchten mit Kochsalzlösung soll die im Ausgangszustand äußerst steife transparente Kollagenmembran gut modellierbar sein und die Anheftung teilungsaktiver Zellen unterstützt sowie eine Leitschiene für angrenzendes Gewebe darstellen. Nach ihrer Einbringung soll sie temporär dem postoperativen Adhäsionsschutz diene und somit zur besseren Wundregeneration beitragen. Das beim Abbau freigesetzte Gentamicin soll vor einer intra- und postoperativen Kontamination schützen. Somit soll die GENTA-FOIL resorb®-Membran besonders geeignet bei Eingriffen mit erhöhtem Infektionsrisiko sein.

Die Kollagenmembran ist Ethylenoxidgas-sterilisiert in den Größen 25 x 25mm sowie 25 x 50mm erhältlich.

2.5.4 BioMend® und BioMend® Extend™

Die mit Glutaraldehyd quervernetzten Kollagenmembranen BioMend® und BioMend® Extend™ der Fa. Zimmer Dental GmbH (Freiburg / D) bestehen aus boviner Achillessehne und sollen nach Anfeuchten mit NaCl-Lösung ein gutes Haftvermögen besitzen. Ihre spezielle dreidimensionale Struktur mit ihrer integrierten durchschnittlichen Porengröße von 4nm soll die Migration epithelialer Zellen verhindern, einen Nährstoffaustausch fördern und somit die Knochenregeneration unterstützen.

Der Unterschied zwischen BioMend® und BioMend® Extend™ soll lediglich in ihrer Resorptionszeit liegen. Laut Herstellerangaben soll BioMend® nach ihrer Einbringung innerhalb von 8 Wochen vollständig vom menschlichen Körper resorbiert sein, wohingegen BioMend® Extend™ 10 Wochen länger *in vivo* verweilen soll. Die verlängerte Resorptionszeit bei BioMend® Extend™ soll dabei auf ihre stärkere Quervernetzung, die durch eine längere Einwirkzeit von Glutaraldehyd erreicht wird, zurückzuführen sein.

Sowohl BioMend® als auch BioMend® Extend™ sind Ethylenoxidgas-sterilisiert in den Größen 15 x 20, 20 x 30 und 30 x 40mm erhältlich.

2.5.5 GORE-TEX®

Die GORE-TEX®-Membran der Fa. W.L. Gore & Associates, Inc. (Flagstaff / USA) besteht aus nicht resorbierbarem expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE, Teflon®). Laut Herstellerangaben soll die Möglichkeit einer transgingivalen, bei der ein Zahn oder ein Implantat durch die Gingiva in die Mundhöhle reicht, wie auch einer geschlossenen Anwendung, bei der der Defekt vollständig von der Gingiva überdeckt wird, bestehen. Ein im Inneren eingearbeitetes Titangitter soll der Membran zusätzliche Steifigkeit verleihen und somit ein postoperatives Einbrechen verhindern. Darüber hinaus soll die Membran sich während der Einbringung sicher an den angrenzenden Knochen adaptieren und fixieren lassen.

Während des gesamten Heilungsprozesses soll die nicht resorbierbare GORE-TEX®-Membran selbst im Falle einer Membranexposition ihre Barrierefunktion aufrecht erhalten. Nach Defektheilung soll sie sich leicht wieder entfernen lassen.

Die GORE-TEX®-Membran ist Ethylenoxidgas-sterilisiert in den unterschiedlichsten Größen und Formen von 13 x 18 bis 28 x 37mm erhältlich.

2.5.6 Überblick der verwendeten Membranen

Produktname:	Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	BioMend®	BioMend® Extend™	GORE-TEX®
Hersteller:	Geistlich Pharma AG (Wolhusen / CH)	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG / D (Nürnberg / D)	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG (Nürnberg / D)	Zimmer Dental GmbH (Freiburg / D)	Zimmer Dental GmbH (Freiburg / D)	W.L. Gore & Associates, Inc. (Flagstaff / USA)
Spenderherkunft:	porcin	equin	equin	bovin	bovin	synthetisch (ePTFE)
Kollagentyp:	Typ I u. Typ III	Typ I	Typ I	Typ I	Typ I	-
Quervernetzung:	keine Quervernetzung	keine Quervernetzung	keine Quervernetzung	glutaraldehyd-quervernetzt	glutaraldehyd-quervernetzt	-
Sterilisation:	γ-Strahlung	Ethylenoxid-Gas	Ethylenoxid-Gas	Ethylenoxid-Gas	Ethylenoxid-Gas	Ethylenoxid-Gas
erhältliche Membrangrößen:	25 x 25 und 30 x 40mm	30 x 35 und 30 x 70mm	25 x 25 und 25 x 50mm	15x20, 20x30 und 30x40mm	15 x 20, 20 x 30 und 30 x 40mm	unterschiedlichste Größen und Formen von 13 x 18 bis 28 x 37mm
Besonderheit:	große Ähnlichkeit zu menschlichem Gewebe, fördert die Bildung neuen Knochenwebes und beschleunigt die Gewebeheilung	beidseitig verwendbar, strukturstabil und behält auch im nassen Zustand seine Form, zeigt sich menschlichem Gewebe äußerst ähnlich	enthält das Antibiotikum Gentamicinsulfat, nach kurzem Anfeuchten mit NaCl-Lösung oder mit Wundfeuchtigkeit aus dem Defektbereich außerordentlich gut modellierbar	geringe Porengröße (4nm), hilft das Epithelzellwachstum in der frühen Heilphase zu verzögern, wird sehr gut in das angrenzende Gewebe integriert	geringe Porengröße (4nm) hilft das Epithelzellwachstum in der frühen Heilphase zu verzögern, wird sehr gut in das angrenzende Gewebe integriert	titanverstärkte nicht resorbierbare Membran, eine der am häufigsten eingebrachten Membranen bei der Regeneration von Hart- und Weichgeweben

Abbildung 3: Alle getesteten Membranen im Überblick.

2.6 Versuchsablauf

Nachfolgend wird der Ablauf exemplarisch beschrieben. Er wurde für alle sechs Zelllinien (USSC-18, -8 und -8/77 sowie HOB-1, -2 und -3) in dieser Weise durchgeführt.

2.6.1 Zuschnitt der Membranen

Die unsteril vorliegenden Bio-Gide®-Membranen wurden unsererseits mit einer Dosis von 25,0kGy gamma-sterilisiert (Fa. Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH; Radeberg / D). Die verschiedenen Membranen wurden unter der Sterilbank mithilfe eines Skalpells sowie einer Schere in Rechtecke mit einer Fläche von 0,785cm², entsprechend der Fläche eines Kreises mit einem Durchmesser von 1cm, zugeschnitten.

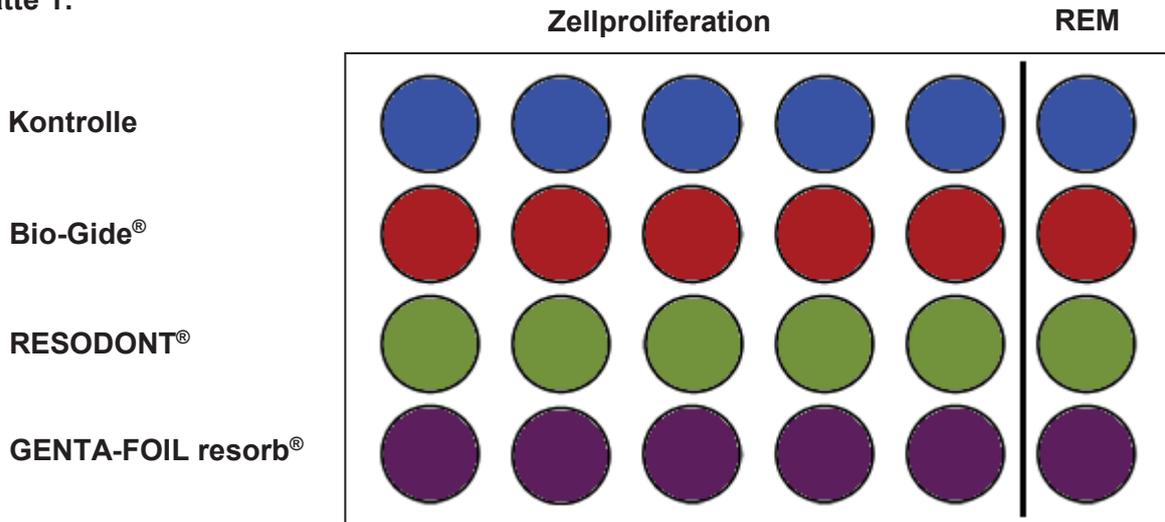
2.6.2 Befüllung der Well-Platten

Mit einer Pinzette wurden die zurechtgeschnittenen Membranstücke in 24er-Well-Platten gelegt, so dass sich in jedem Well ein Membranstück befand. Von jeder Membranart wurden 27 Membranstücke, also jeder Meßtag mit n=9 Proben pro Zelllinie geplant. Von den neun Membranstücken eines Messtages wurden fünf für die Zellproliferationsmessung, drei für die Bestimmung der Zellvitalität und Zytotoxizität sowie einer für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen genutzt. Eine schematische Darstellung der Well-Platten-Befüllung für die Zellproliferations- und REM-Untersuchung zeigt sich in Abbildung 4. Die Befüllung der Well-Platte zur Zellvitalitäts- und Zytotoxizitätsbestimmung ist in Abbildung 5 dargestellt.

Da die RESODONT®- und die GENTA-FOIL resorb®-Membranstücke nach der Benetzung mit dem Nährmedium auf der Oberfläche schwimmen, wurden sie mit auf eine Länge von 17mm gekürzten, Pipettenspitzen (Pipettenvolumen von 0,1 bis 10µl) untergetaucht und am Well-Boden fixiert.

Anschließend wurde in die befüllten Wells sowie die Kontrollansätze jeweils 610 µl Nährmedium pipettiert und in den Brutschrank zur späteren Besiedelung gestellt.

Platte 1:



Platte 2:

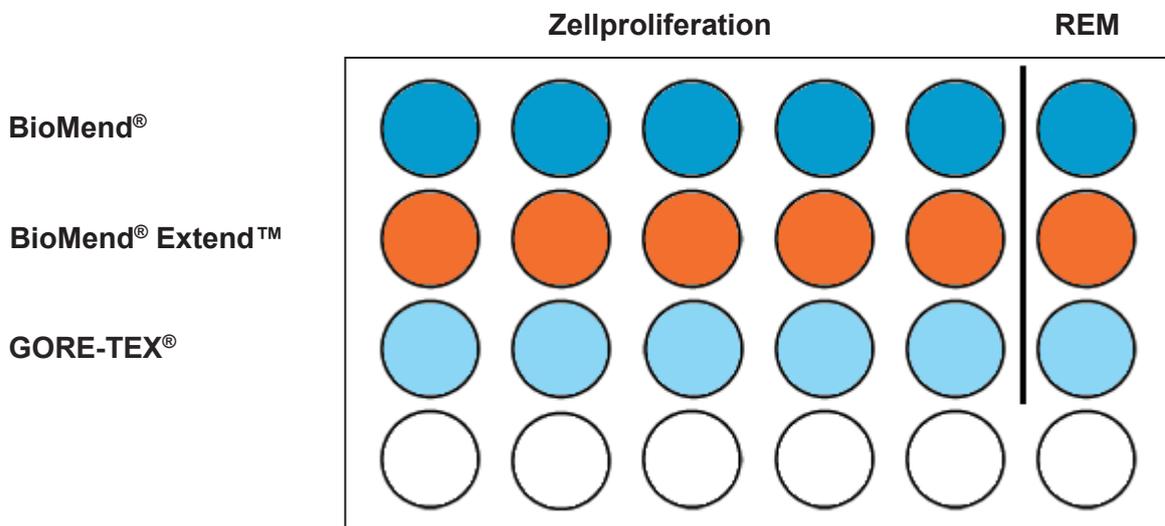


Abbildung 4: Schematische Darstellungen der Well-Plattenbefüllung für die Messung der Proliferation und die qualitative Bestimmung der Zellmorphologie für eine Zelllinie an einem Messtag. Platte 1 (oben) wurde mit Bio-Gide®, RESODONT® und GENTA-FOIL resorb®, Platte 2 mit BioMend®, BioMend® Extend™ und GORE-TEX® befüllt.

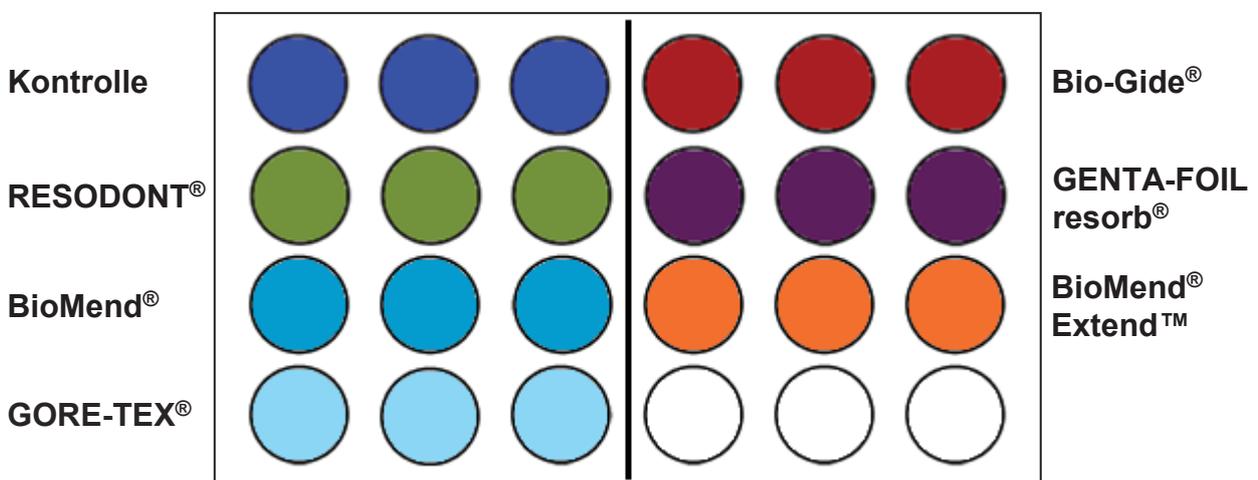


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Well-Plattenbefüllung für die Messung der Zellvitalität und Zytotoxizität für eine Zelllinie an einem Messtag.

2.6.3 Zellaussaat

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen unter Nährmediumzugabe auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Sowohl die Membranoberflächen, als auch die Kontrolloberfläche wurden mit 190 μ l Zellsuspension entsprechend 19.000 Zellen besiedelt. Durch mehrmaliges Ein- und Auspipettieren konnten die Zellen gleichmäßig auf der Membranoberfläche sowie auf der Kontrolloberfläche verteilt werden. Anschließend wurden die Well-Platten im Brutschrank inkubiert.

2.6.4 Platten- und Mediumwechsel

Nach 24 Stunden erfolgte sowohl für den dreitägigen- wie auch für den den siebentägigen Versuchsansatz ein Well-Platten- und Mediumwechsel. Hierzu wurden die Membranen mit sterilen Pinzetten von den alten 24er-Well-Platten in neue 24er-Well-Platten mit frischem Nährmedium überführt. Die verbliebenen 24er-Well-Platten des eintägigen Versuchsansatzes dienten weiterhin der Zellkultivierung des Kontrollansatzes. Hier erfolgte der Nährmediumwechsel direkt in der Well-Platte. Für die Well-Platten mit dem siebentägigen Versuchsansatz wurde nach 4 Tagen ein erneuter Mediumwechsel vollzogen.

2.6.5 Probennahme, Einfrieren und Fixieren der Membranen

Die Probennahme, das Einfrieren und das Fixieren erfolgten, je nach Versuchsansatz, nach 24 Stunden sowie 3 bzw. 7 Tagen. Die Zellvitalität wurde direkt in der Zellkultur, die der Zytotoxizität aus dem vorhandenen Zellkulturüberstand ermittelt. Für die Zellzahlbestimmungen und die Membranfixierungen zur REM-Untersuchung wurden die Membranen zunächst mit zehnfach verdünnter PBS-Lösung gewaschen und anschließend die Membranstücke für die Zellzahlbestimmung bei -80°C tiefgefroren. Die Membranstücke für die REM-Untersuchung wurden in eine 5%ige Glutardialdehydlösung überführt. Der zeitliche Versuchsablauf ist schematisch in Tabelle 5 dargestellt.

Zeitpunkt	Proliferation	Zellvitalität	Zytotoxizität	REM-Untersuchung	Plattenwechsel	Mediumwechsel
nach 24 h	Ansatz _{Tag 1}	Ansatz _{Tag 1}	—	Ansatz _{Tag 1}	Ansatz _{Tag 3} ; Ansatz _{Tag 7}	Ansatz _{Tag 3} ; Ansatz _{Tag 7}
Nach 3 Tagen	Ansatz _{Tag 3}	Ansatz _{Tag 3}	Ansatz _{Tag 3}	Ansatz _{Tag 3}	—	—
Nach 4 Tagen	—	—	—	—	—	Ansatz _{Tag 7}
Nach 7 Tagen	Ansatz _{Tag 7}	Ansatz _{Tag 7}	Ansatz _{Tag 7}	Ansatz _{Tag 7}	—	—

Tabelle 5: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs.

2.7 Testverfahren

2.7.1 Bestimmung der Zellzahl in den Kulturen

Die Ermittlung der Zellzahl in den Zellkulturen erfolgte durch das CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit. Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft eines Farbstoffs, der, nachdem er an frei liegende Nukleinsäure gebunden hat, sehr viel stärker grün fluoresziert. Zuerst wurde die Zellen mit CyQuant® GR working solution lysiert, dann wurde der Farbstoff zugegeben, der sich an die freigewordene Nukleinsäure anlagerte. Dabei steigt die Fluoreszenz bei geeigneter Verdünnung linear zum Nukleinsäuregehalt an.

Mittels einer zuvor erstellten Kalibriergeraden kann das gemessene Fluoreszenzsignal der Probe in die entsprechende Zellzahl umgerechnet werden (Jones *et al.*, 2001). Für 20ml Lyselösung wurden 19ml DNase/RNase freies destilliertes Wasser, 1ml Cell lysis buffer und 75µl CyQuant® GR reagent in ein schwarzes, 50ml fassendes Falcon Tube pipettiert und vermischt.

2.7.1.1 Erstellung der Kalibriergeraden und Ermittlung der Zellzahl

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden 6×10^5 Zellen der jeweiligen Zellkultur in ein 10ml PBS enthaltendes Falcon Tube pipettiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das im Falcon Tube verbliebene Zellpellet bis zur Zellzahlmessung bei -80°C tiefgefroren.

Am Tag der Zellzahlmessung wurde das Falcon Tube bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend das Zellpellet in 2,4ml Lyselösung aufgelöst. Die Verdünnungsreihe wurde in dreifacher Ausführung nach dem in Tabelle 6 dargestellten Schema in einer lichtundurchlässigen 96er-Well-Platte angelegt.

CyQuant GR working solution (µl)	200	196	192	184	168	136	72
Zellsuspension (µl)	0	4	8	16	32	64	128
lysierte Zellzahl	0	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000

Tabelle 6: Die Verdünnungsreihe zur Erstellung der Kalibriergeraden.

Zur Zellzahlbestimmung wurden die tiefgefrorenen Well-Platten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde in jedes Well 650µl Lyselösung pipettiert und die Well-Platte für 5 Minuten auf einem Taumler (Labnet International Inc.) bei einer Frequenz von 80 Bewegungen pro Minute positioniert.

Für einen dreifachen Ansatz wurden anschließend aus jedem Well dreimal 200µl der die lysierten Zellen enthaltene Lösung entnommen und in eine 96er-Well-Platte pipettiert. Es wurde auf jeder 96er-Well-Platte eine Verdünnungsreihe mitgemessen. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung mittels GENios bei 485nm Exzitation und 535nm Emission.

Aus dem Fluoreszenzsignal ließ sich über die zuvor erstellte Kalibriergerade die Zellzahl anhand folgender Formel ermitteln ($3,25 =$ Verdünnungsquotient $650\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ und $m =$ Steigung der Kalibriergeraden):

$$\text{Zellzahl} = \text{gemessene Fluoreszenz} \times 3,25/m$$

2.7.1.2 Berechnung der relativen Zellproliferation

Die relative Zellproliferation (rel. Zellprol.) von Tag 1 bis Tag 3, Tag 3 bis Tag 7 sowie Tag 1 bis 7 wurde wie folgt berechnet:

$$\text{rel. Zellprol.}_{\text{Tag1-3}} = (\text{Zellzahl}_{\text{Tag 3}} - \text{Zellzahl}_{\text{Tag 1}}) \times 100\% / \text{Zellzahl}_{\text{Tag1}}$$

$$\text{rel. Zellprol.}_{\text{Tag3-7}} = (\text{Zellzahl}_{\text{Tag 7}} - \text{Zellzahl}_{\text{Tag 3}}) \times 100\% / \text{Zellzahl}_{\text{Tag1}}$$

$$\text{rel. Zellprol.}_{\text{Tag1-7}} = (\text{Zellzahl}_{\text{Tag 7}} - \text{Zellzahl}_{\text{Tag 1}}) \times 100\% / \text{Zellzahl}_{\text{Tag1}}$$

2.7.2 Bestimmung der Zellvitalität in den Kulturen

Mit dem CellTiter-Blue® Cell Viability Assay lässt sich fluorometrisch die metabolische Zellaktivität in den Zellkulturen bestimmen. Bei diesem Testverfahren reduzieren vitale Zellen bläuliches Resazurin in rosafarbenes Resorufin. Avitale Zellen sind hierzu nicht mehr in der Lage. Anschließend lässt sich die Resorufinkonzentration fluorometrisch messen. (Zhang *et al.*, 2011). Das detektierte Fluoreszenzsignal korreliert mit der gebildeten Menge an Resorufin und steigt somit proportional zur Vitalität der Zellen in den Kulturen an.

Zellvitalitätsbestimmungen erfolgten an den Tagen 1, 3 und 7. Dazu wurde eineinhalb Stunden vor der Fluoreszenzbestimmung das Nährmedium der Zellkulturen durch frisches Medium ersetzt und im Brutschrank inkubiert. Für die Messung wurden 160µl des CellTiter-Blue®-Reagenz direkt auf die Zellkultur pipettiert.

Das enzymatisch erzeugte Resorufin reicherte sich im Überstand an. Nach einstündiger Inkubation wurden dreimal 120µl aus dem Kulturüberstand in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Bei 560nm Exzitation und 590nm Emission erfolgte die fluorometrische Messung mittels infinite M200 der Vitalität als *relative fluorescence units* (rfu).

2.7.2.1 Ermittlung der Vitalität pro Zelle

Über den Quotienten aus der gemessenen Zellvitalität und der Zellzahl des jeweiligen Messzeitpunktes wurde die Vitalität (in rfu) pro Zelle berechnet.

2.7.3 Bestimmung der Zytotoxizität in den Kulturen

Mit Hilfe des CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assays lässt sich die Zytotoxizität indirekt über die Konzentration an Laktatdehydrogenase (LDH) aus dem Überstand

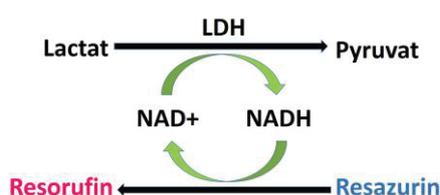


Abbildung 6: Umwandlung von Laktat zu Pyruvat.

einer Zellkultur messen. Mit dem Tod der Zelle geht die Integrität ihrer Zellmembran verloren, wodurch das ausschließlich intrazellulär vorliegende LDH aus der Zelle geschwemmt wird. Die sich im Zellkulturüberstand anreichernde LDH oxidiert das im CytoTox-ONE™ Reagenz enthaltene Laktat zu

Pyruvat. Die hierbei auf das NAD⁺ übertragenen Reduktionsäquivalente werden in einer Folgereaktion auf den blauen Redoxfarbstoff Resazurin übertragen, wodurch dieser zum pink

fluoreszierenden Resorufin reduziert wird (Abbildung 6). Das detektierte Fluoreszenzsignal ist proportional zur LDH-Konzentration.

Für die Messung der Zytotoxizität wurden 50µl des Kulturüberstandes in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde das CytoTox-ONE™ Reagenz im Verhältnis 1:1 in den Kulturüberstand gegeben und die Reaktionskaskade gestartet. Mit der Zugabe von 25µl des Stopp-Puffers erfolgte ein Stopp der Reaktion nach zehn Minuten. Nun konnte die gebildete Menge an Resorufin fluorometrisch mittels infinite M200 bei 560nm Exzitation und 590nm Emission in rfu bestimmt werden. Hintergrundaktivität von LDH aus bovinem Serum in den Nährmedien wurde durch die Bestimmung von Kontrollproben ermittelt und von den Messwerten subtrahiert.

2.7.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die qualitative Beurteilung des Wachstumsverhaltens der Zelle sowie deren Morphologie auf den Membranen erfolgten durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Membranoberflächen an den Tagen 1, 3 und 7.

2.7.4.1 Fixieren der Membranen mit Glutardialdehyd

Für eine 5%ige Glutardialdehydlösung wurden 5ml 25%iges Glutardialdehyd mit 20ml PBS verdünnt. Die besiedelten Membranen wurden an den jeweiligen Versuchstagen mittels einer Pinzette aus ihrem Well entnommen, zum Waschen kurz in ein mit PBS gefülltes Gefäß getaucht und schließlich in ein PBS enthaltendes Well einer 24-Well-Platte überführt. Die anschließende Membranfixierung mit Zwischenlagerung im Kühlschrank erfolgte bis zur kritischen Punkt-Trocknung mit Glutardialdehyd.

2.7.4.2 Acetonreihe und kritische Punkt-Trocknung

Vor der kritischen Punkt-Trocknung musste das in den Proben noch enthaltene Wasser in einer aufsteigenden Acetonreihe entfernt werden. Hierzu wurden die in Glutardialdehyd fixierten Membranen mit einer Pinzette in ein Acetonlösung enthaltendes Falcon Tube überführt und für 6 Stunden in einer 50%igen Acetonlösung (Aceton und H₂O im Mischungsverhältnis 1:1) gelagert. Es folgte die weitere Lagerung der Membranreihe für jeweils zwei Stunden in 70%iger, gefolgt

von 90%iger Acetonlösung und abschließend in 100%igem Aceton. Schließlich wurden die Membranen zusätzlich für weitere zwei Stunden in getrocknetem Aceton aufbewahrt.

Die kritische Punkt-Trocknung der fixierten Membran erfolgte in einem Critical Point Dryer CPD 030, wobei das in den Proben verbliebene Aceton durch CO₂ ersetzt wurde.

2.7.4.3 Sputtern der Membranen

Um die Membranen elektrisch leitfähig zu machen, wurden diese mittels Sputter Coater 108 auto gesputtert. Dieses Gerät ist für die routinemäßige Probenvorbereitung in der Rasterelektronenmikroskopie geeignet. Beim Sputtern werden mittels Kathodenzerstäubung Goldatome unter Vakuum aus einer Goldfolie mit energiereichen Ionen herausgelöst und als strukturfreie gleichmäßige Beschichtung auf der Membranoberfläche zur Vorbereitung auf die Rasterelektronenmikroskopie aufgetragen.

Anschließend konnten die jeweiligen besiedelten Membranoberflächen im Rasterelektronenmikroskop Scanning-Electron-Microscope S-3000N untersucht werden.

3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Studie war es, unter den sechs getesteten Membranen Bio-Gide[®], RESODONT[®], GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™] und GORE-TEX[®] die biokompatibelste zu ermitteln. Hierzu wurden das Attachment, das Proliferationsverhalten, die Zellvitalität und die Zellmorphologie von osteogen vordifferenzierten USSC und von HOB auf den Membranen sowie einer als Kontrolle dienenden Standardzellkulturoberfläche untersucht. Ferner wurde die in den Zellkulturen auftretende Zytotoxizität analysiert. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen.

3.1 Zellproliferation

Das Attachment und die Zellproliferation wurden auf einer Standardzellkulturoberfläche sowie den sechs Membranen ermittelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte fluorometrisch (485Ex/535Em) mittels CyQuant[®] Cell Proliferation Assay nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen.

3.1.1 Attachment auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche

Das Attachment (Zellzahl nach 24 Stunden) der USSC und HOB auf einer Standardzellkulturoberfläche und den sechs getesteten Membranen ist in Abbildung 7 ersichtlich. Im Vergleich zu den Membranen wiesen beide Zellarten auf einer Standardzellkulturoberfläche mit 6.481 ± 1.088 Zellen bei den USSC und 6.459 ± 1.031 Zellen bei den HOB ein nahezu identisches und das mit Abstand signifikant beste Attachment aller getesteten Oberflächen auf ($p < 0,0005$).

	USSC mit HOB		
	Tag 1	Tag 3	Tag 7
Kontrolle	n.s.	***	***
Bio-Gide [®]	**	n.s.	***
RESODONT [®]	*	n.s.	n.s.
GENTA-FOIL resorb [®]	***	n.s.	n.s.
BioMend [®]	***	**	**
BioMend [®] Extend [™]	***	***	**
GORE-TEX [®]	***	***	***

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 7: Signifikanzen zur Zellproliferation der USSC und HOB an den Tagen 1, 3 und 7.

Auf allen Membranen erreichten die HOB ein signifikant höheres Attachment als die USSC ($p < 0,05$ bis $p < 0,0005$; Tabelle 7). Bei beiden Zellarten zeigte sich unter den Membrankulturen

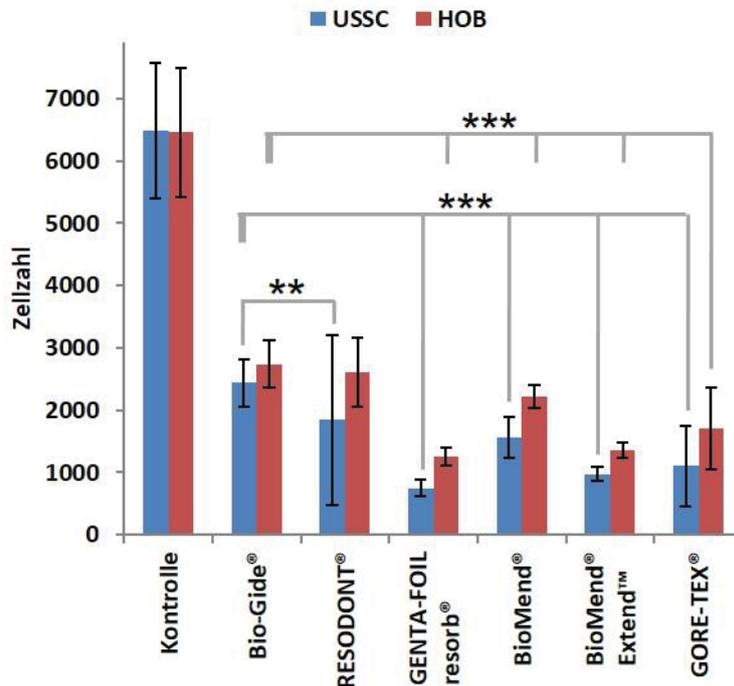


Abbildung 7: Attachment der USSC und HOB auf den sechs Membranen sowie einer Standardzellkulturoberfläche. Die eingebrachten zellartabhängigen Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die höchste gemessene Zellzahl auf den Membranen nach 24 Stunden, anschaulich durch einen verbreiterten Balken markiert. ** = $p < 0,005$ und *** = $p < 0,0005$

das stärkste Attachment auf Bio-Gide® (HOB: 2.735 ± 378 Zellen und USSC: 2.435 ± 384 Zellen), dicht gefolgt von RESODONT® (HOB: 2.612 ± 550 Zellen und USSC: 1.842 ± 1.363 Zellen). Sowohl die mit USSC als auch mit HOB besiedelten GENTA-FOIL resorb®-Membranen (HOB: 1.252 ± 143 Zellen und USSC: 749 ± 130 Zellen) ließen das schlechteste Attachment erkennen.

Mit Ausnahme von RESODONT® konnte in den HOB-Kulturen auf Bio-Gide® mit $p < 0,005$ bis $p < 0,0005$ ein signifikant stärkeres Attachment nachgewiesen werden als auf den übrigen

verwendeten Membranen ($p < 0,0005$). In den USSC-Kulturen erfolgte auf Bio-Gide® das signifikant beste Attachment aller getesteten Membranen.

	USSC		HOB	
	Tag 1 zu Tag 3	Tag 3 zu Tag 7	Tag 1 zu Tag 3	Tag 3 zu Tag 7
Kontrolle	***	***	***	***
Bio-Gide®	*	***	n.s.	***
RESODONT®	n.s.	n.s.	n.s.	***
GENTA-FOIL resorb®	n.s.	n.s.	***	n.s.
BioMend®	***	***	***	***
BioMend® Extend™	***	***	***	***
GORE-TEX®	***	n.s.	***	***

* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,0005$; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 8: Signifikanzen zur Zellproliferation der USSC und HOB für die Kultivierungszeiträume Tag 1 bis 3 und Tag 3 bis 7.

3.1.2 Proliferationsverhalten auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche

Das Proliferationsverhalten der USSC und HOB auf den sechs Membranen und einer Standardzellkulturoberfläche über einen Zeitraum von 7 Tagen ist in Abbildung 8 dargestellt.

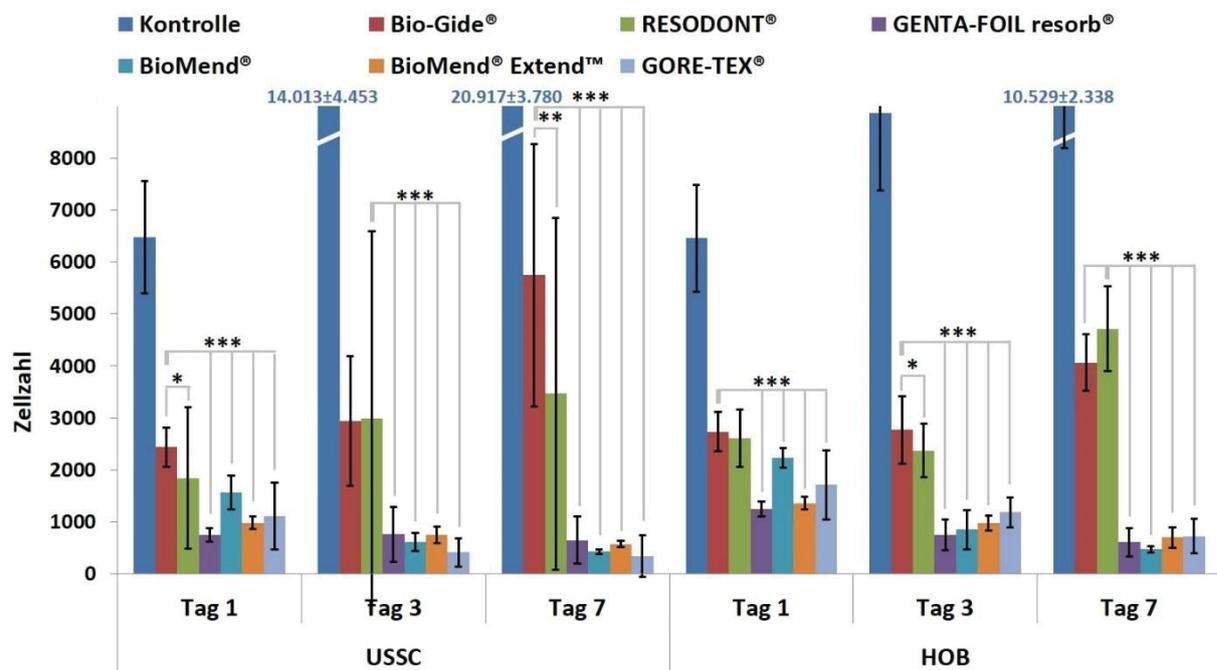


Abbildung 8: Wachstumsverhalten der USSC und HOB auf den sechs Membranen und einer Standardzellkulturoberfläche nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen. Die eingebrachten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die höchste gemessene Zellzahl auf den Membranen des jeweiligen Tages, anschaulich durch einen verbreiterten Balken markiert. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ und *** = $p < 0,0005$

Auf der Standardzellkulturoberfläche proliferierten die USSC und HOB sowohl zwischen Tag 1 und 3 (USSC: +7.532 und HOB: +2.412 Zellen) als auch zwischen Tag 3 und 7 (USSC: +6.904 und HOB: +1.658 Zellen) signifikant ($p < 0,0005$; Tabelle 8). Dabei lagen die Zellzahlen auf der Kontrolloberfläche an Tag 3 (USSC: 14.013±4.453 und HOB: 8.817±1.492 Zellen) sowie an Tag 7 (USSC: 20.917±3.780 und HOB: 10.529±2.338 Zellen) signifikant über denen der Membrankulturen ($p < 0,0005$), wobei die USSC an Tag 7 eine nahezu doppelt so große Zellzahl aufwies wie die HOB.

Unter den besiedelten Membrankulturen konnte zwischen Tag 1 und 3 einzig auf den mit USSC besiedelten Bio-Gide®-Membranen ein signifikanter Zellanzug (+511 Zellen; $p < 0,05$) gemessen werden (Tabelle 8). Auf den weiteren Membranen erfolgten während desselben Zeitraums keine signifikanten Zellzahlveränderungen. Dagegen zeigten sich im Kultivierungszeitraum Tag 3 bis 7 signifikante Zellzahlzunahmen auf den mit HOB besiedelten Bio-Gide®- (+1.293 Zellen) und RESODONT®-Membranen (+2.345 Zellen), während es auf den

restlichen vier mit HOB- und USSC kultivierten Membranen GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™] und GORE-TEX[®] teilweise zu signifikanten Zellzahlrückgängen kam ($p < 0,0005$). An Tag 7 wurden im Vergleich mit den restlichen getesteten Membranen in den USSC-Kulturen auf Bio-Gide[®] mit 5.749 ± 2.526 Zellen signifikant höhere Zellzahlen gemessen ($p < 0,005$ bis $p < 0,0005$). In den HOB-Kulturen zeigte sich selbiges auf RESODONT[®] mit 4.712 ± 816 Zellen ($p < 0,0005$; Tabelle 7).

Relativer Zellanzstieg:

In Abbildung 9 sind die relativen Zellzahlveränderungen bezogen auf die nach 24 Stunden ermittelte Zellzahl der USSC und HOB auf einer Standardzellkulturoberfläche und den getesteten sechs Membranoberflächen für die Zeitintervalle Tag 1 bis 3, Tag 3 bis 7 sowie Tag 1 bis 7 dargestellt.

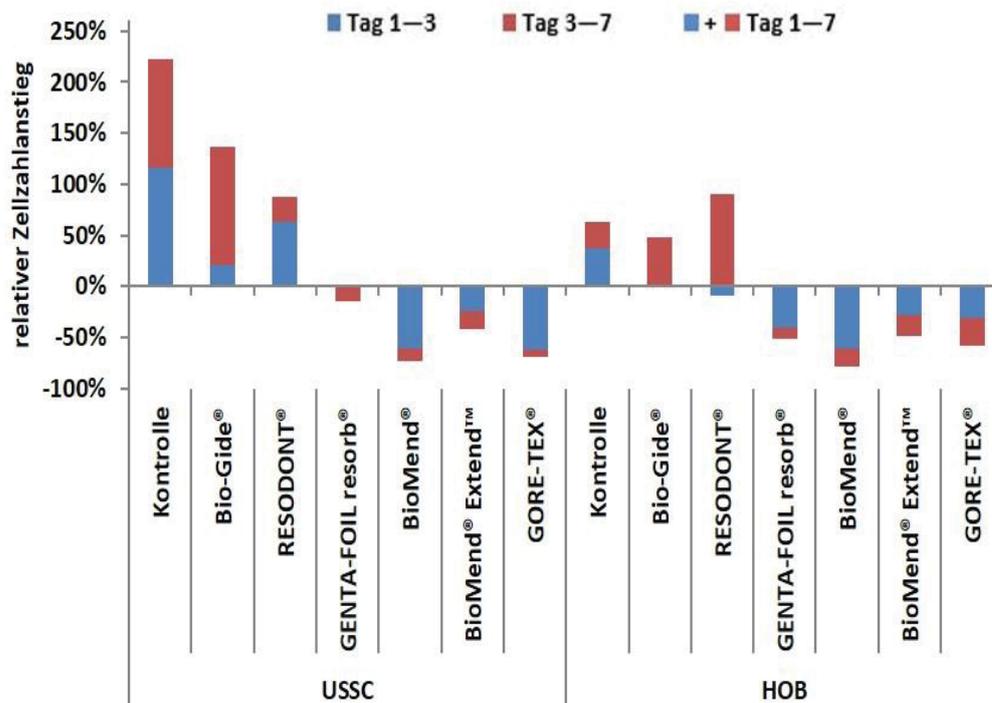


Abbildung 9: Relatives Proliferationsverhalten der USSC und HOB auf den sechs Membranen und einer Standardzellkulturoberfläche zwischen Tag 1 und 3 sowie zwischen Tag 3 und 7, jeweils in Relation zur an Tag 1 gemessene Zellzahl.

Über den gesamten Kultivierungszeitraum von 7 Tagen konnten lediglich auf der Standardzellkulturoberfläche (USSC: +223% und HOB: +63%), Bio-Gide[®] (USSC: +136% und HOB: +48%) und RESODONT[®] (USSC: +88% und HOB: +81%) relative Zellanzstiege verbucht werden. Diese waren in den USSC-Kulturen deutlich ausgeprägter. Dabei wurde die stärkste relative USSC-Zunahme zwischen Tag 1 und 3 auf der Standardzellkulturoberfläche mit +116% sowie zwischen Tag 3 und 7 auf Bio-Gide[®] mit +115% ermittelt. Auch in den HOB-Kulturen konnten zunächst die höchsten relativen Zellanznahmen auf der Standardzellkulturoberfläche

mit +63% gemessen werden. In den nun folgenden vier Kultivierungstagen zeigten sich diese auf RESODONT® mit +90%, gefolgt von Bio-Gide® mit +47%. Auf den restlichen vier getesteten Membranen kam es über den gesamten Kultivierungszeitraum zu relativen Zellzahlverlusten.

3.1.3 Wertigkeitsdiagramm zum Attachment und Proliferationsverhalten

Das Wertigkeitsdiagramm des Attachments und der Zellproliferation erlaubt einen Überblick über die farblich dargestellte prozentuale Zellzahlveränderung auf den einzelnen Membranen sowie einer Standardzellkulturoberfläche zwischen den jeweiligen Zeitintervallen (Tag 1 bis 3, Tag 3 bis 7 und Tag 1 bis 7; Tabelle 9). Referenzwerte sind für Tag 1 bis 3 und für Tag 1 bis 7 die an Tag 1 ermittelten sowie für Tag 3 bis 7 die an Tag 3 ermittelten jeweiligen Zellzahlen der Standardzellkulturoberfläche bzw. Membranoberflächen. Grüne Farben kennzeichnen eine Zunahme, gelbe Farben eine Stagnation und rote Farben eine Abnahme der Zellzahlen. Abgesehen vom relativ guten Attachment der UCCS und HOB auf der Standardzellkulturober-

		Kontrolle	Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	BioMend®	BioMend® Extend™	GORE-TEX®
Attachment	USSC	++++	-	--	---	--	--	--
	HOB	++++	-	-	-	-	--	--
		≥ 30%	≥ 25%	≥ 20%	≥ 15%	≥ 10%	≥ 5%	≥ 0%

		Kontrolle	Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	BioMend®	BioMend® Extend™	GORE-TEX®	
Tag 1-3	USSC	+++	+	++	+	---	-	---	
	HOB	+	+	-	--	---	--	--	
Tag 3-7	USSC	+	++	+	-	--	-	-	
	HOB	+	+	++	-	--	--	--	
Tag 1-7	USSC	++++	+++	++	-	---	--	---	
	HOB	++	+	++	--	----	--	---	
		≥+150%	≥+100%	≥+50%	≥ 0%	< 0%	≤ -25%	≤ -50%	≤ -75%

Tabelle 9: Wertigkeitsdiagramme zum Attachment und zur Zellproliferation der USSC und HOB über die Zeiträume Tag 1 bis 3, Tag 3 bis 7 sowie Tag 1 bis 7.

fläche (vierfach +) zeigten beide Zellarten auf Bio-Gide® mit einfach - noch das beste Attachment. Dieses war vergleichbar mit den HOB auf RESODONT®, GENTA-FOIL resorb® und BioMend®.

Das schlechteste Attachment (dreifach -) erzielten die USSC auf GENTA-FOIL resorb[®]. Die Zellzahlen nach 24 Stunden der übrigen Membrankulturen lagen mit zweifach – dazwischen.

Zwischen Tag 1 und 3 zeigte die mit USSC besiedelte Standardzellkulturoberfläche mit dreifach + die stärkste Zellzahlzunahme, gefolgt von mit USSC besiedeltem RESODONT[®] (zweifach +). Über denselben Zeitraum verbuchten das mit beiden Zellarten kultivierte BioMend[®] sowie das mit USSC besiedelte GORE-TEX[®] die stärkste Zellzahlabnahme (dreifach -).

In den folgenden vier Tagen zeigte sich die Zellzahlzunahme beider Zellarten auf Bio-Gide[®], RESODONT[®] und der Standardzellkulturoberfläche nahezu gleichgut (einfach bis zweifach +), wohingegen es auf den übrigen vier Membranen zellartunabhängig zu ähnlich hohen Zellzahlverlusten kam (einfach bis zweifach -).

Über die gesamte Kultivierungszeit zeigten Bio-Gide[®], RESODONT[®] und die Standardzellkulturoberfläche bei beiden Zellarten eine Zunahme der Zellzahl, welche auf letztgenannter, mit USSC besiedelter am kräftigsten ausfiel (vierfach +). Auf GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™] und GORE-TEX[®] kam es im selben Zeitraum zu Zellzahlabnahmen, welcher auf mit HOB besiedeltem BioMend[®] am deutlichsten auftrat (vierfach -).

3.2 Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde fluorometrisch (560Ex/590Em) in den Kulturen mittels CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen bestimmt. Der zum jeweiligen Messzeitpunkt gebildete Quotient aus Zellvitalität und Zellzahl ergab die Vitalität pro Zelle. Auch bei der Bestimmung der Zellvitalität diente eine Standardzellkulturoberfläche als Kontrolle.

3.2.1 Zellvitalität auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche

Aus der in Abbildung 10 dargestellten Vitalität ist ersichtlich, dass zu jedem Messzeitpunkt die mit Abstand signifikant höchsten Werte bei beiden Zellarten auf der Standardzellkulturoberfläche gemessen wurden ($p < 0,0005$). Mit Ausnahme der HOB auf BioMend[®] zeigten nach 24 Stunden sowohl die USSC mit 4.987 ± 1.065 rfu als auch die HOB mit 4.967 ± 1.392 rfu auf Bio-Gide[®] im Vergleich zu allen übrigen getesteten Membranen eine signifikant höhere Zellvitalität (USSC: $p < 0,0005$ und HOB: $p < 0,05$).

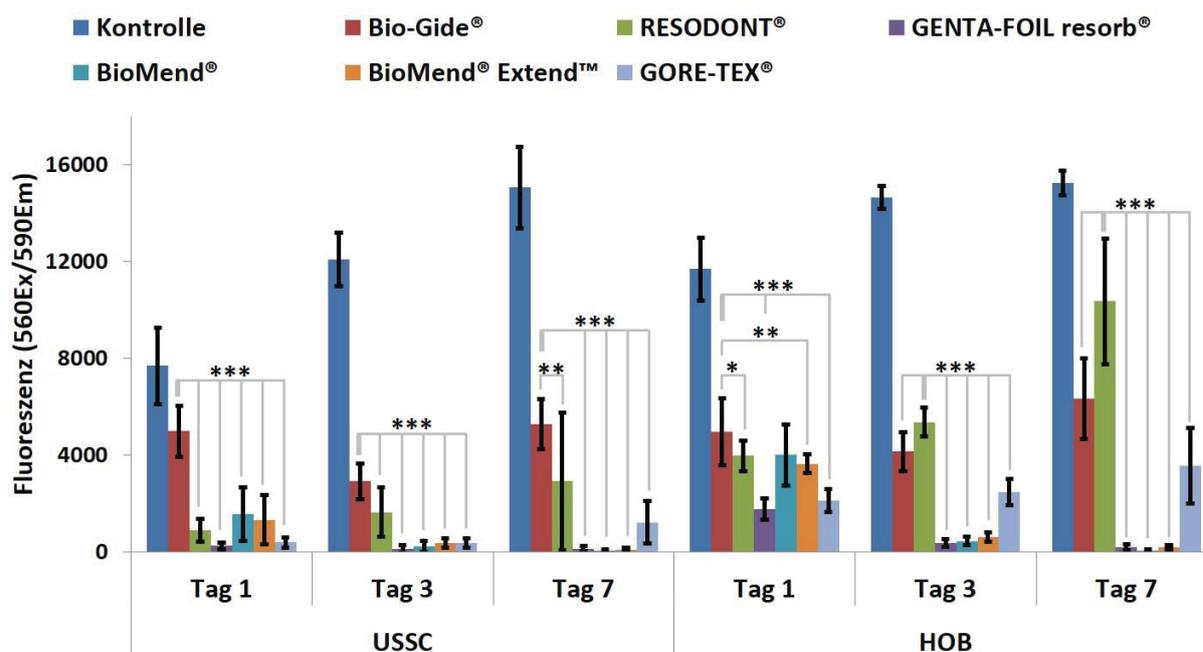


Abbildung 10: Vitalität der USSC und HOB auf den sechs Membranen und einer Standardzellkulturoberfläche nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen. Die eingebrachten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die höchste gemessene Zellvitalität auf den Membranen des jeweiligen Tages, anschaulich durch einen verbreiterten Balken markiert. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ und *** = $p < 0,0005$

Bis zum Versuchsende verlief die gemessene Zellvitalität auf Bio-Gide® bei beiden Zellarten nahezu identisch. In den ersten 3 Versuchstagen fiel sie zunächst signifikant (USSC: -2.072 rfu, $p < 0,0005$ und HOB: -823 rfu, $p < 0,05$), stieg dann jedoch in den folgenden vier Versuchstagen signifikant und leicht über den Ausgangsvitalitätswert nach 24 Stunden an (USSC: +2.356 rfu und HOB: +2.192 rfu; jeweils $p < 0,0005$; Tabelle 10). Im Gegensatz zu Bio-Gide® wiesen die USSC und HOB auf RESODONT® sowie die HOB auf GORE-TEX® sowohl zwischen Tag 1 und 3 (USSC: +745 rfu, HOB auf RESODONT®: +1.385 rfu und HOB auf GORE-TEX®: +356 rfu; $p < 0,05$ bis $p < 0,0005$) als auch zwischen Tag 3 und 7 (USSC: +1.280 rfu, HOB auf RESODONT®: +4.992 rfu und HOB auf GORE-TEX®: +1.093 rfu; $p < 0,05$ bis

	USSC		HOB	
	Tag 1 zu Tag 3	Tag 3 zu Tag 7	Tag 1 zu Tag 3	Tag 3 zu Tag 7
Kontrolle	***	***	***	***
Bio-Gide®	***	***	*	***
RESODONT®	**	*	***	***
GENTA-FOIL resorb®	**	n.s.	***	***
BioMend®	***	**	***	***
BioMend® Extend™	***	***	***	***
GORE-TEX®	n.s.	***	*	**

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 10: Signifikanzen zur Zellvitalität der USSC und HOB für die Kultivierungszeiträume Tag 1 bis 3 und Tag 3 bis 7.

p<0,0005) signifikante Vitalitätszunahmen auf. Auf den restlichen Membranen kam es zu weitestgehend signifikanten Vitalitätsabnahmen (p<0,05 bis p<0,0005).

Auf RESODONT® zeigten die HOB an Tag 3 (5.362±601 rfu) sowie auch an Tag 7 (10.354±2.595 rfu) die höchsten Zellvitalitäten Diese lagen signifikant über denen der USSC (p<0,0005; Tabelle 11).

	USSC mit HOB		
	Tag 1	Tag 3	Tag 7
Kontrolle	***	***	n.s.
Bio-Gide®	n.s.	***	*
RESODONT®	***	***	***
GENTA-FOIL resorb®	***	***	n.s.
BioMend®	***	*	n.s.
BioMend® Extend™	***	**	**
GORE-TEX®	***	***	***

* = p<0,05; ** = p<0,005; *** = p<0,0005; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 11: Signifikanzen zur Zellvitalität der USSC und HOB an den Tagen 1, 3 und 7.

3.2.2 Wertigkeitsdiagramm zur Zellvitalität

Das Wertigkeitsdiagramm zur Zellvitalität in Tabelle 12 erlaubt einen Überblick über die farblich dargestellte prozentuale Veränderung der Zellvitalität auf den sechs Membranen und einer Standardzellkulturoberfläche über die jeweiligen Zeitintervalle (Tag 1 bis 3, Tag 3 bis 7 und Tag 1 bis 7). Als Referenzwerte für die Standardzellkulturoberfläche bzw. Membranoberflächen dienen für Tag 1 bis 3 und für Tag 1 bis 7 die an Tag 1 ermittelten sowie für Tag 3 bis 7 die an

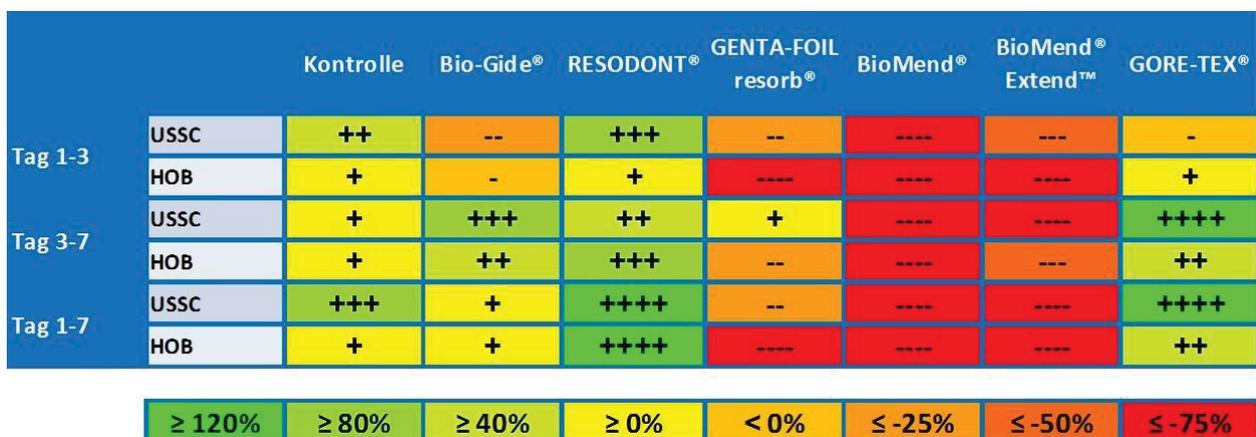


Tabelle 12: Wertigkeitsdiagramm zur Vitalität der USSC und HOB über die Zeiträume Tag 1 bis 3, Tag 3 bis 7 sowie Tag 1 bis 7.

Tag 3 ermittelten jeweiligen Vitalitätswerte. Grüne Farben stehen für eine Zunahme, gelbe für eine Stagnation und rote für eine Abnahme der Zellvitalität.

Unter allen Zellkulturen zeigten die USSC mit dreifach + auf RESODONT[®], dicht gefolgt von der Standardzellkulturoberfläche mit zweifach + zwischen Tag 1 und 3 die höchste Zellvitalität. Leicht positiv fiel sie auch in den mit HOB besiedeltem RESODONT[®], GORE-TEX[®] und der Standardzellkultur aus (einfach +). Auf den restlichen Membranen sank die Zellvitalität, wohingegen die geringsten Werte die USSC auf BioMend[®] und die HOB auf GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®] und BioMend[®] Extend[™] erreichten (jeweils vierfach -).

Zwischen Tag 3 und 4 zeigten beide Zellarten auf Bio-Gide[®], RESODONT[®], GORE-TEX[®] und auf der Standardzellkulturoberfläche sowie zusätzlich die USSC auf GENTA-FOIL resorb[®] eine Zunahme der Zellvitalität. Dabei waren die USSC auf GORE-TEX[®] am vitalsten (vierfach +), dicht gefolgt von den USSC auf Bio-Gide[®] und den HOB auf RESODONT[®] (jeweils dreifach +). In den übrigen Membrankulturen kam es zu Vitalitätsabnahmen, welche in den mit USSC besiedeltem BioMend[®] und BioMend[®] Extend[™] sowie mit HOB besiedeltem BioMend[®] am kräftigsten ausfielen (jeweils vierfach -).

Über die gesamte Versuchszeit von sieben Tagen zeigten sowohl die USSC als auch die HOB auf Bio-Gide[®], RESODONT[®], GORE-TEX[®] und der Standardzellkulturoberfläche Zunahmen ihrer Vitalität. Diese fiel auf RESODONT[®] zellartunabhängig und auf dem mit USSC kultiviertem GORE-TEX[®] am besten aus (jeweils vierfach +), dicht gefolgt von den USSC auf der Standardzellkulturoberfläche mit dreifach +. Auf GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®] und BioMend[®] Extend[™] wurden über denselben Zeitraum bei beiden Zellarten deutliche Vitalitätsverluste verbucht, welche sich bis auf die USSC auf GENTA-FOIL resorb[®] als vierfach – zeigten.

3.2.3 Vitalität pro Zelle auf den Membranen verglichen mit einer Standardzellkulturoberfläche

In Abbildung 11 ist die Vitalität pro Zelle gegen die Kultivierungszeit nach 24 Stunden sowie an Tag 3 und 7 dargestellt.

Nach 24 Stunden erreichten die HOB im Vergleich zu den USSC eine deutlich höhere Vitalität pro Zelle. Dabei erzielten die USSC mit 2,05 rfu pro Zelle auf Bio-Gide[®] die höchste und mit 0,34 rfu pro Zelle auf GENTA-FOIL resorb[®] die niedrigste Vitalität pro Zelle. In den HOB-Kulturen wurde die stärkste Vitalität pro Zelle auf BioMend[®] Extend[™] (2,69 rfu/Zelle) und die geringste auf GORE-TEX[®] (1,24 rfu/Zelle) gemessen.

Sowohl in den USSC- als auch in den HOB-Kulturen kam es über die gesamte Kultivierungszeit von 7 Tagen lediglich auf RESODONT[®] und GORE-TEX[®] (USSC auf RESODONT[®]: +0,35

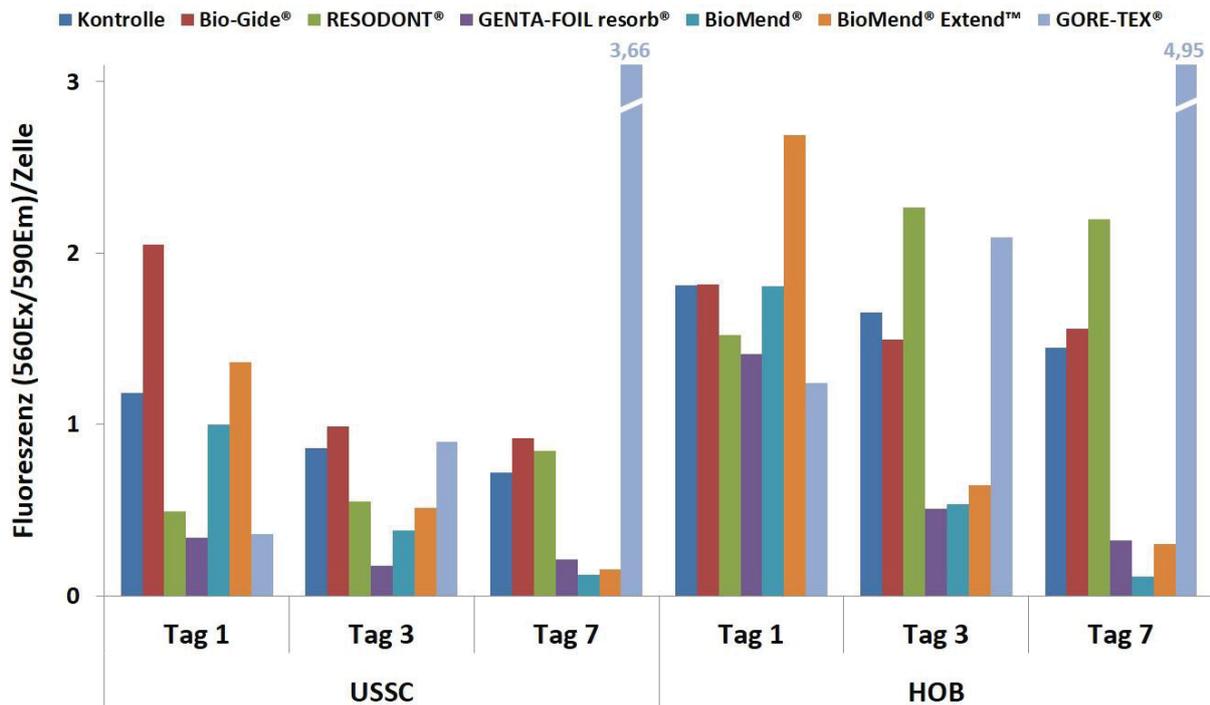


Abbildung 11: Vitalität pro Zelle der USSC und HOB auf einer Standardzellkulturoberfläche und den sechs Membranen nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen.

rfu/Zelle, USSC auf GORE-TEX®: +3,24 rfu/Zelle, HOB auf RESODONT®: +0,67 rfu/Zelle und HOB auf GORE-TEX®: +3,70 rfu/Zelle) zu einem Anstieg der Vitalität pro Zelle. In allen übrigen Zellkulturen nahm auf den restlichen vier getesteten Membranen über denselben Zeitraum die Vitalität pro Zelle wieder ab.

Somit zeigten an Tag 7 auf GORE-TEX® sowohl die USSC mit 3,60 rfu pro Zelle als auch die HOB mit 4,95 rfu pro Zelle die kräftigste Vitalität pro Zelle. Die geringste wurde mit 0,12 rfu pro Zelle in den USSC- und mit 0,11 rfu pro Zelle in den HOB-Kulturen auf BioMend® erfasst.

3.3 Zytotoxizität

Zur Ermittlung der von den Membranoberflächen ausgehenden zytotoxischen Wirkung auf die osteogen vordifferenzierten USSC und die HOB wurde die sich in den Kulturüberständen angereicherte LDH-Konzentration mittels CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay fluorometrisch bestimmt. Die Zytotoxizitätsbestimmung erfolgte auf den Membranen Bio-Gide®, RESODONT®, GENTA-FOIL resorb® und GORE-TEX® an den Tagen 3 und 7. Als Kontrolle diente eine Standardzellkulturoberfläche.

3.3.1 zytotoxische Wirkung der Membranoberflächen und der Standardzellkulturoberfläche

Die Zytotoxizität der USSC und HOB auf den vier Membranen und einer Standardzellkulturoberfläche an den Tagen 3 und 7 ist in Abbildung 12 ersichtlich.

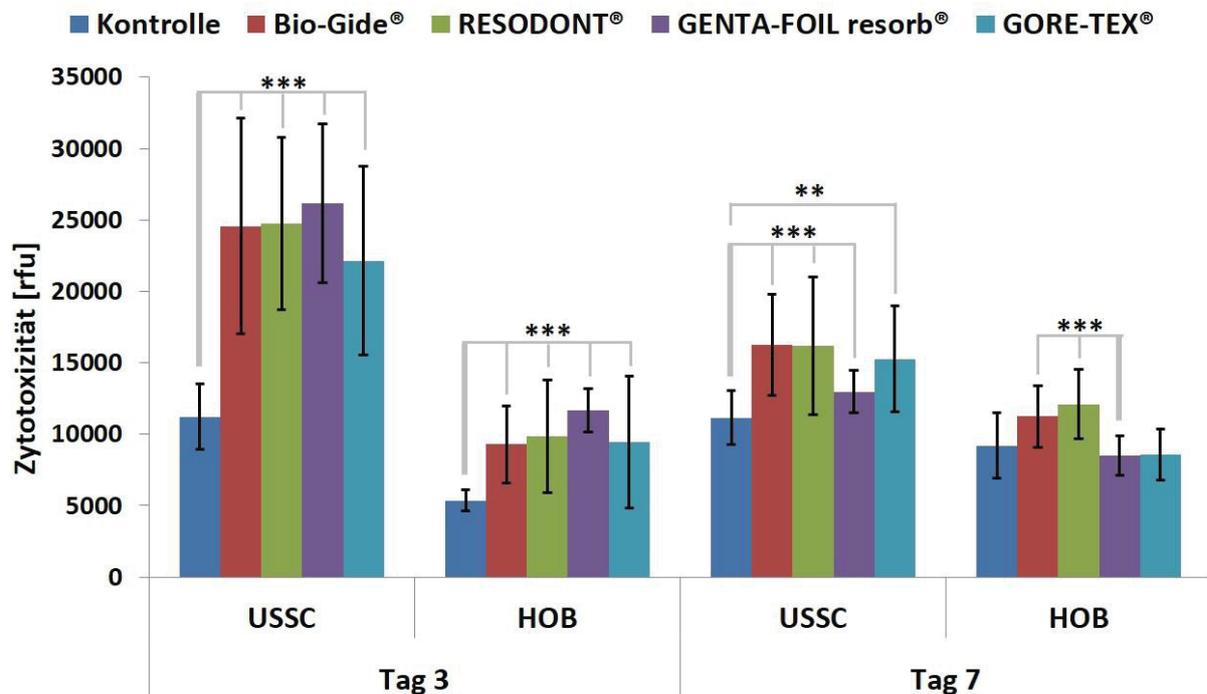


Abbildung 12: Zytotoxische Wirkung einer Standardzellkulturoberfläche und der vier Membranen auf die USSC und HOB nach 3 und 7 Tagen. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die niedrigsten gemessenen Zytotoxizitätswerte aller Ansätze des jeweiligen Tages anschaulich markiert als verbreiterte Linie. ** = $p < 0,005$ und *** = $p < 0,0005$

Bei beiden Zellarten zeigte sich, dass die von der Standardzellkulturoberfläche ausgehende Zytotoxizität (USSC: 11.207 ± 2.284 rfu und HOB: 5.347 ± 740 rfu) signifikant geringer war als die von den Membranen ($p < 0,005$ bis $p < 0,0005$). An Tag 3 lagen in den USSC-Kulturen signifikant höhere LDH-Konzentrationen vor als in den HOB-Kulturen ($p < 0,0005$; Tabelle 13). Nicht nur in den USSC- sondern auch in den HOB-Kulturen wies GENTA-FOIL resorb® (USSC: 26.159 ± 5.569 rfu und HOB: 11.686 ± 1.521 rfu) am selben Tag die höchste Zytotoxizität aller getesteten Membranen auf. Im Vergleich dazu waren die GORE-TEX®-Oberfläche mit 22.143 ± 6.632 rfu in den USSC-Kulturen und die Bio-Gide®-Oberfläche mit 9.279 ± 2.671 rfu in den HOB-Kulturen am geringsten zytotoxisch.

Zwischen Tag 3 und 7 nahm die LDH-Konzentration auf allen Membranoberflächen der USSC-Kulturen (Bio-Gide®: -8.324 rfu, RESODONT®: -8.550 rfu, GENTA-FOIL resorb®: -13.201 rfu und GORE-TEX®: -6.878 rfu) signifikant ab ($p < 0,0005$), auf der Standardzellkulturoberfläche

	USSC	HOB	USSC mit HOB	
	Tag 3 zu Tag 7	Tag 3 zu Tag 7	Tag 3	Tag 7
Kontrolle	n.s.	***	***	**
Bio-Gide®	***	*	***	***
RESODONT®	***	n.s.	***	**
GENTA-FOIL resorb®	***	***	***	***
GORE-TEX®	***	n.s.	***	***

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 13: Signifikanzen zur Zytotoxizität der USSC und HOB.

blieb sie jedoch mit 11.157 ± 1.875 rfu nahezu unverändert. An Tag 7 wurden auf allen getesteten Membranoberflächen in den USSC-Kulturen signifikant höhere LDH-Konzentrationen als in den HOB-Kulturen gemessen ($p < 0,005$ bis $p < 0,0005$). In den USSC-Kulturen zeigte die Kontrolloberfläche mit 11.157 ± 1.875 rfu die signifikant geringste Zytotoxizität ($p < 0,0005$). Zum selben Zeitpunkt wiesen die USSC unter den Membranoberflächen auf Bio-Gide® mit 16.250 ± 3.513 rfu und auf RESODONT® mit 16.186 ± 4.799 rfu die höchsten Zytotoxizitätswerte auf. Die geringsten wurden auf GENTA-FOIL resorb® mit 12.958 ± 1.478 rfu nachgewiesen.

Die LDH-Konzentration stieg in den HOB-Kulturen auf der Standardzellkulturoberfläche mit $+3.853$ rfu sowie auf Bio-Gide® mit $+1.970$ rfu über die letzten vier Versuchstage signifikant an ($p < 0,05$ bis $p < 0,0005$), während auf GENTA-FOIL resorb® eine signifikante Abnahme der LDH-Konzentration um -3.163 rfu erfolgte ($p < 0,0005$). In den HOB-Kulturen zeigte sich zum Versuchsende auf RESODONT® mit 12.098 ± 2.408 rfu unter Einbeziehung aller getesteten Oberflächen die höchste Zytotoxizität, wohingegen auf GENTA-FOIL resorb® mit 8.523 ± 1.387 rfu sowie auf GORE-TEX® mit 8.579 ± 1.783 rfu die niedrigsten Zytotoxizitätswerte nachgewiesen werden konnten. Die Standardzellkulturoberfläche war zeitgleich signifikant weniger zytotoxisch als die Bio-Gide®- und RESODONT®-Oberfläche ($p < 0,05$ bis $p < 0,005$).

3.3.2 Wertigkeitsdiagramme zur Zytotoxizität

Die Wertigkeitsdiagramme zur Zytotoxizität an Tag 3 und 7 (Tabelle 14) sowie zur Zytotoxizitätsveränderung zwischen Tag 3 und Tag 7 (Tabelle 15) geben einen farblich dargestellten Überblick wieder. Referenzwerte sind für Tag 3 bis 7 die an Tag 3 ermittelten Zytotoxizitätswerte der jeweiligen Membran- bzw. Standardzellkulturoberfläche. Grüne Farben kennzeichnen eine Abnahme, gelbe eine Stagnation und rote eine Zunahme der Zytotoxizität. An Tag 3 war die Zytotoxizität in den HOB-Membrankulturen deutlich geringer (zwischen einfach und zweifach +) als in den USSC-Membrankulturen (zwischen zweifach und dreifach -),

		Kontrolle	Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	GORE-TEX®
Tag 3	USSC	++	--	--	---	--
	HOB	++	+	+	++	+
Tag 7	USSC	++++	+++	+++	++	+++
	HOB	+++	++	++	+++	+++

≤ 6.000	≤ 10.000	≤ 14.000	≤ 18.000
≤ 22.000	≤ 26.000	≤ 30.000	≤ 34.000

Tabelle 14: Wertigkeitsdiagramm der von den Membranoberflächen ausgehenden zytotoxischen Wirkung in den USSC- und HOB-Kulturen an den Tagen 3 und 7.

		Kontrolle	Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	GORE-TEX®
Tag 3-7	USSC	+	++	++	+++	++
	HOB	----	--	--	++	+

≤ -60%	≤ -40%	≤ -20%	≤ 0%
> 0%	≥ 20%	≥ 40%	≥ 60%

Tabelle 15: Wertigkeitsdiagramm zur Zytotoxizitätsveränderung in den Zellkulturüberständen der USSC und HOB zwischen Tag 3 und 7.

Wohingegen sie sich in der Standardzellkultur zellartunabhängig mit zweifach + zeigte. Dabei fiel die Zytotoxizität neben der Standardzellkultur auch in der mit HOB besidelten GENTA-FOIL resorb®-Kultur am schwächsten aus. Die höchste Zytotoxizität zeigte sich mit dreifach - in der USSC-Kultur von GENTA-FOIL resorb®.

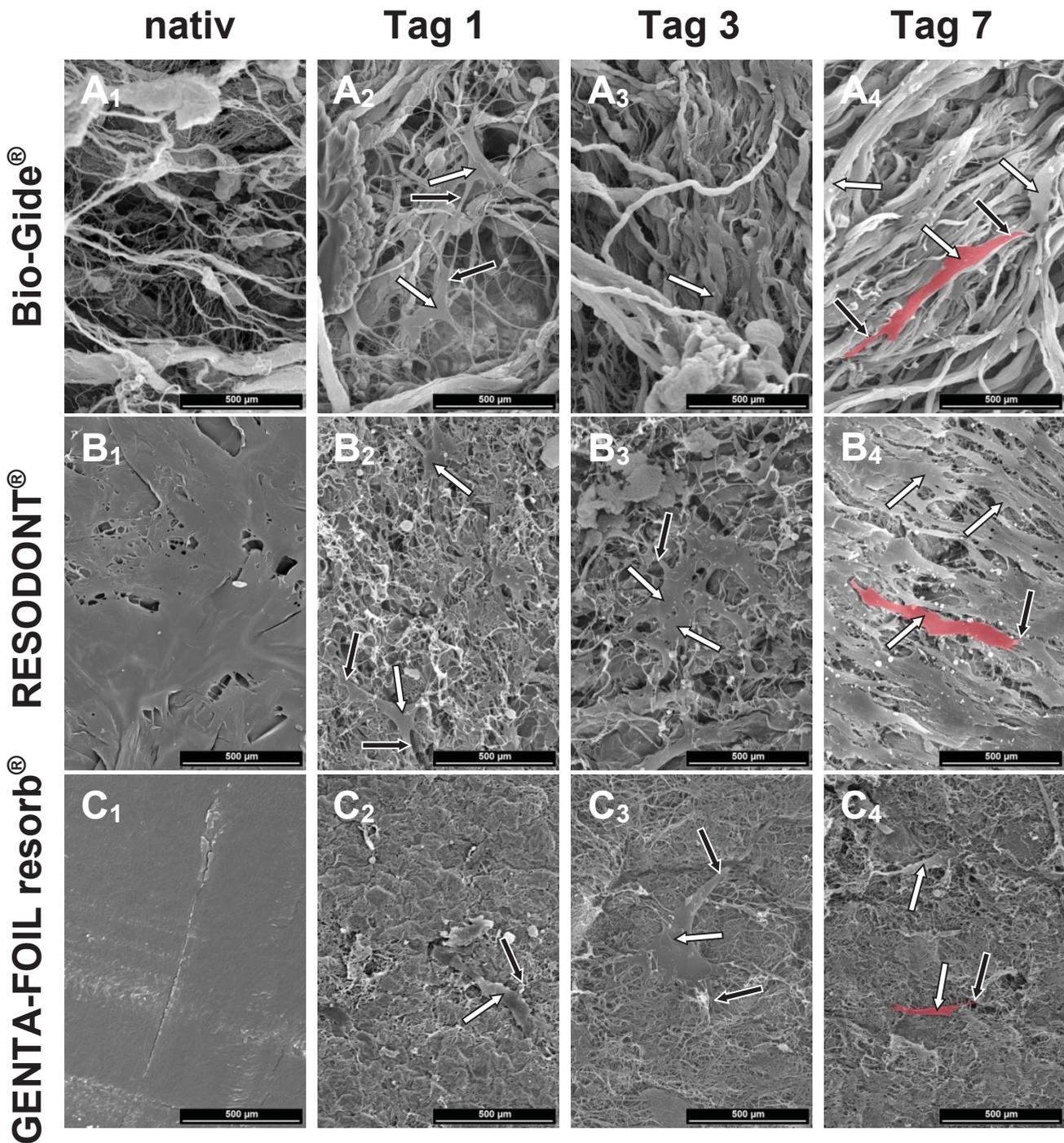
Zwischen Tag 3 und Tag 7 kam es in allen USSC-Kulturen zu Zytotoxizitätsabnahmen, welche in der GENTA-FOIL resorb®-Kultur mit dreifach + am stärksten und in der Standardzellkultur am geringsten ausfiel. In den HOB-Kulturen zeigten sich lediglich in den GENTA-FOIL resorb®- und GORE-TEX®-Kulturen Zytotoxizitätsrückgänge, wohingen in den Bio-Gide®, RESODONT®- und Standardzellkulturen Zytotoxizitätszunahmen verzeichnet wurden. In letztgenannter lag die Zytotoxizität mit vierfach – am höchsten.

Im Vergleich zum Tag 3 war die Zytotoxizität zum Versuchsende nach 7 Tagen in allen Kulturen deutlich geringer. Sie lag in der Standardzellkultur mit vierfach + am tiefsten und in den USSC-Kulturen von GENTA-FOIL resorb® sowie den HOB-Kulturen von Bio-Gide® und RESODONT® mit jeweils zweifach + am höchsten.

3.4 Membranoberfläche und Zellmorphologie

Zur Analyse der Zellmorphologie wurden Bilder der kultivierten Membranoberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop angefertigt. Als Kontrolle dienten die unbesiedelten nativen Membranoberflächen.

3.4.1 native- und mit USSC besiedelte Membranoberflächen



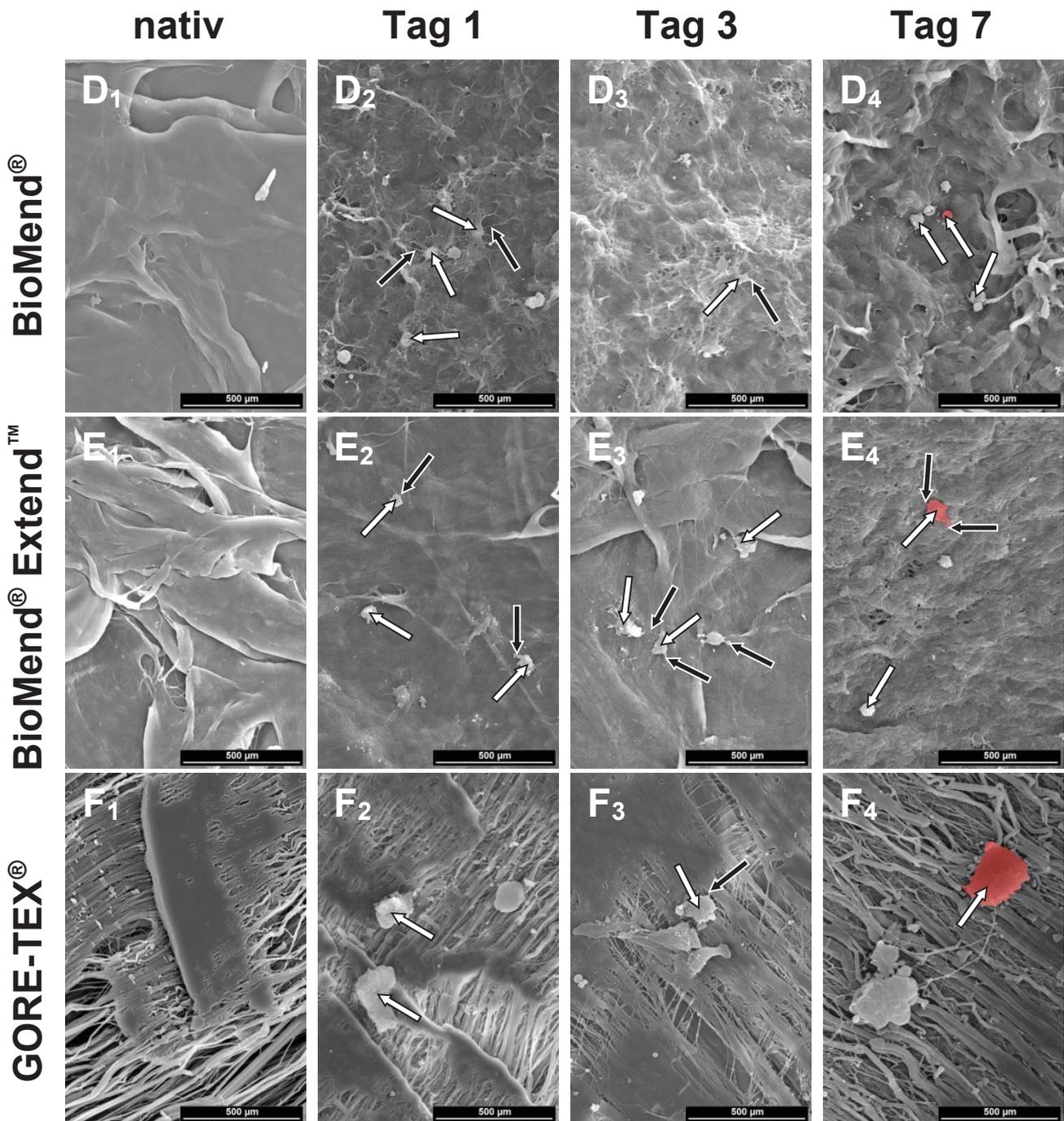


Abbildung 13: Darstellung der nativen- und mit osteogen vordifferenzierten USSC besiedelten Membranoberflächen nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen bei 500-facher Vergrößerung. Teilweise sind die USSC durch Ablagerungen auf der Zellmembran erkennbar. Für Tag 7 wurde beispielhaft eine Zelle bzw. deren Rest in Rot hervorgehoben. Es befanden sich noch weitere Zellen auf den Membranen. weiße Pfeile: Zellen; schwarze Pfeile: Zellausläufer

Die einseitig raue Oberfläche der Bio-Gide®-Membran ist von locker aneinanderliegenden Kollagenfasern unterschiedlicher Stärke und Länge geprägt (Abbildung 13A₁). Hierdurch bilden sich Poren unterschiedlicher Größe. Nach 24 Stunden bilden die USSC lange Zellausläufer, die sich an die Kollagenfasern der Bio-Gide®-Membran anheften (Abbildung 13A₂). Über die

Kultivierungszeit von 7 Tagen richten sich die Zellen entlang der Kollagenfasern aus, erscheinen langgestreckter und mit sichtbar weniger Zellausläufern (Abbildung 13A₄).

Im Vergleich zur Bio-Gide®-Membran besitzen die restlichen fünf Membranen RESODONT®, GENTA-FOIL resorb®, BioMend®, BioMend® Extend™ und GORE-TEX® in nativer Form eine weitestgehend glatte Oberfläche.

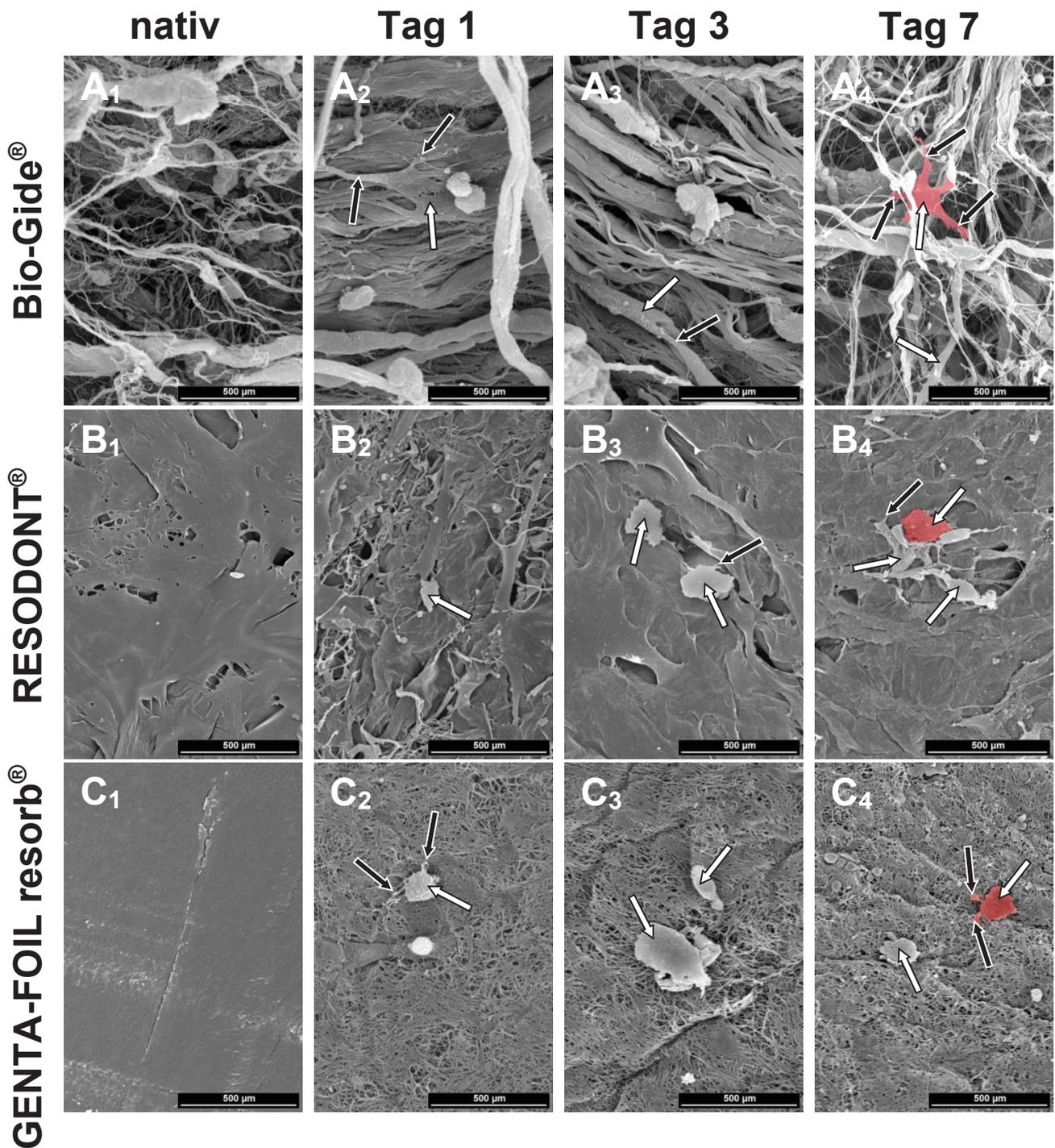
Über eine Kultivierungszeit von 7 Tagen verändert sich die RESODONT®-Oberfläche (Abbildung 13B₁ bis B₄). Nach 24 Stunden zeigt die nativ glatt erscheinende RESODONT®-Membran eine schwammartig aufgetriebene, poröse Oberfläche (Abbildung 13B₂). Die USSC bilden lange Zellausläufer, die sich an die zum Vorschein getretenen Kollagenfasern anlagern (Abbildung 13B₂). Nach siebentägiger Kultivierung ist ein dichter Zellrasen entstanden (Abbildung 13B₄). Die Zellen haben sich weitestgehend parallel ausgerichtet, wodurch sie eine längliche Form mit kurzen Zellausläufern angenommen haben.

Wie RESODONT® bildet auch GENTA-FOIL resorb® über eine Kultivierungszeit von 7 Tagen eine schwammartige, poröse Oberfläche aus, welche jedoch nicht ganz so deutlich ausfällt. Auf GENTA-FOIL resorb® zeigen sich nach 24-stündiger Kultivierung länglich ausgestreckte USSC mit nur wenigen kurzen Zellausläufern (Abbildung 13C₂). Bis Tag 3 nimmt ihre Zellgröße zu und sie erscheinen jetzt sternförmig mit mehreren langen Zellausläufern (Abbildung 13C₃). Ab Tag 3 zeigt die GENTA-FOIL resorb®-Oberfläche eine Zunahme der porigen, faserigen Membranstruktur (Abbildung 13C₃ und C₄). Nach 7 Tagen erscheinen die USSC langgestreckter und kleiner mit nur wenigen kurzen Zellausläufern (Abbildung 13C₄).

Im Vergleich zu den anderen Kollagenmembranen zeigen sowohl BioMend® (Abbildung 13D₁ bis D₄) als auch BioMend® Extend™ (Abbildung 13E₁ bis E₄) über eine Kultivierungszeit von 7 Tagen fast keine Veränderung der Oberfläche. Darüber hinaus sind über den gesamten Kultivierungszeitraum nur schwach adhärierende USSC mit wenigen kurzen Zellausläufern nachweisbar.

Lediglich auf der nativen GORE-TEX®-Membran treten zur glatten Membranoberfläche teilweise parallel verlaufende, in der Ebene verbleibende, kollagenähnliche PTFE-Fasern hervor (Abbildung 13F₁). Über die gesamte Versuchszeit von 7 Tagen finden sich nur wenige adhärierende USSC, die nahezu keine Zellausläufer ausgebildet haben (Abbildung 13F₂ bis F₄).

3.4.2 native- und mit HOB besiedelte Membranoberflächen



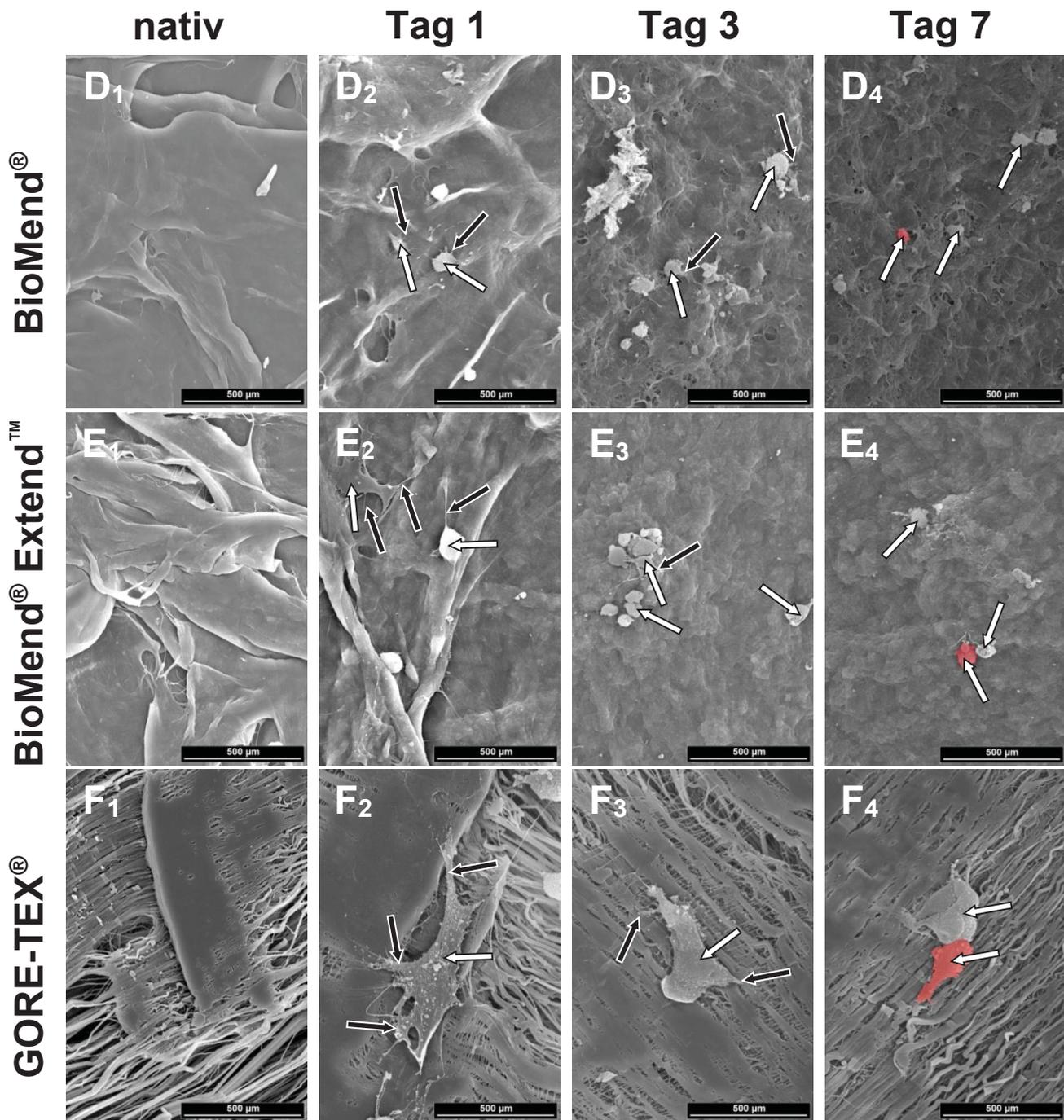


Abbildung 14: Darstellung der nativen- und mit HOB besiedelten Membranoberfläche nach 24 Stunden, 3 und 7 Tagen bei 500-facher Vergrößerung. Teilweise sind die HOB durch Ablagerungen auf der Zellmembran erkennbar. Für Tag 7 wurde beispielhaft eine Zelle bzw. deren Rest in Rot hervorgehoben. Es befanden sich noch weitere Zellen auf den Membranen. weiße Pfeile: Zellen; schwarze Pfeile: Zellausläufer

In Abbildung 14A₁ ist erneut die einseitig durch Kollagenfasern gebildete raue Oberfläche der nativen Bio-Gide®-Membran dargestellt. Die HOB-Zellen weisen nach 24 Stunden längliche, sich an die Kollagenfasern anhaftende Zellausläufer auf (Abbildung 14A₂). Bis zum Tag 7 bleibt ihre Morphologie nahezu unverändert (Abbildung 14A₄).

Die bis zum 3. Tag auf RESODONT® kultivierten HOB weisen zunächst eine kleine rundliche Form auf (Abbildung 14B₂ und B₃). Ihre Morphologie ändert sich anschließend bis zum 7. Tag zu einer eher länglichen Zellgestalt mit kurzen Zellausläufern (Abbildung 14B₄).

Sowohl auf den GENTA-FOIL resorb®- (Abbildung 14C₁ bis C₄) als auch auf den BioMend®- (Abbildung 14D₁ bis D₄) und den BioMend® Extend™ Oberflächen (Abbildung 14E₁ bis E₄) sind über den gesamten Kultivierungszeitraum von 7 Tagen schwach adhärierende HOB mit nur wenigen kurzen Zellausläufern nachweisbar.

Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden lassen sich auf GORE-TEX® vereinzelt adhärente HOB mit vielen langen Zellausläufern erkennen (Abbildung 14F₂). Mit zunehmender Kultivierungsdauer (bis zum 7. Tag) nimmt die Größe der HOB ab, ebenso verringert sich die Zahl und Länge ihrer Zellausläufer (Abbildung 14F₄).

3.5 Membranranking

USSC:

		Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	BioMend®	BioMend® Extend™	GORE-TEX®
Attachment	nach 24h	1	2	6	2	2	2
	Tag 1-3	2	1	2	5	4	5
Zellproliferation	Tag 3-7	1	2	3	6	3	3
	Tag 1-3	3	1	3	6	5	2
Zellvitalität	Tag 3-7	2	3	4	5	5	1
	Tag 3-7	2	2	1			2
Zytotoxizität	Tag 3-7	2	2	1			2

Tabelle 16: Membranranking für die USSC

HOB:

		Bio-Gide®	RESODONT®	GENTA-FOIL resorb®	BioMend®	BioMend® Extend™	GORE-TEX®
Attachment	nach 24h	1	1	1	1	5	5
	Tag 1-3	1	2	3	6	3	3
Zellproliferation	Tag 3-7	2	1	3	4	4	4
	Tag 1-3	3	1	4	4	4	1
Zellvitalität	Tag 3-7	2	1	4	6	5	2
	Tag 3-7	3	3	1			2
Zytotoxizität	Tag 3-7	3	3	1			2

Tabelle 17: Membranranking für die HOB

4 DISKUSSION

Ziel diese *in vitro* Studie war es, aus den sechs medizinisch zugelassenen Membranen Bio-Gide[®], RESODONT[®], GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™] und GORE-TEX[®] die biokompatibelste zu ermitteln. Dazu wurden an humanen, ossär vordifferenzierten USSC und HOB das Attachment, die Proliferation, die Zellvitalität sowie die in den Zellkulturen auftretende Zytotoxizität über einen Zeitraum von sieben Tagen ermittelt. Als Kontrolle diente eine Standardzellkulturoberfläche einbezogen. Ferner wurde die Zellmorphologie auf den Membranen im REM analysiert.

Da die in dieser Studie verwendeten Bio-Gide[®]-Membranen unsteril vorlagen, wurden sie unsererseits mit einer Dosis von 25,0kGy gamma-sterilisiert. Hierdurch ergaben sich aus unserer Sicht weder Vor- noch Nachteile in den Versuchsabläufen und Messungen.

Unter den verwendeten Membranen erweist sich Bio-Gide[®] als die bisweilen weltweit am häufigsten eingesetzte Membran bei der GTR, GBR und dem TE (Marinucci *et al.*, 2003; Kasaj *et al.*, 2008; Warnke *et al.*, 2009; Gassling *et al.*, 2013).

Um eine ideale Biokompatibilität der Membranen, die sich durch ein gutes Zellwachstum auf dieser zeigt, zu erreichen, ist es erforderlich, deren Oberfläche an die jeweils verwendete Zellart anzupassen (McNamara *et al.*, 2010). Bereits Warnke *et al.* konnten bei der Kultivierung von humanen Periostzellen nachweisen, dass Kollagenmembranen fürs TE von Knochen als mögliche *Scaffolds* geeignet sind (Warnke *et al.*, 2009). Auch für die GBR zeigte sich Bio-Gide[®] *in vitro* als gut geeignet (Liu *et al.*, 2011). Jedoch erwiesen sich als *Scaffold* dienende *Platelet Rich Fibrin*-Membranen (PRF-Membran) bei der Kultivierung von humanen Periostzellen (Gassling *et al.*, 2010) und HOB (Gassling *et al.*, 2013) im Vergleich zu Bio-Gide[®] als besser geeignet.

Andererseits konnten Schwarz *et al.* *in vivo* nachweisen, dass das Zellwachstum auf einer Membran nicht nur von der Materialwahl und deren Oberflächenbeschaffenheit abhängig ist, sondern auch von dem Applikationsort, der Applikationszeit sowie dem Alter und Gesundheitszustand des Patienten (Schwarz *et al.*, 2006). Aus diesem Grund lassen sich die hier *in vitro* gewonnenen Ergebnisse nur bedingt auf eine mögliche *in vivo* Anwendung übertragen und müssten sich erst in einem lebenden Organismus beweisen.

4.1 Zellproliferation

Das CyQuant[®] Cell Proliferation Assay Kit zur Bestimmung der Zellzahl in einer Kultur hat sich bereits in vielen Studien bewährt und ermöglichte in dieser Studie die photometrische

Bestimmung der Zellzahl auf den Membranen und der Standardzellkulturoberfläche (Zhu *et al.*, 2009; Liu and Leung, 2015).

Sowohl das Attachment der USSC als auch das der HOB auf den sechs Membranen Bio-Gide[®], RESODONT[®], GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™] und GORE-TEX[®] zeigte sich signifikant schlechter als auf einer Standardzellkulturoberfläche ($p < 0,0005$). Demzufolge können beide Zellarten auf der Standardzellkulturoberfläche besser adhären als auf den getesteten Membranoberflächen. Obwohl beide Zellarten auf der Standardzellkulturoberfläche ein nahezu identisches Attachment aufwiesen erreichten die HOB verglichen mit den USSC auf den sechs Membranen ein signifikant höheres Attachment ($p < 0,05$ bis $p < 0,0005$; Abbildung 7). Dies spricht zu Gunsten der HOB für eine bessere Anpassungsfähigkeit an die jeweilige Membranoberfläche. Unter allen Membrankulturen erreichten die HOB auf Bio-Gide[®], nicht signifikant gefolgt von RESODONT[®], das höchste Attachment. Ebenfalls wurde unter ausschließlicher Betrachtung der USSC-Membrankulturen das höchste Attachment auf Bio-Gide[®], signifikant gefolgt von RESODONT[®], erzielt ($p < 0,05$). Auf den restlichen vier Membranen lag das Attachment zumeist signifikant darunter. Somit zeigten sich Bio-Gide[®] und RESODONT[®] für die Anheftung von USSC und HOB besser geeignet als die restlichen getesteten Membranoberflächen. Tabelle 9 bestätigt diese Ergebnisse im Wertigkeitsdiagramm zum Attachment.

Vergleichbare Ergebnisse konnte bereits eine Studie von Marinucci *et al.* aus dem Jahr 2001 liefern, in der ebenfalls das Attachment von HOB auf resorbierbaren und nicht resorbierbaren Membranen evaluiert wurde. Darin zeigte sich, dass im Vergleich zu resorbierbaren Membranen aus Hyaluronsäure bzw. nicht resorbierbaren Membranen aus ePTFE, resorbierbare Membranen aus Kollagen oder *Poly-D,L-Lactid* ein signifikant besseres Attachment aufweisen (Marinucci *et al.*, 2001). Auch Kasaj *et al.* konnten *in vitro* an humanen Gingivafibroblasten, periodontalen Ligamentzellen sowie osteoblastenähnlichen Zellen nachweisen, dass resorbierbare Membranen ein besseres Attachment beinhalten als nicht resorbierbare Membranen (Kasaj *et al.*, 2008). Trotzdem lassen sich diese Erkenntnisse nur bedingt mit unseren HOB-Attachmentergebnissen vergleichen, da sich auf den drei Kollagenmembranen Bio-Gide[®], RESODONT[®] und BioMend[®] ein besseres Attachment als auf GORE-TEX[®] zeigte, zeitgleich jedoch GENTA-FOIL resorb[®] und BioMend[®] Extend[™] ein schlechteres Ergebnis lieferten. Ebenso wie in dieser Arbeit erwies sich in einer Studie von Rothamel *et al.* aus dem Jahr 2004 BioMend[®] für die Adhärenz von humanen osteoblastenähnlichen Zellen als eher ungeeignet (Rothamel *et al.*, 2004). Darüber hinaus ließ sich auf mit *Platelet Rich Plasma* überzogenen Membranen - verglichen mit ihrer nativen Form - bei einer Kultivierung mit humanen Periodontalligament- und humanen Gingivafibroblasten ein signifikant besseres Attachment erkennen (Chang *et al.*, 2007). In einer Studie über antibakterielle Membranen konnten Ye *et al.* nachweisen, dass osteoblastenähnliche Zellen auf einer silberhaltigen Membran, wie der Ag-nHA-nTiO(2)/PA66-Membran, verglichen mit einer nicht

silberhaltigen Membran, wie der nHA/PA66-Membran und einer e-PTFE-Membran, kein besseres Attachment erzielten (Ye *et al.*, 2011).

Auf der Standardzellkulturoberfläche zeigten die USSC und HOB im Anschluss an die Attachmentphase bis zum Tag 7 die höchsten Zellzahlzunahmen. Diese verlief bei den USSC signifikant kräftiger ($p < 0,0005$), so dass die USSC an Tag 7 eine nahezu doppelt so hohe Zellzahl aufwiesen wie die HOB (Abbildung 8). Dies spricht für ein schnelleres Proliferationsverhalten der USSC im Vergleich zu den HOB und kann möglicherweise auf die weiter fortgeschrittene Differenzierung der HOB zurückgeführt werden. Ebenso kann das drei Tage vor Versuchsbeginn den USSC verabreichte Differenzierungsmedium DAG mit daraus resultierender vorzeitig einsetzender Mineralisation als weitere Erklärung angesehen werden (Kulterer *et al.*, 2007).

Zwischen Tag 1 und 7 kam es in beiden Zellkulturen sowohl auf Bio-Gide® als auch auf RESODONT® zu signifikanten Zellzahlzunahmen ($p < 0,05$ bis $p < 0,0005$), wohingegen die übrigen getesteten Membranen, mit Ausnahme der USSC auf GENTA-FOIL resorb®, signifikante Zellzahlabnahmen verzeichneten ($p < 0,0005$). So erzielten die USSC und HOB auf Bio-Gide® und RESODONT® sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 signifikant höhere Zellzahlen verglichen mit den übrigen getesteten Membranen (Abbildung 8; $p < 0,0005$). Dies spricht in erster Linie für bessere Wachstumsbedingungen auf diesen beiden Membranen und zeichnet sie somit unter den sechs getesteten Membranen für die Kultivierung von USSC und HOB für die geeignetsten aus. Unter allen Membrankulturen wiesen die USSC an Tag 7 die signifikant höchste Zellzahl auf Bio-Gide® auf ($p < 0,05$). Obwohl die HOB das bessere Attachment auf den Membranen vorweisen konnten, zeigten die USSC und HOB vor allem auf Bio-Gide® das beste Proliferationsverhalten. Dies spiegelt sich ebenso im Wertigkeitsdiagramm wieder (Tabelle 9).

Das gute Proliferationsverhalten beider Zellarten auf Bio-Gide® und RESODONT® ist vermutlich auf ihre raue Membranoberfläche (Abbildung 13 und 14) sowie auf ihre Kollagenzusammensetzung zurückzuführen. Bio-Gide® enthält als einzige der verwendeten Membranen eine Mischung aus Kollagen Typ I und III, während die anderen getesteten xenogenen Membranen vollständig aus Kollagen Typ I bestehen. Möglicherweise geht vom Kollagen Typ III ein positiver Einfluss auf die Zellproliferation von USSC und HOB aus. Bereits 2004 wiesen Rothamel *et al.* in einer Studie zu Biomembranen ebenfalls auf Bio-Gide® die stärksten Proliferationswerte, hier jedoch von Osteoblasten, nach (Rothamel *et al.*, 2004). Auch bewiesen Liu *et al.* bei der Kultivierung humaner MSC, dass Bio-Gide® als Kulturoberfläche eine gute Biokompatibilität besitzt (Liu *et al.*, 2011). Dies verdeutlicht die Kultivierungsabhängigkeit der jeweiligen Zellart zur Oberfläche und der Materialbeschaffenheit. Desgleichen zeigten sich auf den nicht quervernetzten Kollagenmembranen Bio-Gide® und Mucograff® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen / CH) bei der Kultivierung von HOB auf erstgenannter Membran höhere Zellzahlenanstiege (Willershausen *et al.*, 2014). Humane Periostzellen auf Kollagenmembranen über eine Kultivierungszeit von sieben Tagen erreichten ebenfalls eine gute Proliferation (Warnke

at al., 2009). Auch bei der Kultivierung von humanen Periodontalligamentfibroblasten ließ sich auf Bio-Gide® nach 7 Tagen die höchste Zellzahl messen, gefolgt von OSSIX® (OraPharma Inc., Horsham / USA) und Tutodent®. Die geringste Zellzahl zeigte sich ähnlich wie bei uns auf BioMend®. Dort waren nach 7 Tagen keine humanen osteoblastenähnliche Zellen mehr zu erkennen, was sie für eine Kultivierung ungeeignet macht (Rothamel *et al.*, 2004). Jedoch konnten Wiedmann-Al-Ahmad *et al.* in einer *in vitro* Studie, bei der sechzehn unterschiedliche Biomaterialien fürs TE getestet wurden, nachweisen, dass humane osteoblastenähnliche Zellen sehr wohl auf BioMend® adhären und wachsen (Wiedmann-Al-Ahmad *et al.*, 2005). Auch wenn BioMend® bei letztgenannter Studie zu den vier besten Biomaterialoberflächen zählte, konnten wir durch unsere Studie nachweisen, dass BioMend® unter den kommerziell erhältlichen Membranen eher nicht für eine Kultivierung von USSC und HOB geeignet ist. Andererseits wurde eine verminderte Proliferation von Stammzellen auf BioMend® bereits von mehreren Autoren bestätigt (Takata *et al.*, 2001; Rothamel *et al.*, 2004). Die schlechte Zellproliferation auf BioMend® und BioMend® Extend™ sehen verschiedene Autoren in dem zur Quervernetzung verwendeten Glutaraldehyd, da dieses sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweislich die Biokompatibilität negativ beeinflusst und vermehrt zytotoxisch wirkt (Speer *et al.*, 1980; Wiebe *et al.*, 1988).

Im Vergleich zu Bio-Gide® konnten jedoch Gassling *et al.* nachweisen, dass PRF-Membranen bei der Kultivierung humaner Periostzellen (Gassling *et al.*, 2010) sowie auch HOB (Gassling *et al.*, 2013) signifikant bessere Zellproliferationen erzielen. Ebenso erwies sich die Zellproliferation von osteoblastenähnlichen Zellen auf Bio-Gide® verglichen mit der porcinen Perikardmembran Remotis® (Thommen Medical AG, Grenchen / CH) über einen Kultivierungszeitraum von sieben Tagen als signifikant schwächer (Rothamel *et al.*, 2012).

Darüber hinaus zeigte sich das Waschen und Anfeuchten einer Membran vor der Zellbesiedelung für die später erzielte Zellzahl von Vorteil (Liu *et al.*, 2011). Andererseits wurde *in vivo* bereits die hohe Biokompatibilität von Bio-Gide® nachgewiesen, da ihre Integration in das umgebende Gewebe entzündungsfrei ablief. Bio-Gide® ermöglicht so eine frühzeitige Gefäßsprossung in den Defektbereich, wodurch die Knochenheilung unterstützt wird (Rothamel *et al.*, 2012).

Bei der Suche nach einem geeigneten *Scaffold* fürs TE von Knochen erfolgte das Wachstum von Ratten-MSC auf Bio-Gide® schwächer als auf TissuFleece E (Baxter AG, Wien / AT) und war vergleichbar mit Tutodent® (Zimmer Dental GmbH, Freiburg / D) (Gierloff *et al.*, 2014). Ebenso zeigten aus dem Fettgewebe von Ratten isolierte Stammzellen auf Bio-Gide® eine höhere Zellproliferation im Vergleich zu Tutodent® (Açil *et al.*, 2014). Jedoch wurden bei der Kultivierung mit humanen osteoblastenähnlichen Zellen auf Bio-Gide® ähnlich hohe Zellzahlen erzielt wie auf Tutodent® (Rothamel *et al.*, 2004).

4.2 Zellvitalität

Bereits in vielen Studien kam der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay zur Ermittlung der Zellvitalität in Zellkulturen erfolgreich zum Einsatz (Maduray *et al.*, 2011; Genov *et al.*, 2016).

Mit ihm konnten wir nachweisen, dass USSC und HOB auf der Standardzellkulturoberfläche zu jedem Messzeitpunkt signifikant höhere Zellvitalitätswerte erzielen als auf den sechs getesteten Membranen Bio-Gide®, RESODONT®, GENTA-FOIL resorb®, BioMend®, BioMend® Extend™ und GORE-TEX® ($p < 0,0005$; Abbildung 10). Somit zeigte sich erneut die Standardzellkulturoberfläche zur Kultivierung von USSC und HOB besser geeignet als die evaluierten Membranoberflächen. Im Vergleich zu den USSC lag die Zellvitalität der HOB auf der Standardzellkulturoberfläche nach 24 Stunden signifikant höher ($p < 0,0005$), stieg jedoch in den USSC-Kulturen bis Tag 7 signifikant an ($p < 0,0005$). Auch wenn die HOB nach ihrer Attachmentphase auf der Standardzellkulturoberfläche vitaler als die USSC waren, so zeigten beide Zellarten an Tag 7 eine ähnlich hohe Zellvitalität. Die Vitalitätszunahmen beider Zellarten erfolgten auf der Standardzellkulturoberfläche über die gesamte Kultivierungszeit von 7 Tagen signifikant ($p < 0,0005$; Tabelle 10 und 12).

In den sechs Membrankulturen zeigten beide Zellarten nach 24 Stunden auf Bio-Gide® eine nahezu identische Zellvitalität, welche in den USSC-Kulturen signifikant über den übrigen getesteten Membranen ($p < 0,0005$) und in den HOB-Kulturen signifikant über GENTA-FOIL resorb®, BioMend®, BioMend® Extend™ und GORE-TEX® ($p < 0,05$) lag (Abbildung 10). Dies verdeutlicht erneut, wie bereits die Ergebnisse der Proliferation gezeigt haben, dass Bio-Gide® während der Attachmentphase ideale Kultivierungsvoraussetzungen für USSC und HOB bietet. In allen USSC-Membrankulturen konnte auch an Tag 3 und 7 die signifikant höchste Zellvitalität auf Bio-Gide® gemessen werden ($p < 0,005$ bis $p < 0,0005$). Signifikante Zellvitalitätsanstiege über die gesamte Kultivierungsdauer der USSC-Membranen erfolgten lediglich auf RESODONT® ($p < 0,005$) und GORE-TEX® ($p < 0,0005$; Tabelle 12). Im Gegensatz hierzu kam es bei beiden Zellarten auf Bio-Gide® zwischen Tag 1 und 3 zu einem signifikanten Zellvitalitätsrückgang ($p < 0,0005$), auf den jedoch bis zum Versuchsende wieder ein signifikanter Zellvitalitätsanstieg folgte ($p < 0,0005$). Auf den weiteren getesteten Membranen GENTA-FOIL resorb®, BioMend® und BioMend® Extend™ zeigten die USSC zumeist signifikante Zellvitalitätsabnahmen. Somit liefern Bio-Gide® und RESODONT® im Vergleich zu den übrigen getesteten Membranen auch für die Kultivierung von USSC bis zum 7. Kultivierungstag beste Bedingungen. In den HOB-Kulturen ließ sich ein anderes Bild erkennen. Obwohl an Tag 1 in den HOB-Kulturen auf Bio-Gide® noch die höchste Zellvitalität gemessen wurde, zeigte sich diese sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 auf RESODONT® signifikant am höchsten ($p < 0,0005$). Abgesehen von dem Vitalitätseinbruch der HOB auf Bio-Gide® zwischen Tag 1 und 3 erfolgten auf Bio-Gide®, RESODONT® und GORE-

TEX[®] über die gesamte Versuchszeit signifikante Anstiege der Zellvitalität ($p < 0,05$ bis $p < 0,0005$). Auf allen weiteren Membranen nahm die Zellvitalität signifikant ab ($p < 0,005$ bis $p < 0,0005$). Somit erwies sich RESODONT[®] nach der Attachmentphase in den folgenden sechs Kultivierungstagen für das Zellwachstum der HOB als besser geeignet. Auch zeigten sich die drei Membranen GENTA-FOIL resorb[®], BioMend[®] und BioMend[®] Extend[™] für die Kultivierung von USSC und HOB bezogen auf ihre gewonnenen Vitalitätsergebnisse als eher ungeeignet. Dies spiegelt auch das Wertigkeitsdiagramm wieder (Tabelle 12). GORE-TEX[®] hingegen erreichte eine vergleichbare Zellvitalität zu Bio-Gide[®] und RESODONT[®].

Die unterschiedlichen Zellvitalitätswerte der USSC und HOB auf den Membranen während des gesamten Versuchszeitraums von sieben Tagen sind in erster Linie auf die unterschiedliche Biokompatibilität der Membranen zurückzuführen. Die Ursache der verminderten Zellvitalität auf BioMend[®] und BioMend[®] Extend[™] ist vermutlich in der chemischen Vorbehandlung zur Quervernetzung mittels Glutaraldehyd zu suchen. So berichteten bereits mehrere verschiedene Forschungsgruppen über Biokompatibilitätseinbußen der Membranen nach deren Quervernetzung (Kodama *et al.*, 1989; Minabe *et al.*, 1989; Rothamel *et al.*, 2004). Im Falle von GENTA-FOIL resorb[®] kann das in der Membran vorhandene und mit der Zeit austretende Gentamicin für die Abnahme der Zellvitalität mit verantwortlich sein. Möglicherweise wurden von der GORE-TEX[®]-Membran während der Zellkultivierung Substanzen freigesetzt, die den CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay positiv beeinflussen und so eine gute Zellvitalität vortäuschten. Andererseits hat sie, da sie komplett synthetisch ist, ähnlich wie die Standardzellkulturoberfläche eine äußerst geringe zytotoxische Wirkung auf die Zellen.

Ein vergleichbares Ergebnis konnten Açı̇l *et al.* an isolierten Stammzellen aus dem Fettgewebe von Ratten liefern. Diese zeigten sich, ähnlich wie in unserer Studie, bei der Kultivierung auf Bio-Gide[®] im Vergleich zu Tutodent[®] (Zimmer Dental GmbH, Freiburg / D) vitaler (Açı̇l *et al.*, 2014). Ebenso konnten Marinucci *et al.* nachweisen, dass Membranen auf Basis von Kollagen und Chondroitinsulfat biokompatibler sind als Membranen aus reinem Kollagen (Marinucci *et al.*, 2003). Demgegenüber lieferte *in vitro* eine PRF-Membran im Vergleich zu Bio-Gide[®] bei der Besiedelung mit humanen Periostzellen (Gassling *et al.*, 2010) wie auch mit HOB höhere Zellvitalitätswerte (Gassling *et al.*, 2013). Auch war zu erkennen, dass osteoblastenähnliche Zellen auf silberhaltigen Membranen, wie bspw. die Ag-nHA-nTiO(2)/PA66 Membran, verglichen mit der silberlosen Membran nHA/PA66 sowie einer e-PTFE-Membran, eine signifikant geringere Zellvitalität aufwiesen (Ye *et al.*, 2011).

Bis auf die Bio-Gide[®]-HOB-Kulturen lag die Vitalität pro Zelle nach der Attachmentphase in allen HOB-Kulturen - die Standardzellkulturen mit einbegriffen - über denen der USSC (Abbildung 11). Diese Ergebnisse resultieren aus einer ähnlich hohen Vitalität beider Zellarten an Tag 1 bei entsprechend geringerer Zellzahl der HOB zu den USSC an selbigem Tag. Sowohl in den USSC- als auch in den HOB-Kulturen kam es bis Tag 7 auf RESODONT[®] zu einem sichtbaren sowie auf

GORE-TEX® zu einem ausgeprägten kontinuierlichen Anstieg der Vitalität pro Zelle. In den Standardzellkulturen sowie den übrigen Kollagenmembrankulturen (Bio-Gide®, GENTA-FOIL resorb®, BioMend® und BioMend® Extend™) ließ sich über denselben Zeitraum hinweg teilweise eine deutliche Abnahme der Vitalität pro Zelle nachweisen. Die mit Abstand höchste Vitalität pro Zelle unter allen Membrankulturen an Tag 7 erzielten die HOB auf GORE-TEX®, gefolgt von den USSC auf selbiger Membran. Dies lässt sich in erster Linie auf die außergewöhnlich gute Zellvitalität bei sehr geringer Zellzahl auf GORE-TEX® zurückführen. Nach der auf GORE-TEX® gemessenen höchsten Vitalität pro Zelle folgten bei beiden Zellarten die Messergebnisse der Bio-Gide®- und RESODONT®-Kulturen, danach die der Standardzellkultur. Abgesehen von GORE-TEX® liefern somit Bio-Gide® und RESODONT® bei der Bestimmung der Vitalität pro Zelle erneut bessere Ergebnisse als die übrigen drei Membranen GENTA-FOIL resorb®, BioMend® und BioMend® Extend™ und in diesem Fall auch als die Standardzellkulturoberfläche. Unsere Ergebnisse zur Vitalität pro Zelle lassen sich schlecht mit anderen Studien vergleichen, da in diesen zumeist die Vitalität pro Zelle nicht mitbestimmt wurde.

4.3 Zytotoxizität

Der CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität in einer Zellkultur erwies sich bereits in mehreren Studien als erfolgreich (Berckmans *et al.*, 2007; Dasari *et al.*, 2013).

Die auf diese Weise ermittelte Zytotoxizität zeigte sich auf der Standardzellkulturoberfläche an den Tagen 3 und 7 in den USSC- sowie am Tag 3 in den HOB-Kulturen signifikant geringer als auf den vier getesteten Membranoberflächen Bio-Gide®, RESODONT®, GENTA-FOIL resorb® und GORE-TEX® ($p < 0,005$ bis $p < 0,0005$; Abbildung 12). An Tag 7 war die Zytotoxizität in der HOB-Standardzellkultur ähnlich hoch wie in den HOB-Kulturen mit GENTA-FOIL resorb® und GORE-TEX®, lag dabei jedoch signifikant unter denen von Bio-Gide® und RESODONT® ($p < 0,005$). Somit erwies sich die Standardzellkulturoberfläche als weniger zytotoxisch verglichen mit den vier getesteten Membranen. Lediglich an Tag 7, nach vorausgegangenem zweifachen Mediumwechsel entsprach ihr Wert in etwa dem auf GENTA-FOIL resorb® und GORE-TEX®. Sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 lag die Zytotoxizität in der Standardzellkultur der USSC signifikant über der der HOB ($p < 0,005$). Demzufolge scheinen die HOB während des gesamten Kultivierungszeitraums widerstandsfähiger zu sein als die USSC. Zwischen Tag 3 und 7 stieg die Zytotoxizität in den HOB-Standardzellkulturen jedoch signifikant an ($p < 0,0005$), wohingegen sie in den USSC-Standardzellkulturen nahezu unverändert blieb.

Sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 wurden in allen USSC-Membrankulturen signifikant höhere Zytotoxizitätswerte als in den HOB-Membrankulturen gemessen ($p < 0,005$ und $p < 0,0005$), was sich vermutlich erneut auf die höhere Widerstandsfähigkeit der HOB zurückführen lässt. An Tag 3 konnte die höchste Zytotoxizität in den USSC-Kulturen auf GENTA-FOIL resorb[®], nicht signifikant gefolgt von RESODONT[®] und Bio-Gide[®], nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise zeigte sich die geringste Zytotoxizität in der GORE-TEX[®]-Kultur. Andererseits fand sich in den HOB-Membrankulturen die niedrigste Zytotoxizität zeitgleich in der Bio-Gide[®]-Kultur, nicht signifikant gefolgt von GORE-TEX[®] und RESODONT[®] sowie signifikant gefolgt von GENTA-FOIL resorb[®] ($p < 0,05$). Somit ließ sich bei beiden Zellarten die höchste Zytotoxizität an Tag 3 auf GENTA-FOIL resorb[®] erkennen, wohingegen die geringste in den USSC-Membrankulturen auf GORE-TEX[®] und in den HOB-Membrankulturen auf Bio-Gide[®] ermittelt wurde. Vergleicht man die Zytotoxizitäten mit den entsprechenden an Tag 3 gemessenen Zellzahlen, so weisen Bio-Gide[®] und RESODONT[®] trotz einer deutlich höheren Anzahl an Zellen ähnlich hohe Zytotoxizitätswerte wie GORE-TEX[®] auf, aber sichtbar geringere als GENTA-FOIL resorb[®]. Dies spricht für eine von diesen Membranen ausgehende deutlich geringere Zytotoxizität.

Bis zum Versuchsende nach 7 Tagen kam es in allen USSC-Membrankulturen zu signifikanten Zytotoxizitätsabnahmen ($p < 0,0005$). Durch den am 3. Kultivierungstag erneut vollzogenen Mediumwechsel schienen in den USSC-Kulturen die von den Membranen freier werdenden und das Zellwachstum negativ beeinflussenden Substanzen vermehrt aus dem Kulturüberstand eliminiert zu werden. In den HOB-Membrankulturen zeigten sich auf Bio-Gide[®] zwischen Tag 3 und 7 eine signifikante ($p < 0,05$) und auf RESODONT[®] eine nicht signifikante Zunahme der Zytotoxizität. Dagegen fand in den HOB-Membrankulturen auf GENTA-FOIL resorb[®] ein signifikanter ($p < 0,0005$) und auf GORE-TEX[®] ein nicht signifikanter Zytotoxizitätsrückgang statt, welcher vermeintlich ebenfalls auf die geringe gemessene Zellzahl zurückzuführen ist. An Tag 7 wurde die höchste Zytotoxizität in den USSC-Kulturen auf Bio-Gide[®], nicht signifikant gefolgt von RESODONT[®] und GORE-TEX[®] sowie signifikant gefolgt von GENTA-FOIL resorb[®], ermittelt ($p < 0,0005$). Zum selben Zeitpunkt konnte die niedrigste Zytotoxizität in den HOB-Kulturen auf GENTA-FOIL resorb[®], nicht signifikant gefolgt von GORE-TEX[®], bestimmt werden. Mit signifikantem Abstand folgten Bio-Gide[®] und RESODONT[®] ($p < 0,0005$).

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Zellarten bzgl. ihrer Zytotoxizität könnte dadurch bedingt sein, dass sich nach einer Zellteilung eine höhere zelltypische Zytotoxizität der sich weiter ausdifferenzierenden Tochterzelle entwickelt (Jakob *et al.*, 2008).

In einer Studie von Marinucci *et al.* erwiesen sich Diphenylphosphorylsäure quervernetzte Membranen als geringer zytotoxisch im Vergleich zu solchen, die mit Glutaraldehyd quervernetzt wurden (Marinucci *et al.*, 2003). Da BioMend[®] und BioMend[®] Extend[™] glutaraldehydvernetzt sind, ist davon auszugehen, dass bei einer Zytotoxizitätsbestimmung dieser beiden Membranen deutlich höhere Werte erzielt worden wären. Des Weiteren konnten Açil *et al.* zeigen, dass Bio-

Gide® im Vergleich zu Tutodent® (Zimmer Dental GmbH, Freiburg / D) keinen signifikanten Zytotoxizitätsunterschied bei der Kultivierung von aus dem Fettgewebe gewonnener Rattenstammzellen aufwies (Açil *et al.*, 2014).

4.4 Membranoberflächen und Zellmorphologie

In nativer Form zeigte Bio-Gide® einseitig eine äußerst fibröse Oberflächenstruktur mit locker aneinanderliegenden Kollagenfasern unterschiedlicher Stärke (Rothamel *et al.*, 2012). Die übrigen unsererseits getesteten Kollagenmembranen RESODONT®, GENTA-FOIL resorb®, BioMend® und BioMend® Extend™ wiesen nativ eine weitestgehend glatte Oberfläche auf (Abbildung 13 und 14). Dagegen ließ die vorwiegend glatte native Oberfläche der synthetischen GORE-TEX®-Membran partielle Bereiche von parallel verlaufenden, nicht die Ebene verlassenden, kollagenähnlichen PTFE-Fasern erkennen.

Über die gesamte Kultivierungszeit von 7 Tagen behielt Bio-Gide® seine fibröse Oberflächenstruktur bei. Im Fall von RESODONT® und GENTA-FOIL resorb® erfolgte eine Änderung der Oberflächenstruktur von glatt nach rau. Diese vollzog sich bei RESODONT® bereits nach vierundzwanzigstündiger Kultivierung, bei GENTA-FOIL resorb® erst nach dem 3. Kultivierungstag, jedoch im Vergleich zu erstgenannter Membran in wesentlich geringerer Ausprägung. BioMend® und BioMend® Extend™ zeigten bis zum Versuchsende nach 7 Tagen keine Oberflächenveränderung und blieben glatt. Dies ist möglicherweise durch die Quervernetzung bei der Herstellung zu erklären. Ebenso blieb die Oberfläche der synthetischen GORE-TEX®-Membran über den gesamten Kultivierungszeitraum unverändert.

Das gute Attachment mit anschließendem guten Proliferationsverhalten sowohl der USSC als auch der HOB auf Bio-Gide® und RESODONT® lässt sich aus unserer Sicht auf die raue Oberfläche beider Membranen zurückführen. Bereits in mehreren Studien wurde belegt, dass eine raue Membranoberfläche die Kultivierung von Zellen verbessert. So konnten Dalby *et al.* im Jahr 2000 bei der Untersuchung der Zellmorphologie mittels Elektronen- und Laserscanning-Mikroskopie den großen Einfluss der Oberflächenstruktur auf das Attachment und die Proliferation von Zellen während der Kultivierung zeigen (Dalby *et al.*, 2000). Bereits Bowers *et al.* wiesen nach, dass eine raue Membranoberfläche das Attachment und die Proliferation bei Osteoblasten fördert, während sich Fibroblasten besser auf glatten Oberflächen kultivieren lassen (Bowers *et al.*, 1992). Vergleichbare Ergebnisse lieferten Wang *et al.* (2002). Im Falle von GENTA-FOIL resorb® setzte aus unserer Sicht die Veränderung von der glatten Oberfläche hin zu einer raueren mit dem 3. Versuchstag erst sehr spät ein, so dass sich die Zellen während der Attachmentphase nicht vernünftig an die der Membranoberfläche anlagern konnten. Dies könnte

auch das verminderte Attachment mit anschließendem geringen Wachstumsverhalten erklären. Hier wäre vermutlich eine Kultivierung mit USSC und HOB nach vorausgegangener dreitägiger Benetzung mit Nährmedium, um die Aufrauung der Oberfläche zu verstärken, von Vorteil. Ebenso erschweren die weitestgehend glatten Oberflächen von BioMend® und BioMend® Extend™ das Anhaften von Zellen, woraus auch deren anschließendes schlechtes Wachstum resultiert.

Während der siebentägigen Kultivierung bildeten die USSC sowohl auf Bio-Gide® als auch auf RESODONT® lange Zellausläufer aus, die sich an die Kollagenfasern hefteten. Ein vergleichbares Bild zeigten die HOB auf Bio-Gide® (Abbildung 13 und 14). Demzufolge scheint Bio-Gide® auch im REM sowohl für die USSC als auch HOB als Kultivierungsoberfläche geeignet zu sein, wodurch die bereits gewonnenen Ergebnisse des Attachments sowie der Proliferation bekräftigt werden. Auch stellt sich die RESODONT®-Oberfläche rasterelektronenmikroskopisch für die USSC-Kultivierung als angemessen dar. Jedoch stehen die REM-Ergebnisse der HOB auf RESODONT® im Gegensatz zu den gemessenen Zellzahlen, da diese rasterelektronenmikroskopisch eine weniger geeignete Kultivierungsoberfläche vortäuschen. Möglicherweise haben sich während der Fixierung der RESODONT®-Membran für die REM-Untersuchung einige Zellen von der Membranoberfläche gelöst. Da jeweils nur eine Membran pro Zellkultur für die REM-Untersuchung verwendet wurde, konnte hier kein Vergleich gezogen werden. Ähnliche Ergebnisse wiesen Willershausen *et al.* während der Kultivierung mit HOB auf Bio-Gide® und der weiteren nicht quervernetzten Kollagenmembran Mucograft® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen / CH) in Form eines kompakten Zellrasens nach (Willershausen *et al.*, 2014). Auch zeigten humane MSC nach siebentägiger Kultivierung auf Bio-Gide® eine gut verzweigte Zellmorphologie (Liu *et al.*, 2011). Ebenso bildeten die vier Kollagenmembranen Bio-Gide®, Chondro-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen / CH), Tutodent® (Zimmer Dental GmbH, Freiburg / D) und OSSIX® PLUS (OraPharma Inc., Horsham / USA) nach siebentägiger Kultivierung mit humanen Periostzellen im REM oberflächlich einen dichter Zellrasen aus (Warnke *et al.*, 2009). Humane Periodontalligamentfibroblasten ließen auf Bio-Gide®, OSSIX® (OraPharma Inc., Horsham / USA) und Tutodent® eine spindelförmige flache Form ähnlich der auf einer herkömmlichen Zellkulturoberfläche erkennen. Hingegen bildeten humane osteoblastenähnliche Zellen auf einer gewöhnlichen Zellkulturoberfläche eine flache sternförmige Gestalt aus, die sich auf Bio-Gide®, OSSIX® und Tutodent® vermehrt rundlich zeigte (Rothamel *et al.*, 2004).

Auf den übrigen getesteten Kollagenmembranen GENTA-FOIL resorb®, BioMend® und BioMend® Extend™ waren in beiden Zellkulturen über denselben Kultivierungszeitraum nur wenige, deutlich kleinere Zellen mit eher rundlichem Erscheinungsbild und kurzen Zellausläufern nachweisbar. Auf GORE-TEX® bildeten die USSC und HOB nur wenige adhärenente Zellen mit nahezu keinen Zellausläufern aus. Auch nahmen beide Zellarten über den gesamten Kultivierungszeitraum zunehmend ab. Das geringe Attachment der USSC und HOB mit anschließend abnehmender

Proliferation auf GORE-TEX® ist laut Brunette durch eine verringerte Benetzungsfähigkeit der synthetischen Membran bedingt (Brunette, 1998). Somit sind BioMend®, BioMend® Extend™ und GORE-TEX® als Oberfläche für die Kultivierung von USSC und HOB eher ungeeignet. Im Falle von GENTA-FOIL resorb® gilt es künftig zu evaluieren, ob eine der Kultivierung 3 Tage vorausgegangene Benetzung mit Zellkulturmedium Vorteile für das Attachment und die anschließende Proliferation von USSC und HOB mit sich bringt.

Ein interessanter Ansatz, das Attachment von Membranen zu verbessern, liegt in der Veränderung der nativen Membranoberfläche. So konnten Gassling *et al.* auf mit humanen Periostzellen besiedelten *Platelet Rich Fibrin*-Membranen gegenüber Bio-Gide® im REM deutlich mehr Zellen nachweisen (Gassling *et al.*, 2010). Des Weiteren zeigten mit *Platelet Rich Plasma* benetzte und anschließend mit humanen Periodontalligamentfibroblasten und humanen Gingivafibroblasten kultivierte Membranen nach der Attachmentphase Zellen mit deutlich größere Zellausläufern, die sich verstärkt um einzelne Membranfasern wanden im Vergleich zu derselben nativen Membranoberfläche (Chang *et al.*, 2007).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese *in vitro* Studie zielte darauf ab, nach einer Kultivierung mit humanen, osteogen vordifferenzierten unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) und humanen Osteoblasten (HOB) unter sechs kommerziell erhältlichen Membranen (Bio-Gide[®], RESODONT[®], BioMend[®], BioMend[®] Extend[™], GENTA-FOIL resorb[®] und GORE-TEX[®]) diejenige mit der besten Biokompatibilität zu evaluieren. Dazu wurden sowohl das Attachment und Proliferationsverhalten (CyQuant[®] Cell Proliferation Assay Kit) als auch die Vitalität (CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay) der Zellen sowie die in der Zellkultur vorhandene Zytotoxizität (CytoTox-ONE[™] Homogeneous Membrane Integrity Assay) untersucht. Letztgenannte wurde in den Bio-Gide[®]-, RESODONT[®]-, GENTA-FOIL resorb[®]- und GORE-TEX[®]-Kulturen ermittelt. Eine Standardzellkulturoberfläche diente als Kontrolle. Zusätzlich wurden die nativen und kultivierten Membranen im REM analysiert.

Verglichen mit den USSC erreichten die HOB auf allen getesteten Membranen ein signifikant höheres Attachment. Dies spricht für eine initial bessere Anpassungsfähigkeit der HOB an die jeweilige Membranoberfläche. Bio-Gide[®] und RESODONT[®] erwiesen sich für die Anheftung von USSC und HOB als am besten geeignet. Zwischen Tag 1 und 7 zeigten die USSC auf Bio-Gide[®] ein besseres Proliferationsverhalten als die HOB. Lediglich auf Bio-Gide[®] und RESODONT[®] erreichten hier beide Zellarten signifikante Zellzahlzunahmen. Somit liefern diese beiden Membranen unter den sechs getesteten Membranen die besten Wachstumsbedingungen für die Kultivierung von USSC und HOB.

Die USSC und HOB erwiesen sich nach der Attachmentphase auf Bio-Gide[®] signifikant vitaler. Bio-Gide[®] bietet unter allen Membranen unmittelbar nach der Attachmentphase für beide Zellarten die besten Kultivierungsbedingungen. An den Tagen 3 und 7 war die Vitalität der USSC auf Bio-Gide[®] signifikant höher, gefolgt von RESODONT[®]. In den HOB-Membrankulturen zeigte sich dies in entgegengesetzter Reihenfolge. Bio-Gide[®] und RESODONT[®] zeigten bei der Kultivierung von USSC und HOB erneut die besten Voraussetzungen.

In allen HOB-Membrankulturen wurden an den Tagen 3 und 7 signifikant geringere Zytotoxizitätswerte im Vergleich zu den USSC-Membrankulturen ermittelt. Dies deutet auf die bessere Widerstandsfähigkeit der HOB im Vergleich zu den USSC hin. An Tag 3 wurde unter den USSC-Membrankulturen die geringste Zytotoxizität in der GORE-TEX[®]- und unter den HOB-Membrankulturen in der Bio-Gide[®]-Kultur ermittelt. Vier Tage später war dieses zellartunabhängig in den GENTA-FOIL resorb[®]-Kulturen.

In nativer Form zeigt Bio-Gide[®] im REM einseitig eine äußerst fibröse Oberflächenstruktur mit locker aneinanderliegenden Kollagenfasern auf, während die übrigen Kollagenmembranen eine weitestgehend glatte Oberfläche präsentieren. Die native, größtenteils glatte Oberfläche von

GORE-TEX® enthält partiell Bereiche von parallel verlaufenden, kollagenähnlichen PTFE-Fasern. Über die gesamte Kultivierungszeit von 7 Tagen behielt Bio-Gide® ihre fibröse Oberflächenstruktur bei. RESODONT® und GENTA-FOIL resorb® zeigten eine Änderung der Oberflächenstruktur von glatt nach rau. BioMend® und BioMend® Extend™ sowie GORE-TEX® wiesen hingegen keine Oberflächenveränderung auf. Während der Kultivierung bildeten die USSC sowohl auf Bio-Gide® als auch auf RESODONT® lange Zellausläufer aus, die sich den Kollagenfasern anlagerten. Ein vergleichbares Bild ließen die HOB auf Bio-Gide® erkennen. Auf den übrigen Kollagenmembranen waren zellartunabhängig nur wenige, deutlich kleinere Zellen mit eher rundlichem Erscheinungsbild und kurzen Zellausläufern nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bio-Gide® und RESODONT® bei der *in vitro* Kultivierung von USSC und HOB unter den getesteten Membranen die beste Biokompatibilität aufwiesen. Zu bedenken gilt, dass sich diese Ergebnisse nur bedingt auf eine mögliche *in vivo* Anwendung übertragen lassen und sich erst noch in einem lebenden Organismus beweisen müssen. Insbesondere auf dem Gebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zeigt sich, dass die Verwendung von osteogen vordifferenzierten Stammzellen in Kombination mit Biomembranen bereits gegenwärtig eine wichtige Rolle in der knöchernen Wundversorgung und -heilung einnimmt. Im Hinblick aufs TE von Knochen könnten sie in naher Zukunft als *Scaffolds* von Bedeutung sein, um so die Anzahl von autologen Knochentransplantaten zu reduzieren.

6 **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<i>Abbildung 1: Die ersten drei Entwicklungsstadien nach</i>	3
<i>Abbildung 2: Einteilung der in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendeten Membranen.</i>	8
<i>Abbildung 3: Alle getesteten Membranen im Überblick.</i>	22
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellungen der Well-Plattenbefüllung für die Messung der Prolife-.....</i>	24
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Well-Plattenbefüllung für die Messung der Zellvitali-</i>	24
<i>Abbildung 6: Umwandlung von Laktat zu Pyruvat.</i>	28
<i>Abbildung 7: Attachment der USSC und HOB auf den sechs</i>	32
<i>Abbildung 8: Wachstumsverhalten der USSC und HOB auf den sechs Membranen und einer</i>	33
<i>Abbildung 9: Relatives Proliferationsverhalten der USSC und HOB auf den sechs Membranen</i>	34
<i>Abbildung 10: Vitalität der USSC und HOB auf den sechs Membranen und einer Standardzellkul-.....</i>	37
<i>Abbildung 11: Vitalität pro Zelle der USSC und HOB auf einer Standardzellkulturoberfläche und.....</i>	40
<i>Abbildung 12: Zytotoxische Wirkung einer Standardzellkulturoberfläche und der vier Membranen.....</i>	41
<i>Abbildung 13: Darstellung der nativen- und mit osteogen vordifferenzierten USSC besiedelten</i>	45
<i>Abbildung 14: Darstellung der nativen- und mit HOB besiedelten Membranoberfläche nach 24</i>	48

7 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Auflistung der für die Zellkultivierung zum Einsatz gekommenen Medien, Enzyme und Puffer.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien.</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien.</i>	<i>13</i>
<i>Tabelle 4: Auflistung der Test-Kits/Enzymassays.</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 5: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 6: Die Verdünnungsreihe zur Erstellung der Kalibriergeraden.</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 7: Signifikanzen zur Zellproliferation der USSC und HOB</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 8: Signifikanzen zur Zellproliferation der USSC und HOB für die Kultivierungs-.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 9: Wertigkeitsdiagramme zum Attachment und zur Zellproliferation der USSC und HOB</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 10: Signifikanzen zur Zellvitalität der USSC und HOB für die Kultivierungszeiträume</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 11: Signifikanzen zur Zellvitalität der USSC und HOB an den</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 12: Wertigkeitsdiagramm zur Vitalität der USSC und HOB über die Zeiträume Tag 1 bis 3,</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 13: Signifikanzen zur Zytotoxizität der USSC und HOB.</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 14: Wertigkeitsdiagramm der von den Membranoberflächen ausgehenden zyto-.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 15: Wertigkeitsdiagramm zur Zytotoxizitätsveränderung in den Zellkulturüber-.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 16: Membranranking für die USSC</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 17: Membranranking für die HOB</i>	<i>49</i>

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aarden, E.M.; Burger, E.H.; Nijweide, P.J.; 1994: Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55(3): 287-299.

Açil, Y.; Zhang, X.; Nitsche, T.; Möller, B.; Gassling, V.; Wiltfang, J.; Gierloff, M.; 2014: Effects of different scaffolds on rat adipose tissue derived stroma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 42(6): 825-834.

Andrews, P.W.; 1998: Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apmis* 106(1): 158-168.

Aubin, J.E.; Liu, F.; 1996: The osteoblast lineage. In: *Principles of Bone Biology*. Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan, G.A.; Academic Press San Diego California 51-67.

Berckmans, P.; Leppens, H.; Vangenechten, C.; Witters, H.; 2007: Screening of endocrine disrupting chemicals with MELN cells, an ER-transactivation assay combined with cytotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro*. 21(7): 1262-1267.

Blumenthal, N.M.; 1993: A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE Membranes in treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. *J Periodontol* 64(10): 925-933.

Bowers, K.T.; Keller, J.C.; Randolph B.A.; Wick, D.G.; Michaels, C.M.; 1992: Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7(3): 302-310.

Brunel, G.; Piantoni, P.; Elharar, F.; Benque, E.; Marin, P.; Zahedi, S.; 1996: Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *J Periodontol* 67(12): 1342-1348.

Brunette, D.M.; 1998: Alternative therapies: abuses of scientific method and challenges to dental research. *J Prosthet Dent* 80(5): 605-614.

Buser, D.; Dahlin, D.; Schenk, R.; 1994: Guided bone regeneration in implant dentistry. Quintessenz Publ. Berlin. ISBN-13: 9780867152494.

Buser, D.; Dula, K.; Belser, U.; Hirt, H.P.; Berthold, H.; 1993: Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 13(1): 29-45.

Buttery, L.D.; Bourne, S.; Xynos, J.D.; Wood, H.; Hughes, F.J.; Hughes, S.P.; Episkopou, V.; Polak, J.M.; 2001: Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7(1): 89-99.

Chang, T.; Liu, Q.; Marino, V.; Bartold, P.M.; 2007: Attachment of periodontal fibroblasts to barrier membranes coated with platelet-rich plasma. *Aust Dent J* 52(3): 227-233.

Cheng, T.; Rodrigues, N.; Shen, H.; Yang, Y.; Dombkowski, D.; Sykes, M.; Scadden, D.T.; 2000: Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287(5459): 1804-1808.

Christgau, M.; Schmalz, G.; Wenzel, A.; Hiller, K.-A.; 1997: Periodontal regeneration of intrabony defects with resorbable and non-resorbable membranes: 30-month results. *J Clin Periodontol* 24(1): 17-27.

Courville, C.B.; 1959: Cranioplasty in prehistoric times. *Bull Los Angel Neuro Soc* 24(1): 1-8.

Dahlin, C.; Lekholm, U.; Becker, W.; Becker, B.; Higuchi, K.; Callens, A.; van Steenberghe, D.; 1995: Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 10(3): 312-318.

Dahlin, C.; Linde, A.; Gottlow, J.; Nyman, S.; 1988: Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 81(5): 672-676.

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. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23(4): 237-242.

Dalby, M.J.; Di Silvio, L.; Davies, G.W.; Bonfield, W.; 2000: Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts *in vitro*. *J Mater Sci Mater Med* 11(12): 805-810.

Daniels, A.U.; Taylor, M.S.; Heller, J.; 1992: Toxicity of absorbable polymers proposed for fracture fixation devices. Presented at the 38th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society San Francisco.

Dasari, B.; Prasanthi, J.R.; Meiers, C.; Singh, B.B.; Ghribi, O.; 2013: Differential effects of the estrogen receptor agonist estradiol on toxicity induced by enzymatically-derived or autoxidation-derived oxysterols in human ARPE-19 cells. *Curr Eye Res.* 38(11): 1159-1171.

Datta, H.K.; Ng, W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S.; 2008: The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61(5): 577-587.

den Braber, E.T.; de Ruijter, J.E.; Smits, H.T.; Ginsel, L.A.; von Recum, A.F.; Jansen, J.A.; 1995: Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater Res* 29(4): 511-518.

Donnenfeld, O.W.; Hoag, P.M.; Weissman, D.P.; 1970: A clinical study on the effects of osteoplasty. *J Periodontol* 41(3): 131-141.

Draper, J.S.; Smith, K.; Gokhale, P.; Moore, H.D.; Maltby, E.; Johnson, J.; Meisner, L.; Zwaka, T.P.; Thomson, J.A.; Andrews, P.W.; 2004: Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22(1): 53-54.

Eckfeldt, C.E.; Mendenhall, E. M.; Verfaillie, C. M.; 2005: The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(9): 726-737.

Evans, M.J.; Kaufman, M.H.; 1981: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819): 154-156.

Flake, A.W.; Harrison, M.R.; Adzick, N.S.; Zanjani, E.D.; 1986: Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science* 15 233(4765): 776-778.

- Friedmann, A.; Strietzel, F.P.; Marezki B.; Pitar, S.; Bernimoulin, J.P.; 2001: Observation on a new collagen barrier membrane in 16 consecutively treated patients. Clinica and histological findings. J Periodontol 2001 72(11): 1616-1623.
- Gassling, V.; Douglas, T.; Warnke, P.H.; Açil, Y.; Wiltfang, J.; Becker, S.T.; 2010: Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. Clin Oral Implants Res 21(5): 543-549.
- Gassling, V.; Hedderich, J.; Açil, Y.; Purcz, N.; Wiltfang, J.; Douglas, T.; 2013: Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. Clin Oral Implants Res 24(3): 320-328.
- Genov, M.; Kreiseder, B.; Nagl, M.; Drucker, E.; Wiederstein, M.; Muellauer, B.; Krebs, J.; Grohmann, T.; Pretsch, D.; Baumann, K.; Bacher, M.; Pretsch, A.; Wiesner, C.; 2016: Tetrahydroanthraquinone Derivative (\pm)-4-Deoxyaustrocortilutein Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells via Upregulation of p21 and p53 and Downregulation of NF-kappaB. J Cancer. 7(5): 555-568.
- Gierloff, M.; Nitsche, T.; Adam-Klages, S.; Liebs, K.; Hedderich, J.; Gassling, V.; Wiltfang, J.; Kabelitz, D.; Açil, Y.; 2014: *In vitro* comparison of different carrier materials with rat bone marrow MSCs. Clin Oral Investig 18(1): 247-259.
- 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.
- Gottlow, J.; 1993: Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. J Periodontol 64(11): 1157-1165.
- Gottlow, J.; Nyman, S.; Lindhe, J.; Karring, T.; Wennstrom, J.; 1986: New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. J Clin Periodontol 13(6): 604-616.
- Greschat, S.; Schira, J.; Kury, P.; Rosenbaum, C.; de Souza Silva, M.A.; Kögler, G.; Wernet, P.; Muller, H.W.; 2008: Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. Stem Cells Dev 17(2): 221-232.
- Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I.; 2006: Literatur Women's Health and Disease: Gynecologic, Endocrine and Reproductive Issues, In: Annals of the New York Academy of Sciences 1092: 385-396.
- Hägewald, S.; 1999: Möglichkeiten und Perspektiven in der Parodontologie und Implantologie. 3. Deutsches Osteologie-Symposium Baden-Baden.
- Hall, P.A.; Watt, F.M.; 1989: Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development 106(4): 619-633.
- Hammerle, C.H.; Karring, T.; 1998: Guided bone regeneration at oral implant sites. Periodontol 2000 17: 151-175.
- Hammerle, C.H.; Lang, N.P.; 2001: Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. Clin Oral Implants Res 12(1): 9-18.

Handschel, J.; Naujoks, C.; Langenbach, F.; Berr, K.; Depprich, R.A.; Ommerborn, M.A.; Kübler, N.R.; Brinkmann, M.; Kögler, G.; Meyer, U.; 2010: Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells *in vivo*. *Tissue Eng Part A* 16(8): 2475-2483.

Heinz, B.; Kermanie, M.A.; Jepsen, K.; Jepsen, S.; 1998: Rezessionstherapie mit einem neuen resorbierbaren GTR-Barrier - erste klinische Erfahrungen. *Parodontologie* 2: 133-144.

Hinrichs, B.; Dreyer, T.; Battmann, A.; Schulz, A.; 1993: Histomorphometry of active osteoblast surface labelled by antibodies against non-collagenous bone matrix proteins. *Bone* 14(3): 469-472.

Hurley, L.A.; Stinchfield, F.E.; Bassett, A.L.; Lyon, W.H.; 1959: The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am* 41-A: 1243-1254.

Hurley, J.V.; Ham, K.N.; 1959: The Nature of the Connective Tissue Defect Produced by the Aminonitriles. *Br J Exp Pathol* 40(3): 216-224.

Hutmacher, D.; Hürzeler, M.B.; Schliephake, H.; 1996: A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11(5): 667-678.

Jakob, F.; Limbert, C.; Schilling, T.; Benisch, P.; Seefried, L.; Ebert, R.; 2008: Biology of Mesenchymal Stem Cells. *Current Rheumatology Reviews* 4(3): 148-154.

Jones, L.J.; Gray, M.; Yue, S.T.; Haugland, R.P.; Singer, V.L.; 2001: Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254(1-2): 85-98.

Kasaj, A.; Reichert, C.; Götz, H.; Röhrig, B.; Smeets, R.; Willershausen, B.; 2008: *In vitro* evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 4: 22.

Kim, B.O.; Tian, H.; Prasongsukarn, K.; Wu, J.; Angoulvant, D.; Wnendt, S.; Muhs, A.; Spitkovsky, D.; Li, R.K.; 2005: Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 112(9): 96-104.

Kluth, S.M.; Buchheiser, A.; Houben, A.P.; Geyh, S.; Krenz, T.; Radke, T.F.; Wiek, C.; Hanenberg, H.; Reinecke, P.; Wernet, P.; Kögler, G.; 2010: DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev* 19(10): 1471-1483.

Kluth, S.M.; Falk Radke, T.; Kögle, G.; 2013: Increased haematopoietic supportive function of UDDC from umbilical cord blood compared to CB MSC and possible role of DLK-1. *Stem Cells Int.* 2013.

Kodama, T.; Minabe, M.; Hori, T.; Watanabe, Y.; 1989: The effect of various concentrations of collagen barrier on periodontal wound healing. *J Periodontol* 60(4): 205-210.

Kögler, G.; Sensken, S.; Airey, J.A.; Trapp, T.; Muschen, M.; Feldhahn, N.; Liedtke, S.; Sorg, R.V.; Fischer, J.; Rosenbaum, C.; Greschat, S.; Knipper, A.; Bender, J.; Degistirici, O.; Gao, J.; Caplan, A.I.; Colletti, E.J.; Almeida-Porada, G.; Müller, H.W.; Zanjani, E.; Wernet, P.; 2004: A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200(2): 123-135.

- Kögler, G.; Critser, P.; Trapp, T.; Yoder, M.; 2009: Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 44(10): 683-697.
- Kouroupis, D.; Churchman, S.M.; McGonagle, D.; Jones, E.A.; 2014: The assessment of CD146-based cell sorting and telomere length analysis for establishing the identity of mesenchymal stem cells in human umbilical cord. *Version 2. F1000Res* 3: 126.
- Kulterer, B.; Friedl, G.; Jandrositz, A.; Sanchez-Cabo, F.; Prokesch, A.; Paar, C.; Scheideler, M.; Windhager, R.; Preisegger, K.H.; Trajanoski, Z.; 2007: Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 8: 70.
- Lammers, L.; Naujoks, C.; Berr, K.; Depprich, R.; Kübler, N.; Meyer, U.; Langenbach, F.; Luttenberg, B.; Kögler, G.; Wiesmann, H.P.; Handschel J.; 2012: Impact of DAG stimulation on mineral synthesis, mineral structure and osteogenic differentiation of human cord blood stem cells. *Stem Cell Res* 8(2): 193-205.
- Liedtke, S.; Buchheiser, A.; Bosch, J.; Bosse, F.; Kruse, F.; Zhao, X.; Santourlidis, S.; Kögler, G.; 2010: The HOX Code as a "biological fingerprint" to distinguish functionally distinct stem cell populations derived from cord blood. *Stem Cell Res* 5(1): 40-50.
- Lilienfeld-Toal, H.; 1992: Wachstumsfaktoren und Knochenremodellierung. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie*. Springer-Verlag Heidelberg 18-23. ISBN 978-3-642-76766-1.
- Liu, J.; Kerns, D.G.; 2014: Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. *The Open Dentistry Journal* 8: 56-65.
- Liu, Q.; Humpe, A.; Kletsas, D.; Warnke, F.; Becker, S.T.; Douglas, T.; Sivananthan, S.; Warnke, P.H.; 2011: 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, W.N.; Leung, K.N.; 2015: Jacaric acid inhibits the growth of murine macrophage-like leukemia PU5-1.8 cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Cell Int.* 15: 90.
- Locci, P.; Calvitti, M.; Belcastro, S.; Pugliese, M.; Guerra, M.; Marinucci, L.; Staffolani, N.; Becchetti, E.; 1997: Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 68: 857-863.
- Macpherson, A.I.; 1963: The healing of vascular grafts; experiments with a porous membrane. *Br J Exp Pathol* 44(5): 481-490.
- Maduray, K.; Karsten, A.; Odhav, B.; Nyokong, T.; 2011: *In vitro* toxicity testing of zinc tetrasulfophthalocyanines in fibroblast and keratinocyte cells for the treatment of melanoma cancer by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 103(2): 98-104.
- Marinucci, L.; Lilli, C.; Baroni, T.; Becchetti, E.; Belcastro, S.; Balducci, C.; Locci, P.; 2001: *In vitro* comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in bone regeneration. *J Periodontol* 72(6): 753-759.
- Marinucci, L.; Lilli, C.; Guerra, M.; Belcastro, S.; Becchetti, E.; Stabellini, G.; Calvi, E.M.; Locci, P.; 2003: Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: an *in vitro* study. *J Biomed Mater Res A* 67(2): 504-509.
- Marks, S.C.Jr.; Popoff, S.N.; 1988: Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 183(1):1-44.

McNamara, L.E.; McMurray, R.J.; Biggs, M.J.; Kantawong, F.; Oreffo, R.O.; Dalby, M.J.; 2010: Nanotopographical control of stem cell differentiation. *J Tissue Eng* 2010.

Melcher, A.H.; 1976: On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 47(5): 256-260.

Melcher, A.H.; Dreyer, C.J.; 1962: Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. *J Bone Joint Surg* 44: 424-430.

Miller, S.C.; Bowman, B.M.; Smith, J.M.; Jee, W.S.; 1980: Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 198(2): 163-173.

Minabe, M.; Kodama, T.; Kogou, T.; Tamura, T.; Hori, T.; Watanabe, Y.; Miyata, T.; 1989: Different cross-linked types of collagen implanted in rat palatal gingiva. *J Periodontol* 60(1): 35-43.

Morrison, S.J.; Shah, N.M.; Anderson, D.J.; 1997: Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88(3): 287-298.

Moses, O.; Pitaru, S.; Artzi, Z.; Nemcovsky, C.E.; 2005: Healing of dehiscence-type defects in implants places together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Implants Res* 16(2): 210-219.

Mountford, J.C.; 2008: Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med* 18(1): 1-12.

Murray, G.; Holden, R.; Roachlau, W.; 1957: Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg* 93(3): 385-387.

Nyman, S.; Lang, N.P.; Buser, D.; Bragger, U.; 1990: Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 5(1): 9-14.

Nyman, S.; Lindhe, J.; Karring, T.; Rylander, H.; 1982: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9(4): 290-296.

Papadopoulos, N.A.; Schaff, J.; Sader, R.; Kovacs, L.; Deppe, H.; Kolk, A.; Biemer, E.; 2008: Mandibular reconstruction with free osteofasciocutaneous fibula flap: a 10 years experience. *Injury*. 39(3): 75-82.

Park, I.H.; Zhao, R.; West, J.A.; Yabuuchi, A.; Huo, H.; Ince, T.A.; Lerou, P.H.; Lensch, M.W.; Daley, G.Q.; 2008: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451(7175): 141-146.

Paul, B.F.; Mellonig, J.T.; Towle, H.J.; Gray, J.L.; 1992: Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 12(2): 123-131.

Pitaru, S.; Tal, H.; Soldinger, M.; Grosskopf, A.; Noff, M.; 1988: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *J Periodontol* 59(6): 380-386.

Potten, C.S.; Lajtha, L.G.; 1982: Stem cells versus stem lines. *Ann N Y Acad Sci* 397: 49-61.

Quteish, D.; Dolby, A.E.; 1992: The use of irradiated-crosslinked human collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 19(7): 476-484.

- Reimann, V.; Creutzig, U.; Kögler, G.; 2009: Stammzellen aus Nabelschnurblut in der Transplantations- und regenerativen Medizin. *Dtsch Arztebl Int* 106(50): 831-836.
- Richter, E.J.; Jansen, V.K.; Spikermann, H.; Jovanovic, S.A.; 1992: Langzeitergebnisse von IMZ- und TPS-Implantaten im interforaminären Bereich des zahnlosen Unterkiefers. *Dtsch Zahnärztl Z* 47: 449-454.
- Riediger, D.; 1988: Restoration of masticatory function by microsurgically revascularized iliac crest bone grafts using endosseous implants. *Plast Reconstr Surg* 81(6): 861-877.
- Robbins; Cotran; 2005: *Pathologic Basis of Disease*. 7. Edition. ISBN-13: 978-0721601878.
- Rohen, J.W.; Lütjen-Drecoll, E.; 2006: *Funktionelle Embryologie*. Schattauer Verlag Stuttgart. ISBN-13: 978-3794524518.
- Rothamel, D.; Schwarz, F.; Fienitz, T.; Smeets, R.; Dreiseidler, T.; Ritter, L.; Happe, A.; Zöller, J.; 2012: Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of *in vitro* and *in vivo* examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 27(1): 146-154.
- Rothamel, D.; Schwarz, F.; Sager, M.; Herten, M.; Sculean, A.; Becker, J.; 2005: Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 16(3): 369-378.
- 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): 443-449.
- Sadler, T.W.; 2003: *Langman's Medical Embryology*. 9th edition. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN-13: 978-0781743105.
- Sanan, A.; Haines, S.J.; 1997: Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 40(3): 588-603.
- Schenk, R.K.; Buser, D.; Hardwick, W.R.; Dahlin, C.; 1994: Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 9(1): 13-29.
- Schiebler; Schmidt; Zilles; 2000: *Die Anatomie des Menschen 8, vollständig Überarbeitet und aktualisierte Auflage* Springer Berlin 49-53. ISBN-13: 978-3540658245.
- Schwarz, F.; Rothamel, D.; Herten, M.; Sager, M.; Becker, J.; 2006: Angiogenesis pattern of native and cross-linked membranes: an immunohistochemical study in rat. *Clin Oral Implants Res* 17(4): 403-409.
- Sensken, S.; Waclawczyk, S.; Knaupp, A.S.; Trapp, T.; Enczmann, J.; Wernet, P.; Kögler, G.; 2007: *In vitro* differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway. *Cytotherapy* 9(4): 362-378.
- Shirley, D.; Marsh, D.; Jordan, G.; McQuaid, S.; Li, G.; 2005: Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res* 23(5): 1013-1021.
- Speer, D.P.; Chvapil, M.; Eskelson, C.D.; Ulreich, J.; 1980: Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* 14(6): 753-764.

- Takahashi, K.; Yamanaka, S.; 2006: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-676.
- Takata, T.; Wang, H.L.; Miyauchi, M.; 2001: Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodont Res* 36(5): 322-327.
- Tatakis, D.N.; Promsudthi, A.; Wikesjö, U.M.; 1999: Devices for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 19: 59-73.
- Taylor, G.I.; Miller G.D.; Ham F.J.; 1975: The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 55(5): 533-544.
- Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M.; 1998: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145-1147.
- van der Meer, J.W.; van de Gevel, J.S.; Beelen, R.H.; Fluitsma, D.; Hoefsmit, E.C.; van Furth, R.; 1982: Culture of human bone marrow in the teflon culture bag: identification of the human monoblast. *J Reticuloendothel Soc* 32(5): 355-369.
- Wang, H.L.; Miyauchi, M.; Takata, T.; 2002: Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an *in vitro* study. *J Periodontal Res* 37(5): 340-344.
- Warnke, P.H.; Douglas, T.; Sivananthan, S.; Wiltfang, J.; Springer, I.; Becker, S.T.; 2009: Tissue engineering of periosteal cell membranes *in vitro*. *Clin Oral Implants Res* 20(8): 761-766.
- Wiebe, D.; Megerman, J.; L'Italien, G.J.; Abbott, W.M.; 1988: Glutaraldehyde release from vascular prostheses of biologic origin. *Surgery* 104(1): 26-33.
- Wiedmann-Al-Ahmad, M.; Gutwald, R.; Gellrich, N.C.; Hübner, U.; Schmelzeisen, R.; 2005: Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *J Mater Sci Mater Med* 16(1): 57-66.
- Willershausen, I.; Barbeck, M.; Boehm, N.; Sader, R.; Willershausen, B.; Kirkpatrick, C.J.; Ghanaati, S.; 2014: Non-cross-linked collagen type I/III materials enhance cell proliferation: *in vitro* and *in vivo* evidence. *J Appl Oral Sci* 22(1): 29-37.
- Yaffe, A.; Ehrlich, J.; Shoshan, S.; 1984: Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *J Periodontol* 55(11): 623-628.
- Ye, J.; Yao, Q.; Mo, A.; Nie, J.; Liu, W.; Ye, C.; Chen, X.; 2011: Effects of an antibacterial membrane on osteoblast-like cells *in vitro*. *Int J Nanomedicine* 6: 1853-1861.
- Zahedi, S.; Legrand, R.; Brunel, G.; Albert, A.; Dewe, W.; Coumans, B.; Bernard, J.P.; 1998: Evaluation of a diphenylphosphorylazide-crosslinked collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats. *J Periodontol* 69(11): 1238-1246.
- Zanjani, E.D.; Almeida-Porada, G.; Flake, A.W.; 1996: The human/sheep xenograft model: a large animal model of human hematopoiesis. *Int J Hematol* 63(3): 179-192.
- Zhang, M.; Ho, H.C.; Sheu, T.J.; Breyer, M.D.; Flick, L.M.; Jonason, J.H.; Awad, H.A.; Schwarz, E.M.; O'Keefe, R.J.; 2011: EP1(-/-) mice have enhanced osteoblast differentiation and accelerated fracture repair. *J Bone Miner Res* 26(4): 792-802.

Zhu, S.; Barbe, MF.; Liu, C.; Hadjiargyrou, M.; Popoff, SN.; Rani, S.; Safadi, FF.; Litvin, J.; 2009: Periostin-like-factor in osteogenesis. *J Cell Physiol.* 218(3): 584-592.

Zitzmann, N.U.; Naef, R.; Schärer, P.; 1997: Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12(6): 844-852.

zur Nieden, N.I.; Kempka, G.; Ahr, H.J.; 2003: *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71(1): 18-27.

9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen die mir beim Gelingen dieser Arbeit geholfen und beigestanden haben. In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel bedanken, für die Überlassung des Themas sowie seine freundschaftliche wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Universitätsprof. Dr. Dr. Norbert Kübler für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor und den nicht zu unterschätzenden Ratschlägen möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Karin Berr, Frau Andrea Hollinger, Herrn M. Sc. Fabian Langenbach und Herrn Dipl. Ing. Michael Kelz bedanken.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Gesine Kögler für die Bereitstellung der USSC danken.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Frau Mariana Grgić, wie auch meinen Eltern für ihre Unterstützung sowie für das Gelingen dieser Arbeit bereitgestellten zeitlichen Freiräume.