

## 6 Diskussion

Die Anwendung von Schmelzmatrixproteinen (SMP) zur parodontalen Regeneration stellt einen neuen, biologischen Therapieansatz dar und es ist daher unerlässlich, die zugrunde liegenden biologischen Prinzipien zu klären sowie die klinischen Resultate histologisch zu verifizieren. Trotz des inzwischen etablierten klinischen Gebrauchs des kommerziell erhältlichen Präparats Emdogain® (EMD) existieren nur eingeschränkte histologische Beweise für die Regeneration mit SMP [54, 238]. Zudem wurden in diesen Studien lediglich Wirkungen des kommerziellen Präparats evaluiert und bisher in ähnlichen Untersuchungen keine gereinigten Proteinfractionen der SMP oder einzelne, definierte Proteine eingesetzt. Die Resultate der vorliegenden Studie zeigten zum ersten Mal die histologische Regeneration der parodontalen Gewebe in Furkationsdefekten Klasse III durch Anwendung von rekombinantem humanem Amelogenin, d.h. einem einzelnen, definiertem Protein. Darüberhinaus wurden *in vitro* Effekte des Amelogenins auf zelluläre Funktionen, die mit Wundheilung und Regeneration assoziiert sind, bei parodontalen Fibroblasten nachgewiesen.

### 6.1 In vitro

Die parodontalen Gewebe werden durch Zellen gebildet, die in einer präzisen Abfolge zur Proliferation und Differenzierung stimuliert werden müssen, wobei die zellulären Produkte in Wechselwirkung zu benachbarten Zellen und Geweben stehen. Parodontale Regeneration gilt daher, im Vergleich zur Heilung des Weichgewebes, als komplexer Vorgang, in dem Interaktionen zwischen Hart- und Weichgeweben, wie Knochen, Bindegewebe und Epithel stattfinden müssen [143, 177]. Es ist bekannt, dass die Proteine der extrazellulären Matrix wichtig für die Proliferation bzw. Differenzierung von Zellen sind und damit Zellwachstum sowie andere Zellfunktionen regulieren [44, 110]. Extrazelluläre SMP werden während der frühen Entwicklung der Zahnwurzeln als Produkt ektomesenchymaler Zellen synthetisiert, und es wurde gezeigt, dass sie die Bildung des Wurzelzementes initiieren mit nachfolgender Formation des parodontalen Ligaments und des

Knochens [52, 106, 153, 254]. In vitro konnten bei parodontalen Ligamentzellen (PDL-Zellen) Funktionen wie Attachment, Proliferation und Proteinsynthese durch Stimulierung mit SMP signifikant gesteigert werden [83, 163, 285]. Es ist jedoch nicht geklärt, wie Fraktionen der extrazellulären Schmelzmatrixproteine auf PDL-Zellen wirken bzw. welche Proteinkomponenten bei einzelnen Zellfunktionen aktiv sind.

In der vorliegenden Studie sollten daher verschiedene Wirkungen der SMP auf zelluläre Funktionen, die mit parodontaler Wundheilung einhergehen, bei humanen PDL-Zellen in vitro bestimmt werden. Insbesondere Zellproliferation, Kollagensynthese, Synthese von biologisch aktiven Mediatoren und Mineralisationsparameter wurden untersucht, wobei auf molekularbiologischer Ebene die Expression spezifischer mRNA qualitativ nachgewiesen wurde. Die untersuchten humanen PDL-Zellen stellen den maßgeblichen Zelltyp für parodontale Regeneration dar, so dass die Steuerung ihrer zellulären Funktionen von besonderem Interesse ist [163, 171, 261]. In unserer Studie wurden daher primäre Zellen von der Wurzeloberfläche extrahierter Zähne mehrerer Spender verwendet, um der Wundheilungssituation nahe zu kommen und der biologischen Variation Rechnung zu tragen [87, 98, 115]. Die Zellen wurden überwiegend zwischen der dritten und fünften Passage eingesetzt, wobei höhere Passagen nicht mehr angewendet wurden, da phänotypische Veränderungen eintreten können. Die Verwendung primärer PDL-Zellen entspricht der In-vivo-Situation am nächsten, auch wenn berücksichtigt werden muss, dass eine heterogene Zellpopulation vorliegt [191, 260]. Permanente oder langlebende Zelllinien sind für bestimmte Fragestellungen von Nutzen, müssen aber im Rahmen der parodontalen Regeneration aufgrund des komplexen Zusammenspiels verschiedener Zelltypen mit Vorsicht interpretiert werden [103, 111, 236].

Die Stimulierung von Zellproliferation ist ein wichtiger Parameter, der für die Anwesenheit einer kritischen Zellmasse und damit für die regenerative Wundheilung entscheidend ist. Dies ist vor dem regelmäßig berichteten Hintergrund zu sehen, dass die frühe Wundheilung bei Anwendung von SMP deutlich verbessert ist [211, 237, 295]. Es wurde in vitro mehrfach gezeigt, dass die Anwendung von SMP die Proliferation verschiedener Zellen, wie PDL-Zellen, Osteoprogenitorzellen oder Zementoblasten, steigern konnte [82, 281]. Neben der

gesteigerten Proliferation von PDL-Zellen durch SMP wurde auch ein direkt stimulierender Effekt auf die frühe Wundheilung durch vermehrte Zellrekrutierung nachgewiesen [116]. In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls ein stimulierender Effekt auf die Proliferation von PDL-Zellen gezeigt, der nicht nur auf EMD beschränkt war, sondern auch bei Stimulierung mit SMP-Fractionen und dem rekombinanten Amelogenin auftrat. Es kann daraus geschlossen werden, dass Amelogenin allein wie auch in Kombination mit anderen Bestandteilen der SMP eine Förderung der Zellproliferation bewirkt. Die im Mittel höhere Zellproliferation bei Kultivierung der PDL-Zellen mit EMD impliziert zwar eine stimulierende Wirkung auch anderer Proteine und/oder Peptide, jedoch war der Unterschied zu den Testsubstanzen nicht signifikant. Lediglich die Gesamtproteinfraktion und die Enamelin-angereicherte Fraktion zeigten keine signifikanten Proliferationswerte, so dass vermutlich aktive Mediatoren durch die Art der Präparation entfernt wurden. Da hierzu wenig Literatur verfügbar ist, kann lediglich auf eine skandinavische Arbeit verwiesen werden, in der ebenfalls keine gesteigerten Zellfunktionen nach Stimulierung mit der Gesamtproteinfraktion festgestellt wurden [83]. Diese im Wesentlichen übereinstimmenden Ergebnisse wurden zudem durch Verwendung verschiedener Methoden validiert, so z.B. durch Zellzählung, durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau, durch Einbau des Pyrimidin-analogs BrdU oder durch MTT-Aktivität [103, 163, 236, 285]. In unserer Untersuchung wurden als Proliferationsparameter zwei etablierte Methoden angewendet, wobei die Nukleinsäuresynthese mittels BrdU-Einbau bzw. die mitochondriale Aktivität mittels MTT-Test kongruente Resultate ergaben. Beide Verfahren bestätigten die erhöhte Proliferation, so dass Störfaktoren wie das mögliche Mißverhältnis zwischen einer kleinen Anzahl proliferierender Zellen und überschüssiger nicht-proliferierender Zellen oder die Induktion der DNA-Synthese bei sistierenden Zellen, weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Es ist daher davon auszugehen, dass EMD, durch Guanidin/HCl extrahierte Proteine, wie auch Amelogenin allein die Proliferation von PDL-Zellen fördern und somit die parodontale Wundheilung begünstigen können.

Nach zwei und fünf Tagen zeigten sich anhand immunhistologischer Anfärbungen erhöhte Expressionen von Kollagen Typ I in den Zellkulturen. Die Kollagendarstellung war besonders deutlich bei Stimulierung der PDL-Zellen mit EMD, der Amelogenin-reichen Fraktion und dem rekombinanten Amelogenin-

Protein (rHAM). Kollagen I als wichtigstes Strukturprotein des Halteapparates, des Knochens und der extrazellulären Matrix nimmt eine bedeutende Rolle in der Wundheilung parodontaler Läsionen ein [186]. Durch den fibrillären, vernetzten Aufbau kann Kollagen hohe Zugkräfte aufnehmen, ohne dass es zu Gewebeschädigungen kommt. Die Bedeutung der extrazellulären Matrix mit dominierenden Kollagenanteilen für die Zementogenese ist in einer neuen Studie morphologisch bestätigt worden [24]. Eine erhöhte Expression von Kollagen Typ I bei Stimulierung mit EMD wurde bereits bei dentalen Follikelzellen [103] und primären Osteoblasten [131] gezeigt, während Osteosarkom-Zelllinien keine veränderte Kollagenbildung aufwiesen [236]. Die Wirkungen scheinen daher wesentlich vom Zelltyp und Differenzierungsgrad abzuhängen. In der vorliegenden Studie wurde speziell gezeigt, dass humane PDL-Zellen durch die Anwendung von Amelogenin-Proteinen bezüglich Kollagensynthese als wichtigem Parameter für frühe Wundheilung und parodontale Regeneration stimuliert werden konnten.

Nach einigen Tagen in der Kultur zeigten die PDL-Zellen bei Stimulierung mit SMP eine erhöhte Synthese von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- $\beta$  und IGF-1. Besonders EMD, die Amelogenin-angereicherten Fraktionen und rHAM waren potente Stimulanzien für die Induktion dieser Wachstumsfaktoren. TGF- $\beta$  ist ein pluripotenter Wachstumsfaktor, der hauptsächlich mit Thrombozyten und Knochengewebe assoziiert ist [45, 123]. Er hat eine Reihe von Effekten, die von den Zielzellen und den Umgebungsfaktoren abhängen. Von den Isoformen des TGF- $\beta$  ist besonders TGF- $\beta$ 1 in der Wundheilung aktiv, wobei es in der Formation der extrazellulären Matrixproteine, der Angiogenese und der Expression von Integrinen eine bedeutende Rolle spielt [266, 270]. Die Erhöhung des TGF- $\beta$ 1 bereits nach zwei Tagen könnte für die frühe Wundheilung bedeutsam sein, da TGF- $\beta$ 1 in dieser Phase vermehrt auftritt und mit Kollagensynthese assoziiert ist [30]. In Studien wurde nachgewiesen, dass TGF- $\beta$ 1 Zelldifferenzierung, Proliferation von Osteoblasten und die Synthese extrazellulärer Matrix stimulieren kann, so dass TGF- $\beta$ 1 als potentieller Faktor in der parodontalen Regeneration gilt [81, 118, 202]. In einer neueren Arbeit konnte bei PDL-Zellen auf RNA-Ebene zudem die Expression von Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5), einem Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie, mit Wirkung auf Zellproliferation und -reifung

nachgewiesen werden [183]. Unsere Ergebnisse bezüglich TGF- $\beta$ 1-Freisetzung bestätigen frühere Studien, die sich jedoch allein auf die Verwendung von EMD stützten [163, 285]. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die SMP zur Beschichtung (Coating) oder direkt im Medium eingesetzt werden, da die hydrophoben und schlecht löslichen SMP in wässriger Lösung auf dem Boden der Kulturflasche präzipitieren und eine Proteinschicht bilden, die dem Coating entspricht [285].

IGF-1 hat eine generelle Rolle beim Wachstum und Turnover von Knochengewebe bzw. mesenchymaler Zellen [231]. Da IGF-1 als mitogener Faktor auf Fibroblasten wirkt und Osteoblasten stimuliert, wurde IGF-1 in Studien bereits zur Förderung der parodontalen Regeneration eingesetzt [84, 162]. In einem Zellkulturmodell mit Fibroblasten zur zellvermittelten Wundheilung wurde gezeigt, dass IGF-1 die Wundkontraktion und Remodeling-Prozesse initiieren kann [166]. In unserer Studie zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IGF-1-Synthese von humanen PDL-Zellen mit rekombinantem Amelogenin und EMD bereits nach zwei Tagen, wobei die Erhöhung nach neun Tagen noch Bestand hatte. Damit bestätigten die Ergebnisse eine neuere Studie mit PDL-Zellen, in der erhöhte IGF-1 und TGF- $\beta$ -Freisetzungen nach Emdogain<sup>®</sup>-Stimulierung mit nachfolgend erhöhter Zellproliferation nachgewiesen wurden [195]. Man kann daher vermuten, dass die Kokultivierung von PDL-Zellen mit Amelogenin allein oder der Mischung der SMP die autokrine Produktion von IGF-1 steigern und damit die parodontale Wundheilung fördern kann.

Interleukin-1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das mit Knochenresorption, und Weichgewebezzerstörung assoziiert ist sowie allgemein als Marker für Attachmentverlust und Aktivität der Parodontitis gilt [32, 46]. Die Messungen von IL-1 ergaben trotz reproduzierbarer Standardkurven keine auswertbaren Daten, so dass vermutlich keine IL-1-Produktion der PDL-Zellen, unabhängig von der Stimulierung mit SMP, vorhanden ist. Die Bestimmung von IL-1 sollte erfolgen, um eine mögliche Induktion von Entzündungsparametern zu bestimmen bzw. auszuschließen. Unsere Ergebnisse sind eine Bestätigung anderer Studien mit PDL-Zellen, die ebenfalls keine Synthese von IL-1 nach mechanischem Stress oder SMP-Stimulierung zeigten [29, 163].

Osteopontin als Adhäsionsmolekül der extrazellulären Matrix wird in hohen Mengen an Mineralisationsfronten und bei der Zementogenese gefunden, wobei

vor allem Präosteoblasten in der frühen Phase und reife Osteoblasten während des Remodelings Osteopontin exprimieren [31, 135, 258]. In der frühen Phase der parodontalen Regeneration tritt Osteopontin vermehrt auf und geht der Expression von Bone Sialoprotein (BSP) zeitlich voraus [147]. Da PDL-Fibroblasten als heterogene Zellpopulation mineralisiertes Gewebe bilden können, wurde in der vorliegenden Studie der Gehalt an Osteopontin im Mediumüberstand mit ELISA bestimmt. Es zeigten sich Osteopontin-Konzentrationen zwischen 5 und 30 ng/ml, wobei zwischen den Test- und Kontrollkulturen keine signifikanten Unterschiede auftraten. Es ist zu vermuten, dass aufgrund der heterogenen Struktur der PDL-Zellen Parameter, die mit Zemento-, Osteoblasten oder Mineralisierung assoziiert sind, auf Proteinebene nicht eindeutig hochreguliert werden, da sehr viele nicht-mineralisierende Zellklone vorhanden sind, die erst unter geeigneten Bedingungen mineralisieren können [191]. In Studien wurde bestätigt, dass Zementoblasten vermehrt Osteopontin exprimieren, jedoch kaum PDL-Zellen [59, 108]. Andererseits konnte auf RNA-Ebene gezeigt werden, dass Osteopontin bei PDL-Zellen und Zementoblasten exprimiert wurde, aber nicht bei gingivalen Fibroblasten [129]. Osteopontin wurde auch bei Affen und beim Menschen immunhistochemisch in der regenerativen Heilung des Parodonts an der Grenzlinie des neu geformten Zements und Knochens nachgewiesen [240, 241]. Insgesamt konnte damit die mögliche Rolle der PDL-Zellen in der Bildung mineralisierten Gewebes nachgewiesen werden, obwohl in unserem Zellkulturmodell wie auch in anderen Studien keine erhöhte Osteopontin-Konzentration nach Stimulierung mit SMP gezeigt werden konnte.

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) wurde nicht nur auf endothelialen Oberflächen als Mediator von Zellattachement nachgewiesen, sondern auch auf Fibroblastenoberflächen [133, 189]. Im Rahmen der knöchernen Regeneration spielt ICAM-1 bei der Osteoblastenadhäsion und beim Knochenmetabolismus eine regulative Rolle [272]. In unserer Studie wurde die Expression von ICAM-1 auf PDL-Fibroblasten anhand eines Zelloberflächen-ELISA gezeigt, und zwar sowohl bei den unstimulierten Kontrollen als auch bei Kokultivierung mit SMP. Die Ergebnisse gegenüber den Kontrollen waren bei Stimulierung mit EMD signifikant erhöht, während die anderen Fraktionen lediglich im Trend erhöhte Werte zeigten. Damit liegt die Vermutung nahe, dass ICAM-1 auch in der Zelladhäsion von PDL-

Fibroblasten eine Rolle spielt und das gesteigerte Zellattachment bei EMD-Stimulierung Gewebeumbau- und Remodeling-Prozesse beeinflussen kann [180, 244]. Dies wäre ein zweiter, indirekter Mechanismus in der Funktion des EMD als Attachmentprotein [117]. Vor einer endgültigen Beurteilung müssen diese vorläufigen Ergebnisse in einer umfassenden Versuchsreihe bestätigt werden. Insgesamt konnte diese Versuchsreihe zeigen, dass bei Stimulierung mit SMP, auch mit rekombinantem Amelogenin, biologische Mediatoren wie IGF-1 und TGF- $\beta$ 1, deutlich erhöht sind. Zusammen mit dem Nachweis von Osteopontin als Mineralisationsmarker und ICAM-1 als Adhäsionsmolekül konnten damit bei humanen PDL-Zellen Funktionen gezeigt werden, die wesentlich zur parodontalen und knöchernen Regeneration beitragen.

Für die Osteogenese bzw. Mineralisation spielen spezifische räumliche Anordnungen der Substrate, die für die Kristallisation notwendig sind, eine bedeutende Rolle, damit der Mineralisationsprozess initiiert und unterhalten wird. Im Knochengewebe stellt dieses Gerüst die Kollagenfibrille bzw. die Kollagenmatrix dar [144, 271]. Zur Untersuchung der Zelldifferenzierung und Mineralisation wurde ein dreidimensionales Organoidkulturmodell mit hoher Zelldichte verwendet, das mit der In-vivo-Situation sehr gut vergleichbar ist. Die Organoidkultur ermöglicht die Ausbildung intensiver Zellkontakte und zelltypische Mikroumgebungen, die als Voraussetzungen für histiotypische Differenzierung in vitro notwendig sind [38, 314, 315]. Während in der Organoidkultur die Zelldifferenzierung gefördert wird, findet Proliferation kaum statt [93, 269].

Die PDL-Fibroblasten wurden daher in der Organoidkultur unter Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure auf ihr Mineralisationspotential und damit auf ihre Differenzierung zu hartgewebsbildenden Zellen untersucht [22]. Die Mineralisation wurde anhand der Kalziumakkumulation direkt in den Kulturen und parallel der Gehalt an alkalischer Phosphatase (ALP) bestimmt [101]. ALP gehört zur Gruppe der membrangebundenen Glykoproteine und ist von den Enzymen, die zentral am Mineralisationsprozess beteiligt sind, am genauesten untersucht [3, 95]. Durch das Enzym kommt es zur Präzipitation von Kalziumphosphat in Lösungen von Phosphateestern sowie Kalziumsalzen, und in Bereichen der Mineralisation von Knochen und Knorpel steigt die ALP-Konzentration stark an [305]. Nach 21 Tagen Kultivierungszeit zeigten sich reproduzierbar erhöhte

Kalzium- und ALP-Werte, so dass die Mineralisationsfähigkeit der PDL-Zellen unter geeigneten Bedingungen nachgewiesen werden konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien [9, 102, 151]. Die zusätzliche Stimulierung mit SMP ergab tendenziell erhöhte Mineralisationsparameter, vor allem bei EMD, der EMD-Fraktion und rHAM, die aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle waren. Mit dem erhöhten Differenzierungsgrad der Zellen in der Organoidkultur war auch die Stimulierung der Kollagensynthese durch SMP nicht mehr signifikant verschieden. Die Mineralisation der PDL-Zellen variierte allerdings in den einzelnen Versuchen recht deutlich, da primäre Zellen eingesetzt wurden und in der heterogenen PDL-Zellpopulation auch viele nicht-mineralisierende Fibroblasten enthalten sind [284, 285]. Dagegen resultierten Untersuchungen mit Osteoblasten von Mäusen in einer reproduzierbaren, erhöhten Mineralisierung bei Stimulierung mit Emdogain® [101, 312]. Man kann aus diesen Daten schlussfolgern, dass Behandlungen der PDL-Fibroblasten mit Amelogeninen besonders die Parameter der primären Wundheilung fördern, während die direkten Mineralisationsparameter zu späteren Zeitpunkten weniger deutlich beeinflusst werden. Dies wurde auch in vergleichbaren Studien bestätigt [103, 136] und unterstreicht die Rolle der Amelogenine als Signalmoleküle [288].

Grundsätzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass PDL-Zellen mit hoher ALP-Aktivität Zement- und Knochen-ähnliche Strukturen in vitro bilden können und zu Zementoblasten werden, die auch extrinsische Sharpey-Fasern bilden [114, 213, 235]. ALP spielt insgesamt eine essentielle Rolle in der Zementogenese, so dass in der Synthese des ALP eine wichtige Voraussetzung für parodontale Regeneration besteht [15, 181]. ALP-positive Subpopulationen der PDL-Zellen wurden auch als geeignete Kandidaten beschrieben, die in der Rekonstruktion parodontaler Gewebe durch Tissue Engineering Verwendung finden können [181].

Nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf RNA-Ebene konnte in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden, dass PDL-Zellen wichtige Mediatoren der Knochenheilung und Regeneration exprimieren. Dies steht in Übereinstimmung mit Studien zur Expression von mRNA bei PDL-Zellen [119, 308]. Qualitativ zeigte sich in der PCR eine reproduzierbare Expression von Markern, die mit weichgewebiger bzw. knöcherner Wundheilung assoziiert sind.

Dazu zählten Kollagen Typ I, Bone Sialoprotein (BSP), Osteonektin und Osteopontin, während Osteocalcin-Expression nicht nachgewiesen werden konnte. Hierbei besteht weitgehend Konsens zu der mRNA-Expression parodontaler Zellen in vergleichbaren Studien bei verschiedenen Spezies [58, 59, 230]. Neueren Untersuchungen zufolge korrelierte besonders die BSP mRNA-Expression mit der Fähigkeit von Alveolarknochen- und PDL-Zellen, mineralisiertes Gewebe zu bilden [99]. Wie auch in der vorliegenden Untersuchung wurde damit die Rolle des BSP sowie das bedeutende Potential der PDL-Zellen für die parodontale Regeneration bestätigt. Die Behandlung von dentalen Follikelzellen mit Emdogain® in einer anderen Studie förderte die Expression der Osteopontin-spezifischen mRNA, hingegen wurde die mRNA-Expression für Osteocalcin gehemmt [103]. Dies würde auch die fehlende Osteocalcin-Expression in der vorliegenden Studie erklären. Andererseits könnte auch der Zeitpunkt der Messungen eine Rolle spielen, so dass eine mögliche spätere Osteocalcin-Expression nicht erfasst werden konnte.

Relevante Unterschiede zwischen den Stimulierungen mit SMP und den Kontrollen wurden nicht evident. In einer methodisch vergleichbaren Untersuchung mittels RT-PCR an Fibroblasten aus Gingivahyperplasien konnten ebenfalls nur geringe Unterschiede in der Expression von extrazellulären Matrixproteoglykanen nachgewiesen werden [92]. Die mRNA-Expression von Zellen aus dem Parodont kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden und ist von den verwendeten Zellen, der Zeit sowie den Versuchsbedingungen abhängig [268, 313]. Zeitlich erschien im parodontalen Ligament die Expression von Osteopontin, vor allem an den Grenzlinien zum Alveolarknochen, der Expression von anderen Knochenmarkerproteinen wie BSP voranzugehen [148]. In Studien an Ratten ging die Osteopontin-Expression auch der Zellproliferation voraus und wurde somit als früher Marker der parodontalen Regeneration beschrieben [147]. In einer aktuellen Untersuchung wurde bei Kokultivierung von mesenchymalen Stammzellen mit PDL-Fibroblasten die Expression von Osteopontin nachgewiesen und die mögliche Rolle von Stammzellen in der Entwicklung parodontaler Ligamentzellen sowie der Regeneration hervorgehoben [142]. Die mRNA-Expression der PDL-Zellen unterliegt weiteren Regulierungen, insbesondere mechanischem Stress oder, wie für mRNA von Osteopontin gezeigt wurde, der Kalziumionen-Konzentration [67,

214]. Insgesamt wurden anhand der RT-PCR wichtige Marker für parodontale Regeneration nachgewiesen und die besondere Rolle der PDL-Fibroblasten unterstrichen. Dennoch sind für die Bestimmung präziser Mechanismen der Regeneration weitere Untersuchungen, auch auf RNA-Ebene, notwendig.

PDL-Zellen sind vielen Studien zufolge relevant für Reparatur, Regeneration und Turnover des Zahnhalteapparates. Regenerative Methoden unterliegen damit der Kontrolle von Mediatoren, die bei PDL-Zellen Wachstum sowie Fähigkeiten stimulieren, parodontales Ligament und mineralisiertes Gewebe zu bilden. Anhand von humanen PDL-Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass (1) PDL-Zellen wichtige Charakteristiken aufweisen, die mit Regeneration assoziiert sind, (2) Proliferation, Synthese von Kollagen und Wachstumsfaktoren bei Kokultivierung mit SMP gesteigert sowie Expression von spezifischer mRNA nachgewiesen wurden, (3) auch die Stimulierung mit Amelogenin als singulärem Protein signifikante Steigerungen ergab. Erstmals zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass in Anwesenheit von rekombinantem Amelogenin *in vitro* wesentliche Zellfunktionen stimuliert und damit Prozesse unterstützt wurden, die für regenerative Heilung von großer Bedeutung sind.

## 6.2 In vivo

Die Proteinpräparationen sollten in einem geeigneten Modell *in vivo* evaluiert werden, um deren Wirkungen in Hinblick auf einen klinischen Einsatz beim Menschen beurteilen zu können. In der vorliegenden Studie wurde daher ein Tiermodell verwendet, bei dem identische kontralaterale Läsionen geschaffen wurden, die als Kontrolldefekte bzw. zur Evaluierung der Proteinpräparationen dienten. Dabei wurden nicht-horizontale Klasse III-Furkationsdefekte geschaffen und die Zähne mehrerer Quadranten behandelt, um eine möglichst grosse Nähe zur klinischen Situation bei Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis zu gewährleisten [152]. Es ist wichtig, dass die Kontrollseite innerhalb desselben Tieres evaluiert werden muss, um die Heilung und Gewebeantwort nach der Therapie akkurat zu beurteilen, da die Ergebnisse zwischen den Tieren sehr variabel sein können [5]. Deshalb wurde in unserer Studie bei jedem Tier immer ein Quadrant als Kontrollquadrant behandelt, d.h. mit konventioneller

Lappenoperation ohne Proteinstimulierung. Die Behandlung von Furkationsdefekten Grad III wurde gewählt, um die Testbehandlungen in einer schwierigen klinischen Situation zu evaluieren, die bislang nicht erfolgreich regenerativ therapiert werden kann [130, 210]. Dagegen erfolgten die bisherigen histologischen Untersuchungen zu SMP überwiegend in nichtentzündlichen Rezessionsdefekten oder infraalveolären Parodontaldefekten [107, 238].

Für die Beurteilung der Ergebnisse spielt eine Rolle, dass die Defekte im vorliegenden chronischen Defektmodell keine deutliche spontane Regeneration zeigten, wie z.B. bei einem akuten Defektmodell [296]. Das chronische Modell beinhaltet die chirurgische Schaffung von größeren Defekten und die nachfolgende Förderung chronischer Entzündung durch Anlegen eines Drahtes in die Läsion mit Plaqueakkumulation [53]. Vor experimentell-rekonstruktiver Therapie sollten somit die chirurgisch induzierten Defekte Parodontitis-stimulierenden Bedingungen ausgesetzt werden. Dieses Modell ist in vielen Studien angewendet worden, um regenerative Methoden im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit konventioneller Lappenoperation zu evaluieren [4, 6, 246, 300]. Daher ist die vorliegende Studie abzugrenzen von Untersuchungen, die allein die Behandlung nichtentzündlicher Fenestrationsdefekte zum Inhalt hatten [37, 43, 107]. Zur adäquaten Evaluierung der histometrischen Analysen und zur Etablierung neuen Attachments nach rekonstruktiver Chirurgie ist die Entfernung des gesamten Wurzelzements oberhalb der Markierungsrillen essentiell [84, 298]. Zähne mit Restzement auf der Defektoberfläche können nur Reattachment zeigen und müssen von der Analyse ausgenommen werden. Der Wundverschluss wurde in Anlehnung an chirurgische Prinzipien initiiert durch Periostschlitzen an der Lappenbasis der Mukoperiostlappen, um die Lappenspannung zu verringern [303]. Insgesamt entsprachen die Bedingungen für die Defekte sowie für den Wundverschluss bei transgingivaler Zahnpositionierung mehrheitlich klinischen Situationen bei der rekonstruktiven Therapie von Parodontitispatienten.

Die geplante Studie wurde an Beagle-Hunden durchgeführt. In der Parodontologie sind Untersuchungen am Hund, meist Beagle, seit Jahren das am besten etablierte Tiermodell. Parodontitis am Hund ähnelt der humanen Parodontitis in der Zusammensetzung der Bakterienflora und in den Heilungsvorgängen wie in der Tatsache, dass Parodontitis auch beim Hund eine natürlich auftretende

Erkrankung ist [84]. Auf Grund der Zahnstellung und –anatomie lassen sich Vergleiche zum Menschen sehr gut durchführen.

Das Hunde-Modell wird vor allem für Studien zur parodontalen Regeneration als sehr geeignet angesehen und wurde daher zur Untersuchung der regenerativen Wundheilung oftmals herangezogen [74, 137, 149, 152, 289]. Die Heilungsmuster und die Dynamik der Gewebekonstruktion sind in einer Reihe von Studien untersucht worden und ergaben, dass Heilung und Regeneration beim Hund sehr ähnlich, aber meist schneller und kompletter verlaufen als beim Menschen. Dieses Studienmodell ist weiterhin von Vorteil, da bei Beagle-Hunden mit vergleichsweise geringem Aufwand Mundhygienemaßnahmen realisiert werden können, so dass die klinischen Rahmenbedingungen weitgehend den Behandlungen beim Menschen ähneln. Bei Tieren mit deutlich kleineren Zähnen wie Ratten oder Kaninchen sind Parodontaldefekte und Knochenregeneration in einer dem Menschen vergleichbaren Größenordnung nicht möglich. Das Schwein als mögliches Versuchstier bietet sich wegen ungünstiger anatomischer Verhältnisse der Zähne und des umgebenden Knochens nicht an. Obwohl die Zahngröße geeignet wäre, machen der ausgeprägte Engstand und der meist dünne Knochen Auftreten und Behandlung von vergleichbaren Parodontaldefekten mit Furkationsgrad III unmöglich. Eine Defektform aber, die topographisch nicht den humanen Defekten entspricht, erlaubt selbst bei günstiger Beeinflussung der Knochenregeneration wenig Rückschlüsse auf die Behandlung humaner Parodontaldefekte. Zahlreiche Untersuchungen zur biologischen Steuerung der Regeneration mit aktiven Proteinen wie Bone morphogenetic proteins (BMPs) [85, 246, 248] oder Wachstumsfaktoren [48, 199, 299] wurden daher am Hundemodell realisiert.

Zur Beurteilung neuer regenerativer Techniken sind neben dem biologischen Potential reproduzierbare Defektcharakteristiken und die Evaluierung der Gewebereaktionen im Sinne der Sicherheit und Effizienz von Bedeutung [109, 243]. In der vorliegenden Studie konnten gleichartige, reproduzierbare Defekte an den Ober- und Unterkieferzähnen geschaffen werden, die sich bei allen Behandlungsmodalitäten in der Heilung ohne Besonderheiten zeigten. Die Tiere konnten bereits kurz nach Beendigung der Narkose trinken und wenig später mit der Aufnahme ihrer gewohnten Nahrung beginnen. Bei keinem Tier musste der Versuch modifiziert oder abgebrochen werden. Durch die Einbeziehung mehrerer

Zähne des Ober- und Unterkiefers konnte vor allem die Anzahl der Versuchstiere deutlich reduziert werden. Im Vergleich der Heilung zwischen Ober- und Unterkieferdefekten ergaben sich keine Unterschiede, so dass diese Vorgehensweise als vorteilhaft anzusehen ist [138].

Die histologischen Resultate zeigen, dass die Anwendung von rekombinantem humanem Amelogenin parodontale Regeneration fördern konnte, d.h. dass die Neubildung von Zement, Knochen und parodontalem Ligament in einer gezielten Abfolge gemeinsam realisiert wurde. Die Qualität des neuen parodontalen Ligaments war identisch zur natürlichen Anatomie des Halteapparats. Weiterhin wurden keine Gewebereaktionen, wie Wurzelresorptionen, Ankylose oder Fremdkörperreaktionen beobachtet. Damit liegen erstmals Ergebnisse zur parodontalen Regeneration mit rekombinantem Amelogenin vor, die zeigen, dass das einzelne, definierte Protein für die koordinierte Bildung von Zement und parodontalem Ligament entscheidend sein kann. Bisher wurde in vergleichbaren Tierstudien das kommerzielle Präparat Emdogain<sup>®</sup> als Gemisch verschiedener SMP untersucht, wobei sich die Regeneration in qualitativer, nicht aber quantitativer Hinsicht gegenüber konventioneller Lappenoperation unterschied [6]. Im Vergleich zur Wurzelkonditionierung mit Phosphorsäure zeigte die Behandlung mit Emdogain<sup>®</sup> in einer ähnlichen Studie an Hunden qualitativ und quantitativ verbesserte Weich- und Hartgewebeparameter, allerdings wurden die Resultate bereits nach 28 Tagen erhoben und können damit nur für eine frühe Heilungsperiode stehen [227]. Die vorliegende wie auch andere Studien zeigen, dass zur Beurteilung der parodontalen Regeneration mit Hart- und Weichgewebeparametern eher ein Beobachtungszeitraum von 8 Wochen oder mehr adäquat erscheint [7, 304]. In einer neueren Studie an Affen zeigte die Behandlung mit Emdogain<sup>®</sup> variable Attachment- und Knochenneubildung, die gegenüber Lappenoperation erhöht, aber nicht kontinuierlich nachweisbar war [66]. Die Förderung der regenerativen Heilung durch Emdogain<sup>®</sup> wurde in einer weiteren Studie an Affen nachgewiesen, wobei die Art der Heilung aber von der Defektgröße und -konfiguration abhängig war [54]. Auch in dieser Studie zeigten sich variable Ergebnisse sowohl mit Emdogain<sup>®</sup> als auch in den Kontrollen, bei denen die Wurzeloberflächen mit EDTA konditioniert wurden. Allerdings wurden bei den Tieren in der Heilungsphase keine Plaqueentfernungen durchgeführt, so dass Unterschiede zur konventionellen Vorgehensweise bei Menschen und

Hunden vorlagen. Die Autoren favorisierten ein Versuchsmodell an Affen wegen der Nähe zum Menschen, wie teilweise in der Literatur beschrieben [11, 160, 218]. Obwohl beide Tiermodelle in der Parodontologie Verwendung finden können, sind die Ergebnisse entsprechend der Bedingungen und der Vergleichbarkeit zur Therapie beim Menschen mit Bedacht zu beurteilen [84].

In der vorliegenden Studie ergab die Anwendung des rekombinanten Amelogenins gegenüber der Kontrolle sowie der SMP-Gemische eine auch quantitativ verbesserte regenerative Heilung. Das Ausmaß an hartgewebiger Regeneration lag prozentual in der gleichen Größenordnung wie in einer Vergleichsstudie mit basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (b-FGF), obwohl die absoluten Dimensionen in der vorliegenden Studie deutlich größer waren [225]. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse legt nahe, dass Amelogenin als einzelnes Protein eine Serie von Vorgängen bzw. Prozessen in Gang setzen kann, die in einer morphologischen Rekonstitution des parodontalen Ligaments resultieren. Damit ist die für Regeneration entscheidende Rolle des Amelogenins als Hauptbestandteil der SMP deutlich zu unterstreichen [172]. Unterstützt wird diese Aussage durch die ebenfalls signifikant erhöhte regenerative Heilung bei Stimulierung mit dem fraktionierten Emdogain<sup>®</sup>-Protein, das als wesentlichen Bestandteil Amelogenin in reinerer Form enthält. Bezeichnenderweise sind beide Präparationen in geringeren Konzentrationen verwendet worden als die kommerzielle Emdogain<sup>®</sup>-Präparation oder die anderen verwendeten SMP-Gemische. Da die stimulierenden Wirkungen der SMP von der Konzentration und vom zellulären Umfeld abhängig sind, ist zu vermuten, dass die sehr hohe Konzentration der SMP-Gemische Hemm-Mechanismen in Gang setzt bzw. dass möglicherweise vorhandene Inhibitoren wirksam werden. Tatsächlich wurden bisher kaum Studien zur Konzentration der SMP im klinischen Einsatz durchgeführt [28, 82]. Die osteopromotiven Effekte auf Knochenzellen waren dabei eindeutig konzentrationsabhängig [28]. Dies könnte zum Teil erklären, dass in klinischen Studien zur parodontalen Regeneration insgesamt ein positiv fördernder Effekt der SMP resultierte, sich jedoch variable Ergebnisse zeigten [65, 71, 78, 317]. Die nachgewiesenen stimulierenden Effekte in vitro, die auf eine aktive Wirkung der SMP deuten, stehen dazu nicht in Widerspruch, da die optimalen Konzentrationen für beide Untersuchungsmethoden sehr unterschiedlich sein können [163, 201, 217, 265]. Es muß betont werden, dass

Zellkulturstudien der exakten Bestimmung von Effekten bei Anwesenheit von Schmelzmatrixproteinen unter definierten Bedingungen dienen. Dies ermöglicht die separate Identifikation von Mechanismen und Faktoren der biologischen Antwort. Im Gegensatz zu den Zellkulturstudien sind die In-vivo-Experimente entscheidend zur Bestimmung des Gesamteffekts einer speziellen Behandlung. Daher sind sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Studien wichtig, um die Mechanismen der Steuerung der parodontalen Regeneration durch Schmelzmatrixproteine zu verstehen.

Neben der Konzentration scheinen Defektgröße und Art der Anwendung zu determinieren, inwieweit die zusätzliche Anwendung von Emdogain® zu einer reproduzierbaren, verbesserten Regeneration führen kann [53, 97]. Die Größe der Furkationsdefekte und des Knochenabbaus an den Defekten spielen prinzipiell für das Ausmaß der Heilung nach GTR-Behandlung eine Rolle [139, 208]. So wurde gezeigt, dass Furkationsdefekte mit einer Querschnittsfläche von mehr als 4 mm<sup>2</sup> schwieriger und weniger reproduzierbar regeneriert werden können als kleinere Defekte [209]. Dies würde auch erklären, dass in der vorliegenden Studie bei keinem Defekt ein kompletter Verschluss der Furkation zu beobachten war, da alle Defekte weitaus größere Dimensionen hatten als 4 mm<sup>2</sup>. Daher sind besonders die Vergleiche zwischen Kontrollen und Testbehandlungen als relevante Bezugsgrößen anzusehen, zumal sie unter identischen Versuchsbedingungen erhoben wurden.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie resultierte die Applikation von Emdogain® in Furkationsdefekten Grad III bei Hunden nicht in einem quantitativen Unterschied an mineralisiertem Gewebe im Vergleich zur Kontrolle [6]. Die anderen, in unserer Studie getesteten Proteinfractionen zeigten gegenüber der Kontrolle nach acht Wochen ebenfalls keine eindeutig gesteigerte Regeneration bzw. keine koordinierte Hart- und Weichgewebekonstruktion. Neben den Konzentrationen der Amelogenin-Präparationen könnte hierbei auch der hydrophile Charakter, insbesondere der Non-Amelogenin-Proteine der Cx-Fraktion, eine Rolle spielen. Da hydrophile Proteine leicht verdünnt werden, könnte die unzureichende Präzipitation der Proteine und die ausbleibende Bildung einer Proteinschicht auf der Wurzeloberfläche die Ursache für den ausbleibenden klinischen Effekt darstellen. Ein möglicher Lösungsansatz wäre hier die Verwendung eines anderen Carriers als Propylen-Glykolalginat in der

vorliegenden Studie. So wurden beispielsweise die Verwendung von Kollagenschwämmen, demineralisierter Knochenmatrix oder Poly-Lactid-Glycolid-Partikel als Carrier untersucht, ohne dieses Problem bisher lösen zu können [49, 248]. Alles in allem deuten jedoch viele Hinweise auf Amelogenin als aktiven Bestandteil der SMP hin, und nach den aufgeführten Resultaten erscheinen Konzentration und Beschaffenheit der Amelogenin-Proteine entscheidend die regenerativen Wirkungen determinieren zu können. Andere Bestandteile der SMP zeigten in der Regel deutlich weniger Wirkungen.

Das Parodont setzt sich sowohl aus Hart- als auch Weichgeweben zusammen und diese Anteile stehen in einer präzisen räumlichen Anordnung zueinander. So ist es beispielsweise eine Voraussetzung für Regeneration, dass Sharpey'sche Fasern im neu geformten Zement, aber auch im neuen Knochen verankert sind [264]. Jedes parodontale Gewebe wird durch Zellen erst synthetisiert, wenn nach spezifischer Stimulierung Proliferation und in einer genauen Abfolge Zelldifferenzierung stattgefunden hat, so dass die zellulären Produkte mit benachbarten Geweben und Mediatoren reagieren können [136, 151, 174]. Extrazelluläre Matrixproteine spielen eine bedeutende Rolle als Signalmoleküle zur Regulation dieser Prozesse. Es ist bekannt, dass die ECM entscheidend ist für die Proliferation bzw. Differenzierung von Zellen und damit Zellwachstum sowie Zellfunktionen beeinflussen [44, 110]. Für Amelogenin bzw. Splicing-Produkte des Amelogenin-Gens existieren vermehrt Hinweise, dass sie als Signalmoleküle wirken und die Signaltransduktion dentaler Zellen, insbesondere Zementoblasten, regulieren [288, 290]. Es sind zurzeit aber viele Aspekte der Stimulierung parodontaler Ligamentzellen noch ungeklärt.

Wie oben erwähnt, wurde die parodontale Regeneration durch humanes rekombinantes Amelogenin stimuliert. Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren für Knochenzellen, wie z.B. Bone Morphogenetic Proteins, konnten in Studien Knochenwachstum fördern, jedoch wurden oftmals Ankylosen und Wurzelresorptionen beobachtet [247]. Eine Erklärung liegt in den unterschiedlichen zellulären Effekten von SMP gegenüber Wachstumsfaktoren, die sich typischerweise durch eine singuläre Wirkung auszeichnen. So stimulieren Wachstumsfaktoren, beispielsweise PDGF, hauptsächlich Zellwachstum (Proliferation), während andere Faktoren Zellreifung (Differenzierung) initiieren, wie die BMPs [302, 306]. Für SMP dagegen ist gezeigt worden, dass sie sowohl

Proliferation als auch Differenzierung fördern [236]. Sie haben stimulierende Effekte auf Hart- und Weichgewebezellen, insbesondere Knochen- und parodontale Ligamentzellen [57, 96, 111, 116]. Da parodontale Regeneration Knochen, Zement und Ligament umfasst, erscheint diese Eigenschaft besonders relevant und unterscheidet die SMP von Wachstumsfaktoren. Zusätzlich spielen SMP bei der Zelladhäsion, einem wichtigen Faktor für Regeneration, eine bedeutende Rolle. In einer neueren Studie ist nachgewiesen worden, dass Amelogenin wie auch die gesamten SMP das Zellattachment von Knochen- und PDL-Zellen signifikant steigern konnten [117]. Daher besitzen die SMP nachgewiesenermaßen Eigenschaften, die sie von anderen Wachstumsfaktoren unterscheiden, d.h. sie haben multiple Effekte auf Hart- und Weichgewebezellen. Dies erklärt zu einem Teil die gesteigerte parodontale Regeneration mit SMP [77, 113, 239, 249]. Die Effekte der SMP wurden auch in einem experimentellen Modell zur Zahntransplantation nachgewiesen, bei dem sich vermehrte regenerative Einheilung und weniger Resorptionen zeigten sowie in der regenerativen Heilung von Dentinwunden bei der direkten Überkappung [104, 126, 184]. Zusammenfassend zeigen die heute vorliegenden klinischen Studien zu SMP bei infraalveolären Defekten verbessertes klinisches Attachment und reduzierte Sondierungstiefen gegenüber konventioneller Lappenoperation, wobei die Wirkung auf die Langzeitstabilität bislang nicht ausreichend untersucht wurde [86, 316].

Mehrere histologische Befunde waren in den Amelogenin behandelten Defekten in unserer Studie bemerkenswert. Der neue Zement extendierte teilweise koronal über die angebrachte Rille, so dass vermutet werden kann, dass die Zementneubildung dort stattfindet, wo eine Schicht SMP aufgebracht wurde. Da dies nicht im gleichen Ausmaß in den Kontrolldefekten gefunden wurde, erscheint die Assoziation zwischen Amelogenin und Zementneubildung auf einer ehemals Plaque exponierten Wurzeloberfläche gegeben. Weiterhin hatte das parodontale Ligament die gleichen Dimensionen wie das physiologische Ligament, auch in Bereichen mit signifikanter Knochenneubildung in den Defekten. Außerdem zeigte sich eine schräge Orientierung der Fasern, d.h. auch hier eine identische Struktur zur physiologischen Faserorientierung. Die Mechanismen, die die Breite des Zements und parodontalen Ligaments determinieren, sind noch weitgehend ungeklärt. Neben zellulären Mediatoren und genetischer Kontrolle wird

insbesondere auch ein mechanischer Einfluss durch physiologische Kräfte nach Belastung vermutet [140, 294, 310]. Im vorliegenden Tiermodell wurde daher auf eine physiologische Belastung Wert gelegt und keine Zähne aus experimentellen Gründen extrahiert oder okklusal eingeschliffen, wie teilweise in anderen Studien beschrieben wurde [8, 300, 304].

Demgegenüber fanden sich bei Kontrollen und bei Behandlung mit Cx-Protein Areale, die eine bindegewebige Regeneration mit orientierten Fasern zeigten, jedoch keine Zementneubildung, so dass nicht von parodontaler Regeneration gesprochen werden kann. Da dieser Heilungstyp bei Stimulierung mit Amelogenin nicht beobachtet wurde, scheint dies zusätzlich die Rolle des Amelogenins für die Zementbildung und parodontale Regeneration zu unterstreichen. Ein weiterer Aspekt der Regeneration ist das Ausmaß an knöcherner Defektfüllung. Die Administration von Amelogenin resultierte in einer bedeutenden Knochenneubildung, nicht nur in der Höhe, sondern vor allem auch in der Fläche. Diese histologischen und histometrischen Daten konnten im Wesentlichen durch die elektronenmikroskopischen Darstellungen bestätigt und ergänzt werden. Auch ultrastrukturell zeigte sich acht Wochen nach chirurgischer Behandlung mit rekombinantem Amelogenin in vielen Schnitten ein regenerativer Heilungstyp mit gerichteten Kollagenfasern, die in einen neu gebildeten, mineralisierten Zement inserierten. Mineralisationsareale, die meist mit Kollagenfasern assoziiert waren, ließen sich regelmäßig darstellen. Oftmals präsentierte sich ein dynamisches Bild mit aktiven Umbauvorgängen, so dass die Gewebereifung und Ausbildung eines gerichteten Faserapparates nach acht Wochen noch nicht abgeschlossen erschien. Die Neubildung von Zement mit unterschiedlichen Faseranteilen konnte auch in einer mikromorphologischen Studie an vier Patienten zur Heilung nach GTR mit Membranen nachgewiesen werden [159]. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie wurden parallele, aber auch senkrecht zur Wurzeloberfläche stehende Fasern beobachtet. Zwischen der vorhandenen Wurzeloberfläche und dem neu gebildeten Zement, überwiegend vom zellulären Typ, befand sich regelmäßig eine elektronendichte Schicht, wobei sich keine einstrahlenden Kollagenfasern zwischen beiden Hartgeweben darstellten. Damit zeigte sich gegenüber der physiologischen Situation ein veränderter Verbund nach Behandlung mit der Membrantechnik. Trotz der Einschränkung, dass die Wurzeloberflächen nicht konditioniert wurden, könnte dieser Befund die

verminderte Festigkeit erklären, die sich als Spaltbildung bei histologischen Schnitten infolge der Gewebepreparation häufig darstellt und auch in der vorliegenden Studie beobachtet wurde [34, 219, 246]. Hier besteht, zumindest bei einer nicht konditionierten Wurzeloberfläche, ein struktureller Unterschied zur physiologischen Wurzelbildung, wenn sich Kollagenfibrillen vor Mineralisierung mit dem nicht-mineralisierten Kollagennetzwerk des Prädentins verbinden [23]. Ob die nach GTR-Behandlung veränderte Verbindung klinisch eine Rolle spielt, wurde jedoch oftmals bezweifelt [66, 155, 238]. Untersuchungen zu SMP mit elektronenmikroskopischen Darstellungen liegen bisher nur wenige vor. Ultrastrukturell konnten bei Implantaten erhöhte Knochenbildung und verbesserte Implantateinheilung bei Emdogain<sup>®</sup>-Anwendung gezeigt werden, die aber von der Art der knöchernen Umgebung abhängig waren [229, 245]. Das vermehrte Attachment und die Proliferation von parodontalen Fibroblasten auf Wurzeloberflächen nach Emdogain<sup>®</sup>-Behandlung konnten ebenfalls elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [56].

Die vorliegenden Daten aus den zellbiologischen und klinischen Untersuchungen lassen vermuten, dass Amelogenin vor allem in der frühen Heilungsphase als Signalmolekül in der Selektion und Stimulierung der für die Regeneration relevanten Zellen eine bedeutende Rolle spielt. Diese Funktionen als Signalmolekül wurden bereits in einigen aktuellen Studien für Amelogenine nachgewiesen [117, 288, 290]. In unserer Studie konnte nach Behandlung mit Amelogeninen die vermehrte Bildung mineralisierten Gewebes *in vivo* gezeigt werden, während die Mineralisationsparameter nach längeren Kultivierungszeiten in Organoidkulturen keine deutlichen Stimulierungen aufwiesen. Trotz aller grundsätzlichen Unterschiede zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen liegt daher die Vermutung nahe, dass *in vivo* Signalwege aktiviert wurden, die zu der Erhöhung des Regenerationspotentials geführt haben. Die gemessenen positiven Effekte nach Amelogenin-Behandlungen zu frühen Zeitpunkten in Monolayerkulturen stützen zudem diese Annahmen. Es wäre somit denkbar, dass die PDL-Zellen höherer Passagen, wie in Organoidkulturen verwendet, für diese Aktivierungen nicht optimal erreichbar sind. Weiterführende Studien zur Rolle der Amelogenine in der parodontalen Wundheilung sollten daher besonders die Effekte als Signalmolekül in den Fokus stellen.

Zusammenfassend stimulierte die Anwendung von rekombinantem humanen Amelogenin im Vergleich zu Kontrollen die histologische Neubildung parodontaler Gewebe in Defekten, die Plaque exponiert waren. Obwohl keine Membranen oder volumetrische Defektfüller verwendet wurden, zeigte sich ein bedeutendes Ausmaß neuen Gewebes nicht nur innerhalb, sondern auch koronal von Rillen, die an den Defektbasen angebracht wurden. In den behandelten Defekten waren die Dimensionen des neu gebildeten parodontalen Ligaments identisch zum physiologischen Ligament. Auch die Breite des neu geformten Zements auf der Wurzeloberfläche war identisch zum physiologischen Zement. Daher kann gefolgert werden, dass rekombinantes humanes Amelogenin als singuläres Protein die parodontale Regeneration auf einer vormals Plaque infizierten Wurzeloberfläche stimulieren kann.