

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

**„Kombination von Platelet Rich Fibrin und Knochenersatzmaterialien –
mögliche Implikationen für eine optimierte ossäre Regeneration“**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dr. med. dent. Sebastian Blatt
aus Speyer

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion: 07.12.2021

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	IV
1. Einleitung/Ziel der Dissertation.....	1
1.1. Einleitung.....	1
1.2. Ziel der Dissertation.....	2
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1. Knochenaugmentation und Knochenersatzmaterial.....	3
2.2. Osteogenese und Angiogenese.....	4
2.3. Prävascularisierung von Biomaterialien.....	5
2.4. Autologe Thrombozytenkonzentrate.....	6
2.4.1. 1. Generation autologer Thrombozytenkonzentrate.....	6
2.4.2. 2. Generation autologer Thrombozytenkonzentrate.....	7
2.4.3. Aktuelle klinische Anwendungsgebiete.....	8
3. Material und Methoden.....	10
3.1. Materialien.....	10
3.1.1. Technische Geräte.....	10
3.1.2. Knochenersatzmaterialien.....	10
3.2. Methoden.....	14
3.2.1. <i>In Vitro</i> Versuche.....	14
3.2.1.1. PRF Herstellung.....	14
3.2.1.2. Knochenersatzmaterialien.....	14
3.2.1.3. Initiale Interaktion PRF/KEM: Zellzahl und Wachstumsfaktorexpression.....	14
3.2.1.4. Co-Kultur PRF/Osteoblasten und Analyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern.....	15
3.2.1.5. Analyse der Zellvitalität, -proliferation und Migration.....	16
3.2.1.6. Rasterelektronenmikroskopie.....	17
3.2.2. <i>In vivo</i> Versuche.....	18
3.2.3. Statistische Auswertung.....	21
4. Ergebnisse.....	22
4.1. Initiale Interaktion PRF/KEM und Analyse der Wachstumsfaktorexpression.....	22
4.2. Einfluss von PRF auf Osteoblasten und Analyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern.....	26
4.3. Quantifizierung der Angiogenese <i>in vivo</i>	37
5. Diskussion.....	42
5.1. Zell-Zell-Interaktion der PRF mit KEM <i>in vitro</i>	42
5.2. Einfluss der PRF auf humane Osteoblasten <i>in vitro</i>	45
5.3. Pro-angiogener Effekt der PRF in Kombination mit KEM <i>in vivo</i>	48
5.3. Implikationen für klinische Translation und zukünftige Tissue Engineering-Ansätze.....	51
6. Zusammenfassung.....	53

7. Quellen	55
7. Danksagung	63
8. Lebenslauf	64

Abkürzungsverzeichnis

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid	MTT assay
Actin Alpha 1	<i>ACTA1</i>
Alkaline Phosphatase	AP
alpha-smooth muscle actin	aSMA
BioOss®, Geistlich, Schweiz	XKM2
bone morphogenetic protein (2)	BMP(-2)
Collagen	COL
Collagen Type 1 Alpha 1 Chain	<i>COL1A1</i>
cerabone®, botiss biomaterials, Deutschland	XKM1
chorioallantoic membrane	CAM
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM
Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay	ELISA
Fätales Kälberserum	FCS
Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
Humane Osteoblasten	HOB
Knochenersatzmaterialien	KEM
maxgraft®, botiss biomaterials, Deutschland	AKM
maxresob®, botiss biomaterials, Deutschland	APKM
Osteocalcin/ Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein	OCN
Platelet Derived Growth Factor	PDGF
Platelet Rich Fibrin	PRF
Platelet Rich Plasma	PRP
Preparation Rich in Growth Factor	PRGF
Pure- Platelet Rich Plasma	P-PRP
real-time quantitative PCR	qRT-PCR
Runt-related Transcription Factor -2	RUNX-2
Tissue Growth Factor β	TGF- β
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das gewonnene PRF nach einmaligen Zentrifugationsprozess ohne Zugabe einer Antikoagulanz (mod. nach Dohan Ehrenfest et al. [43]).....	8
Abbildung 2 Exemplarische Darstellung des inkubierten KEM im Rahmen des CAM-Assay (30 x Vergrößerung). In rot markiert die zur Gefäß-/Verzweigungspunktbestimmung gewählten sechs definierten ROI pro mm ² um den Ring [13].	19
Abbildung 3 Exemplarische immunhistochemische Schnittbilder nach Inkubation von allogenen KEM mit PRF für 24 h im CAM-Assay. (A) HE Färbung, (B) aSMA-Färbung. Die Pfeile markieren jeweils beispielhaft Gefäßstrukturen [13].	20
Abbildung 4 Mittlere Thrombozytenzahl x 10 ³ /µl ± Standardabweichung nach 15-minütiger Inkubation der jeweiligen Proben mit PRF sowie für Vollblut (Ctrl.) im Vergleich zum alleinigen PRF. Hier signifikant verminderte Anzahl für APKM (*p=0.05)	23
Abbildung 5 Expression von VEGF, TGF-β und PDGF der jeweiligen Proben im Vergleich zum alleinigen PRF. PDGF zeigte sich hier für alle untersuchten Materialien statistisch signifikant erniedrigt (* p<0.05) [13].	25
Abbildung 6 Rasterelektronenmikroskopie für allogene (A), alloplastische (B) und xenogene Materialien ((C), XKM1, (D) XKM2), jeweils in Kombination mit PRF. Die KEM-Oberfläche (*) zeigt sich von einer dünnen PRF-Schicht bedeckt (weiße Pfeile), die wiederum aus eng liegenden Fibrinfilamenten gebildet wird (rote Pfeile) [13].	26
Abbildung 7 Mittlere Gen-Expression von A: ALPL, BMP2 und COL1A1 und B: OCN und RUNX-2 nach Co-Inkubation der entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF mit HOB für 24h im Vergleich zu nativer Probe und alleinige HOB(* p<0.05, ALPL: APKM vs. APKM+: p=0.050, COL1A1:AKM vs. HOB p=0.050, XKM2 vs. XKM2+: p=0.050, RUNX2: AKM vs. HOB: p=0.050, APKM vs. HOB: p=0.050) [12].	29
Abbildung 8 Mittlere Protein-Expression von A: AP und COL, sowie B: OCN und BMP nach Co-Inkubation der entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF mit HOB für 24h im Vergleich zu nativer Probe und alleinige HOB (* p<0.05, ALPL: APKM vs. APKM+: p=0.050, COL1A1:AKM vs. HOB p=0.050, XKM2 vs. XKM2+: p=0.050, RUNX2: AKM vs. HOB: p=0.050, APKM vs. HOB: p=0.050) [12].	32
Abbildung 9 MTT assay zum Vitalitätsnachweis über eine Absorption im Bereich von 570nm der HOBs nach Co-Inkubation mit der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF (* p<0.05 Mann-Whitney-U test vs. HOB, XKM1: p=0.016, XKM1+: p=0.008, XKM2+: p=0.032) [12]. .	33
Abbildung 10 Exemplarische Darstellung von allogenen KEM A: nativ und B: in Kombination mit PRF im Cell Tracker Red Assay zur Analyse des Proliferationspotentials (10x Vergrößerung) [12].	34

Abbildung 11 Mittlere Prozentzahl der durch Zellen bedeckten Fläche nach Cell Tracker Red Proliferations-assay für die entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF (jeweils $p > 0.05$ im Vergleich zu alleiniger HOB und native KEM) [12]..... 35

Abbildung 12 Exemplarische Darstellung von allogenen KEM A: nativ und B: in Kombination mit PRF im Scratch-Test-Assay zur Analyse des Migrationspotentials (10x Vergrößerung) [12].
..... 36

Abbildung 13 Mittlere Prozentzahl der durch Zellen bedeckten Fläche des Spaltes nach Migrations-assay für die entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF (jeweils $p > 0.05$ im Vergleich zu alleiniger HOB und native KEM) [12]..... 36

Abbildung 14(A) Mittlere Gefäßanzahl \pm Standardabweichung pro mm^2 und (B) Mittlere Anzahl Verzweigungspunkte \pm Standardabweichung pro mm^2 nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. (* < 0.05) [13]. 39

Abbildung 15 Mittlere Gefäßanzahl \pm Standardabweichung pro mm^2 nach A: HE und B: aSMA Färbung nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. (* $p < 0.05$) [13]..... 41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 KEM unterschiedlichen Ursprungs und ihre klinischen Eigenschaften, mod. nach Bhatt et al. [4]	4
Tabelle 2 Mittlere Thrombozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$ \pm Standardabweichung nach 15-minütiger Inkubation der jeweiligen Proben mit PRF sowie für Vollblut. P-Werte im Vergleich zum alleinigen PRF (Mann-Whitney-U-test) [13].	22
Tabelle 3 Mittlere Protein-Expression in pg/ml nach ELISA-Quantifizierung für A: VEGF, B: TGF- β und C: PDGF \pm Standardabweichung. P-Werte im Vergleich der jeweiligen Probe zur alleinigen PRF (Mann-Whitney-U-test) [13]	24
Tabelle 4 Mittlere Gen-Expression nach PCR-Analyse für A: ALPL, B: BMP2, C: COL1A1, D:OCN und E: RUNX-2 \pm Standardabweichung. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].	28
Tabelle 5 Mittlere Protein-Expression (pg/ml) nach ELISA Quantifizierung für A: AP, B: COL, C: OCN und D: BMP \pm Standardabweichung. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].	31
Tabelle 6 Mittlere Absorption bei 570nm im MTT Assay nach 24h Co-Inkubation der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF und HOBs. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].	33
Tabelle 7 Mittlere Zellzahl im Cell Tracker Proliferations Assay nach 24h Co-Inkubation der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF und HOBs. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].	34
Tabelle 8 Mittlere Anzahl migrierter Zellen im Scratch Assay nach 24h Co-Inkubation der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF und HOBs. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].	35
Tabelle 9 Lichtbildmikroskopisch erfasste (A) Mittlere Gefäßanzahl \pm Standardabweichung pro mm^2 und (B) Mittlere Anzahl Verzweigungspunkte \pm Standardabweichung pro mm^2 nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. P-Werte im Vergleich der jeweiligen Probe zur negativen Kontrolle und alleiniger PRF (Mann-Whitney-U-test) [13]	38
Tabelle 10 Mittlere Gefäßanzahl \pm Standardabweichung pro mm^2 nach (A) HE und (B) aSMA Färbung nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. P-Werte im Vergleich der jeweiligen Probe zur negativen Kontrolle und alleiniger PRF (Mann-Whitney-U-test) [13].	40

1. Einleitung/Ziel der Dissertation

1.1. Einleitung

Die Regeneration kombinierter hart- und weichgeweblicher Defekte stellt eine häufige klinische Herausforderung in der regenerativen Chirurgie dar [1]. Neben dem Goldstandard des autologen Gewebetransfers kommen, insbesondere bei schwerer Co-Morbidität der Patientinnen und Patienten, Ersatzmaterialien unterschiedlichen Ursprungs breitflächig zum Einsatz [2]. Eine initiale suffiziente Gefäßversorgung/-anschluss des eingebrachten autologen Gewebes/Fremdmaterials scheint hier für die gewünschte Einheilung und Regeneration unabdingbar [3]. Diese kann durch den Einsatz von Knochenersatzmaterialien unabhängig ihres Ursprungs nur unzureichend erreicht werden, was den Einsatz der Materialien in der klinischen Indikation oftmals beschränkt [4]. Eine Prävaskularisierung dieser Materialien könnte diese Limitation überwinden, das regenerative Potential steigern und somit die klinische Indikationsstellung erweitern [3].

Autologe Thrombozytenkonzentrate und insbesondere ihre 2. Generation wie die Platelet Rich Fibrin (PRF) werden vielfältig in der regenerativen Chirurgie angewendet, vor allem um klinisch eine verbesserte weichgewebliche Regeneration erreichen zu können [5]. Aufgrund ihres pro-angiogenen Potentials könnten sie für eine Prävaskularisierung verschiedener Biomaterialien nutzbar gemacht werden [6]. Dabei existiert, trotz einiger klinischer Anwendungsbeispiele, bisher unzureichende Evidenz, ob und in welchem Ausmaß die PRF eine mögliche Interaktion mit Knochenersatzmaterialien verschiedenen Ursprungs zeigt und ob dies die ossäre Regeneration zu steigern vermag [7-9]. Der Einfluss der PRF auf zellulärer Ebene auf humane Osteoblasten und den daraus resultierenden möglichen Implikationen für eine optimierte ossäre Regeneration ist ebenfalls Gegenstand aktueller Diskussionen und eine mögliche Interaktion ist bis dato nicht ausreichend untersucht [10]. Insbesondere die frühe Interaktion scheint hier von herausragender Bedeutung, die initial eine stabile Osteointegration des prävaskularisierten Implantates bedingen kann und eine subsequente Einheilung erreichen lässt [11].

1.2. Ziel der Dissertation

Aus diesen eingehenden Überlegungen lassen sich die Ziele dieser Arbeit ableiten. Es wurde zunächst *in vitro* eine mögliche initiale gegenseitige Beeinflussung der PRF mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien unterschiedlicher Herkunft auf Zellebene vergleichend analysiert. Die physikalisch-räumlichen Aspekte wurden dargestellt und anschließend Unterschiede in der Wachstumsfaktorexpression untersucht. Folgend wurde der Einfluss der PRF auf Vitalität, Migrations-, Proliferations- und Differenzierungspotential von humanen Osteoblasten überprüft [12]. Anschließend wurde der „chorioallantoic membrane assay“ (CAM) verwendet, um *in vivo* den Einfluss der PRF-Kombination auf die Gefäßentstehung quantifizieren zu können [13].

Als übergeordnetes Ziel soll mit dieser Arbeit weitere wissenschaftliche Evidenz für die klinische Anwendung von PRF zur Prävasikularisierung von Knochenersatzmaterialien geschaffen werden, um die klinischen Indikationsstellungen erweitern und weiterführend die ossäre Regeneration optimieren zu können.

2. Literaturdiskussion

2.1. Knochenaugmentation und Knochenersatzmaterial

Die autologe (körpereigene) Knochenaugmentation bei ossärem Gewebsdefizit nach Trauma, aus onkologischer Notwendigkeit oder infektiöser Genese gilt als Goldstandard in der regenerativen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie [2]. Entscheidender Nachteil ist die erhöhte Entnahmemorbidität und das limitierte Angebot autologer Knochenlager, weshalb allogene (von einem anderen Individuum derselben Art stammend), xenogene (aus einer anderen Art stammend) und alloplastische (aus körperfremden, künstlichen Materialien stammend) Knochenersatzmaterialien (KEM) eine klinisch etablierte Ersatzmethode bei spezifischen Indikationsstellungen darstellen [14, 15].

Heute existieren mehr als 200 KEM unterschiedlichen Ursprungs mit klinischer Zulassung [16]. Sie zeigen je nach Herkunft divergentes regeneratives Potential und klinische Aspekte mit damit einhergehenden Vor- und Nachteilen (Tabelle 1) und sollten daher immer in einer individuellen Entscheidung und in Abhängigkeit der lokalen Defektsituation verwendet werden [4]. All diesen Materialien ist jedoch ein funktioneller Mangel zugleich: zeigt der autologe Knochen osteoinduktive und pro-osteogenetische Eigenschaften und regt somit die Knochenneubildung *de novo* an, vermögen die KEM allenfalls eine osteokonduktive Wirkung auszuüben und somit als Leitgerüst das natürliche Knochenwachstum zu erleichtern ohne es *de novo* bilden zu können [17]. Einzig bei allogenen KEM wird, gegenüber den anderen Ersatzmaterialien, ein mögliches osteoinduktives Potential (wahrscheinlich durch den Einfluss der „bone morphogenetic proteins“, BMP), diskutiert [18]. Andererseits muss durch das strenge Prozessieren insbesondere bei dieser Klasse der KEM darauf geachtet werden, Fremdproteine und andere mögliche immunologische Beeinflussungen aus dem Spenderknochen zu eliminieren, um die Gefahr einer immunologischen Abstoßungsreaktion zu minimieren. Dies schmälert im Umkehrschluss das mögliche osteoinduktive Potential [19]. Eine weitere wichtige Säule beim erfolgreichen Einsatz von KEM liegt in der initialen Osteointegration, der Implementierung des Fremdmaterials in den eigentlichen Defekt um Entzündungsreaktionen und pathologische Heilungsprozesse wie die Pseudarthrose zu vermeiden. Insbesondere bei den alloplastischen und xenogenen KEM kann das osteointegrative Potential stark variieren und ist gegenüber der Implantation von Eigenknochen stets als geringer zu erachten [4].

KEM	Osteo- konduktion	Osteo- induktion	Osteo- genese	Osteo- integration	Nachteile	Klinische Einsatzmöglichkeiten
Autolog	+++	+++	+++	+++	Limitierte Verfügbarkeit „donor site morbidity“	Knochendefekt, verzögerte/pathologische Frakturheilung, Arthroplastik
Allogen	+	++	-	++	Risiko der Infektion/ Immunreaktion	Knochendefekt, verzögerte/pathologische Frakturheilung, Arthroplastik
Alloplastisch	+	-	-	++	Keine Osteoinduktion	Füllmaterial/Ergänzung bei Knochendefekten
Xenogen	+	-	-	+	Keine Osteoinduktion	Füllmaterial/Ergänzung bei Knochendefekten

Tabelle 1 KEM unterschiedlichen Ursprungs und ihre klinischen Eigenschaften, mod. nach Bhatt *et al.* [4]

2.2. Osteogenese und Angiogenese

Jährlich werden weltweit ca. 4 Mio. Operationen mit Spenderknochen und Knochenersatzmaterialien durchgeführt, um knöcherne Gewebsdefizite nach Trauma, Infektion oder im Rahmen einer Tumorerkrankung zu therapieren [1]. Eine suffiziente Gefäßversorgung ist hier eine unabdingbare Voraussetzung zur physiologischen Gewebsproliferation und -regeneration. Prinzipiell unterscheidet man zwei Formen der Gefäßneubildung. Zum einen die Vaskulogenese, die Gefäßbildung *de novo* aus zirkulierenden Vorläuferzellen. Sie findet zwar primär pränatal statt, kann aber unter spezifischen patho-physiologischen Umständen, beispielsweise in sauerstoffarmen Arealen wie im Zentrum solider Tumoren, auch einen relevanten postnatalen Mechanismus der Gefäßneubildung darstellen [20]. Als Angiogenese beschreibt man im Gegensatz dazu die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden kapillaren Strukturen. Hier kann wiederum zwischen Aussprossung („sprouting“) und der Gefäßteilung (der sogenannten Intussuszeption) unterschieden werden [21].

In Analogie zur weichgeweblichen Heilung scheint der Gefäßneubildung aus bestehenden Lumina, der Angiogenese, eine Schlüsselrolle der knöchernen Regeneration zu zukommen [3]. Dabei ist die Zelldistribution auf eine Distanz von ca. 200 µm zur versorgenden Kapillare beschränkt, der Entfernung, die Sauerstoff und andere Nährstoffe per Diffusion maximal bewältigen können [22]. Neuere Studien sehen daher eine enge Korrelation zwischen Gefäß-

und Knochenneubildung (Osteogenese), wahrscheinlich vermittelt durch einen spezifischen (knöchernen) Gefäßsubtyp [23]. Die subsequente Knochenneubildung kann dabei als hochkomplexer biologischer Prozess angesehen werden, bei dem es zum Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen sowie intra- und extrazellulärer Signalwege kommt [24]. Auf welche genaue Weise die Gefäßinvasion bei der Osteogenese erfolgt und welche molekularen Signalwege diese Vorgänge koppeln, ist Gegenstand aktueller Forschung. Neuere bildgebende und immun-histochemische Verfahren verhelfen zu der Hypothese, die eine spezielle, organ-spezifischen Form der Angiogenese annimmt. Sogenannte „Type H-Gefäße“ durchziehen den Knochen bögen- und säulenförmig und können daher als äquivalent zu den „endothelial sprouts“ (Vorläufergefäße aus denen die Angiogenese hervorgeht) angesehen werden [25].

Eine Schlüsselrolle scheinen bei den komplexen Prozessen pro-angiogene Wachstumsfaktoren wie der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Tissue Growth Factor β (TGF- β) einzunehmen, die als vasoformative auslösende Faktoren diskutiert werden [26]. VEGF regt hierbei als Schlüsselmolekül die Proliferation und Migration der Endothelzellen an und sorgt u.a. für eine erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäßendothelien, wodurch Plasmaproteine austreten und Leitstrukturen für die auswandernden Endothelzellen bilden, welche wiederum die Aussprossung und damit die Angiogenese vorantreiben [27]. PDGF ist von herausragender Bedeutung für die Reifung der ausgesprossenen Gefäße, durch die Rekrutierung und Steuerung von Periozyten oder glatten Muskelzellen [28]. TGF- β erhöht neben weiteren wichtigen Signalwegen als positive Rückkopplung die Freisetzung von VEGF aus Endothelzellen, so dass beide Faktoren von gefäßproliferierenden Geweben wie beispielsweise soliden Tumoren daher häufig stark co-exprimiert werden [29].

2.3. Prävaskularisierung von Biomaterialien

Das translationale „tissue-“ oder „bone engineering“ sucht nun nach Verfahren und Lösungen, um die o.g. funktionellen Mängel der KEM und anderer Biomaterialien zu überwinden und durch eine biologische Funktionalisierung die weichgewebliche und knöchernen Wundheilung zu optimieren [18, 30]. Die (prä)Vaskularisierung von Spenderknochen und/oder KEM stellt im Hinblick auf die oben ausgeführten Zusammenhänge zwischen Angio- und Osteogenese einen Kernaspekt im Rahmen des „bone engineering“ zur Regeneration von Defektsituationen in der Kopf-Hals-Region dar [3]. Es können daher an ein modernes, biokompatibles „Scaffold“ (Trägermaterial, welches nach Funktionalisierung zur Regeneration

verwendet wird) zum ossären Gewebersatz verschiedene Anforderungen gestellt werden: hierzu zählt u.a. die Schaffung struktureller Eigenschaften für eine Gefäßinvasion und einer Mikrozirkulation, die den Zufluss von Seiten des Empfängerbettes unterstützt und die Durchblutung langfristig ermöglichen kann [22].

Verschiedene Methoden wurden in diesem Zusammenhang genutzt, um die Vaskularisierung zu erhöhen, insbesondere durch Einsatz von Stammzelltherapie und oft in Kombination mit neuartigen 3D Druck-Verfahren [31]. Die Implementierung dieser Verfahren in die klinischen Arbeitsabläufe scheitert bis dato jedoch nicht zuletzt an komplexen Zulassungsverfahren und -bedingungen. Als eine „klinische Alternative“ könnten autologe Thrombozytenkonzentrate dienen, die routinemäßig in vielfältigen Bereichen der regenerativen Medizin zum Einsatz kommen, die Gefäßversorgung steigern und so zur biologischen Funktionalisierung von Biomaterialien wie KEM oder Kollagenmembranen nutzbar gemacht werden könnten [5].

2.4. Autologe Thrombozytenkonzentrate

Erstmals wurde 1940 die Anwendung autologer Thrombozytenkonzentrate beschrieben, hier zur Rekonstruktion peripherer Nerven [5]. Daraus entwickelte sich bereits in den frühen 1970er und '80er Jahren das Konzept des Fibrinklebers, ein Blutkoagel aus Fibrinogen und Thrombin, welches zur Defektdeckung zunächst in Tierexperimenten und später in der klinischen Applikation genutzt wurde [32]. Heute wird Fibrin, aus autologen Plasma extrahiert, als ein vielfältig nutzbares Scaffold in der regenerativen Medizin angesehen, dessen hohe Biokompatibilität eine hervorragende Nische für Stamm- oder Vorläuferzellen darstellt und zur Regeneration mannigfaltiger Organsysteme wie Knochen, Knorpel, Herz-, Leber-, Muskel-, Sehnen oder Nervengewebe genutzt werden könnte [33]. Die Addition der Thrombozyten in dieses Konzept erfolgte erst später [34]; aufbauend auf Arbeiten von Knighton *et al.*, die erstmals das Konzept zur Wundheilung von kutanen Ulcera mittels Wachstumsfaktorapplikation aus autologen Thrombozytenkonzentraten einführten [35], entwickelten verschiedene Arbeitsgruppen weltweit die autologen Plasma- und Thrombozytenkonzentrate konzeptionell weiter, woraus auch die erste Generation der autologen Thrombozytenkonzentrate erwuchs [36].

2.4.1. 1. Generation autologer Thrombozytenkonzentrate

Wichtigster Vertreter dieser Klasse der ersten Generation ist das Platelet Rich Plasma (PRP), welches heute noch erfolgreich in weiten Teilen der regenerativen Medizin Anwendung findet

[37]. PRP kann definiert werden als Volumenanteil des Plasmas im autologen Vollblut, welche eine erhöhte Thrombozytenkonzentration aufweist, wobei diese etwa das 5fache der Konzentration im Spenderblut (Normwerte: 150.000-350.00/ μ l) beinhaltet [36]. Hierbei gilt es jedoch auch interindividuelle Unterschiede des Spender-/Empfängersystems zu berücksichtigen, da sowohl Thrombozytenkonzentration als auch ihre Wachstumsfaktorexpression stark variieren können und sich gegenseitig zu bedingen scheinen [38]. Unterschiedliche PRP-Konzentrationen scheinen bei Anwendung somit einen variablen Effekt auf die Wundheilungsprozesse auszuüben [34]. PRP kann „chairside“ (während oder unmittelbar vor der Behandlung) mittels Tischzentrifugationssystem hergestellt werden: nach venöser Blutentnahme über ein spezifisches Entnahmeset mit Plastiktubes wird das gewonnen Blut mit einer Antikoagulanzen (hauptsächlich Thrombin, Calcium-Chlorid aber auch anderen antikoagulative Substanzen) gerinnbar gemacht und anhand unterschiedlicher Gravitationskräfte bei zweimaliger Zentrifugation in verschiedene Phasen getrennt. Hieraus können die Thrombozyten extrahiert und als PRP-Clot zur optimierten Wundheilung appliziert werden [34]. Eine Sonderform der PRP stellt die Preparation Rich in Growth Factor (PRGF) oder Pure-PRP (P-PRP) dar [39]. Hierbei erfolgt die Herstellung unter Zugabe einer Antikoagulanzen in mehreren Schritten, jedoch in nur einem Zentrifugationsprozess. *In vitro* Analysen zeigen allerdings hier eine verringerte Thrombozytenanzahl und Wachstumsfaktorkonzentrationen [40].

2.4.2. 2. Generation autologer Thrombozytenkonzentrate

Einige Nachteile dieser Methoden werden in der Literatur diskutiert: Zum einen kommt es zum obligaten Einsatz einer Antikoagulanzen, welches das Konzept einer autologen Applikation konterkariert und einen negativen Einfluss auf die Wachstumsfaktorexpression zu haben scheint. Darüber hinaus ist der Zentrifugationsprozess mit zwei Durchgängen aufwendig und bei der Wundheilung beteiligte Zellen wie Leukozyten werden zum Großteil vor der Anwendung exkludiert [5]. Um diese Nachteile zu beheben, wurde die sogenannte „second generation“ der autologen Thrombozytenkonzentrate entwickelt, deren wichtigster Vertreter Platelet Rich Fibrin (PRF) darstellt [41]. PRF zeichnet sich durch einen einmaligen Zentrifugationsprozess aus, der je nach gewünschtem Ergebnis variieren kann. Nach Blutentnahme mittels ebenfalls spezifischen Vakuumtubes kommt es direkt zur Zentrifugation ohne weitere Manipulation, insbesondere ohne Zusatz einer Antikoagulanzen [42]. Je nach gewählter Zentrifugalkraft und Tubesystem (Glas- vs. Plastikbeschichtung) entstehen drei

Phasen: Zur weiteren Anwendung kann so ein fester (Abbildung 1) oder flüssiger PRF-Fibrinclot extrahiert werden.

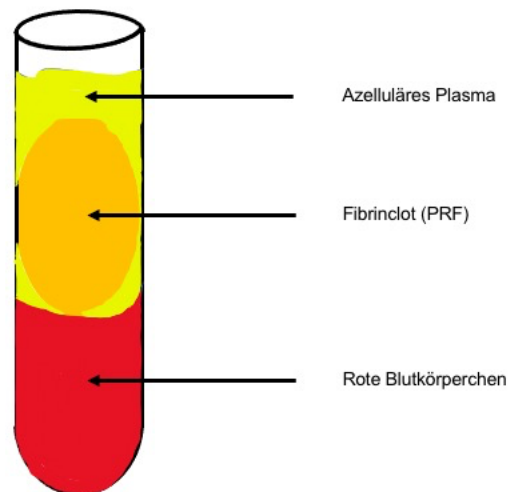


Abbildung 1 Das gewonnene PRF nach einmaligen Zentrifugationsprozess ohne Zugabe einer Antikoagulanz (mod. nach Dohan Ehrenfest *et al.* [43]).

In diesem „Fibrinnetz“ sind verschiedene Zelltypen „gefangen“, wie Thrombozyten und Leukozyten. Durch deren Zusammenspiel wird die Proliferation und Differenzierung von verschiedener Zelllinien vorangetrieben [41]. Fibrin gilt hierbei als natürlicher Angiogeneseinitiator und stellt durch das Anlocken von zirkulierenden Stammzellen den Nährboden für eine epithelial optimierte Wundheilung [44]. Dadurch kommt dem Fibrinnetzwerk eine gesonderte Stellung zu, da es die räumliche Zell-Zell-Interaktion ermöglicht und maßgeblich für die langsame und kontinuierliche Wachstumsfaktorfreisetzung (VEGF, PDGF, TGF β u.a.) aus den alpha-Granula der Thrombozyten verantwortlich ist [45]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass unterschiedliche Zentrifugationsverfahren und -zeiten einen signifikanten Einfluss auf die Wachstumsfaktorexpression zu haben scheinen, weswegen immer mehr die exakte Darstellung und begründete Auswahl unter den diversen Protokollen der Herstellungsmethoden in den Mittelpunkt gestellt wird [46].

2.4.3. Aktuelle klinische Anwendungsgebiete

Im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie hat die PRF heute bereits einen hohen Stellenwert in der klinischen Anwendung. Multiple Studien konnten bis dato einen pro-

angiogenen Effekt insbesondere auf die weichgewebliche Regeneration der PRF darstellen, der mit einer optimierten Wundheilungsrate einhergeht [5]. Auch bei kombiniert weich- und hartgeweblichen Substanzdefekten wird PRF häufig verwendet, so bei implantologischen (Sinuslift, Socket preservation und Ridge augmentation) [47, 48], parodontal-chirurgischen (Rezensionsdeckungen) [49] und onkologischen (Therapie der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose) Fragestellungen [5]. Eine eindeutige Evidenz und wissenschaftlich fundierte präklinische Studien zum möglichen Einfluss der PRF auf die ossäre Regeneration fehlen jedoch in der aktuellen Literaturdiskussion [10]. Zwar zeigen vereinzelte *in vitro* Studien einen positiven Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation und Vitalität von Osteoblasten und Inhibierung der Osteoklastogenese [50]. In einigen *in vivo* Studien konnten dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden [44]. Auch die mögliche Kombination von PRF und KEM wird, trotz klinisch verbreiteter Anwendung weiterhin mit teils kontroversen Ergebnissen diskutiert [7]. Zum Teil konnte hier ein positiver Effekt auf die ossäre Regeneration nachvollzogen werden [8], in anderen Arbeiten, welche diese Kombination verwendeten, war dieser Unterschied nicht signifikant ersichtlich [9]. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien könnte in der Diversität der analysierten KEM und deren spezifischen biophysikalischen Eigenschaften, sowie den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten liegen. Insbesondere die frühe Scaffold/Gewebe-Reaktion scheint hier von herausragender Bedeutung, die initial eine stabile Osteointegration bedingt und eine subsequente Einheilung erreichen lässt [11].

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Technische Geräte

Brutkasten	Janneschitz, Hammelburg,
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Dreieich, Deutschland
Duo Zentrifuge	Mectron, Carasco, Italien
ELISA plate reader	Molecular Devices, San Jose, USA
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka, Japan
Lichtbildmikroskop	KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland
MTT Microplate-Reader Versamax	Molecular Devices, San Jose, CA, USA)
Rasterelektronenmikroskop XL30	Philips, Eindhoven, Niederlande Deutschland
SCD 040 sputter-coater	BAL-TEC AG, Leica Microsystems, Solms, Deutschland
Zellanalysator KX21	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland

3.1.2. Knochenersatzmaterialien

BioOss®, Porengröße 1.0 -2.0 mm	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz
cerabone®, Porengröße 1.0 – 2.0 mm	botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland
maxgraft®, Porengröße <2 mm	botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland,
maxresob®, Porengröße 0.8 – 1.5 mm	botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland

3.1.3. Gene und Gensequenzen

Actin Alpha 1 <i>ACTA1</i> , sense-GGAGCAATGATCTTGATCTT, antisense- CTCCTGGGCATGGAGTCCT	BioRad, Hercules, USA
Alkaline phosphatase <i>ALPL</i> sense-ACTGCAGACATTCTCAAAGC, antisense-GAGTGAGTGAGTGAGCAAGG	BioRad, Hercules, USA
Bone Morphogenic Protein 2 <i>BMP2</i> sense-CCTGAAACAGAGACCCACCC, antisense-TCTGGTCACGGGGAATTTCCG	BioRad, Hercules, USA
Collagen Type 1 Alpha 1 Chain <i>COL1A1</i> sense-AGAACTGGTGCAAG, antisense-GAGTTTACAAGACA	BioRad, Hercules, USA
Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase <i>GAPDH</i> sense-AAAACCTGCCAATTATGAT, antisense-CAGTGAGGGTCTCTCTCTTC	BioRad, Hercules, USA
Osteocalcin <i>OCN</i> sense-GSAAAGGTGCAGCCTTTGGT antisense-GGCTCCCAGCCATTGATACAG	BioRad, Hercules, USA
Runt-verwandte Transkriptionsfaktor 2 <i>RUNX2</i> sense-CCCACGAATGCACTATTCC antisense-GGACATACCGAGGGACAT	BioRad, Hercules, USA

3.1.4. CAM Assay, Zellen, Medium und Zusätze

Dexamethason	Serva Bioproducts, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's medium	Gibco Invitrogen, MA, USA
Fetales Kälberserum	Gibco Invitrogen, MA, USA
Humane Osteoblasten	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
L-glutamin	Gibco Invitrogen, MA, USA
Streptomycin	Gibco Invitrogen, MA, USA
Trypsin	Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Weißer Leghorn Hühnereier, befruchtet

LSL Rhein-Main, Dieburg,
Deutschland

3.1.5. Antikörper

Alkaline Phosphatase

R&D Systems,
Minneapolis, USA

Alpha-smooth muscle actin

Sigma-Aldrich, St. Louis,
USA

Bone Morphogenic Protein 2

R&D Systems,
Minneapolis, USA

Collagen

R&D Systems,
Minneapolis, USA

Hämatoxylin-eosin

Merck, Darmstadt,
Deutschland

Osteocalcin

R&D Systems,
Minneapolis, USA

PDGF

R&D Systems,
Minneapolis, USA

Runt-related Transcription Factor -2

R&D Systems,
Minneapolis, USA

TGF- β

R&D Systems,
Minneapolis, USA

VEGF

R&D Systems,
Minneapolis, USA

3.1.6. Kits und Verbrauchsmaterialien

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid(MTT) Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Deutschland

24 well Platte

Merck, Darmstadt,
Deutschland

5 ml Eppendorfgefäß

Merck, Darmstadt,
Deutschland

Blutentnahmeset/ A-PRF+, iPRF/PRF Box

Mectron, Carasco, Italien

Cell Tracker red assay

Thermo Fisher Scientific,
Darmstadt, Deutschland

Gummiring	Elastics, Dentaureum, Ispringen, Deutschland
iScript cDNA synthesis kit	BioRad, Hercules, USA
Kulturflaschen: 75 cm ² , 250 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten P10, P200, P1000	Gilson, Middelston, USA
Pipettenspitzen Tower Pack D 200, 1000,	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Scratch-assay-Platte	ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany
Streptavidin-HRP, 110 ml	Dako, Hamburg, Deutschland
SYBR Green Supermix	BioRad, Hercules, USA

3.1.7. Software

BZ-II Analyzer	KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland
ImageJ	ACTREC, Navi Mumbai, India
Kontron KS 300	Carl Zeiss Vision, Eching, Deutschland
So ftMax Pro 5.4	Molecular Devices, San Jose, USA
SPSS Version 23	IBM, Ehningen, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. *In Vitro* Versuche

3.2.1.1. PRF Herstellung

Die PRF Herstellung erfolgte nach venöser Blutentnahme von 10 ml von drei freiwilligen Spendern mit dem spezifischen Entnahmeset (für solide PRF-Membran: A-PRF+, Mectron, Carasco, Italien, für flüssiges PRF: iPRF, Mectron, Carasco, Italien) und unmittelbarer Zentrifugation nach Herstellerangaben (1200 rpm, relative Zentrifugalkraft bei 177 g für 8 min bei Raumtemperatur, Duo centrifuge, Mectron, Carasco, Italien) wie vielfach beschrieben [6]. Es lag ein positives Votum durch die hiesige Ethikkommission zur Durchführung der Studie vor (Ärztchammer Rheinland-Pfalz, Ethiknummer: "2019-14705_1"). Die Arbeit wurde im Einklang mit den Prinzipien der „good clinical practice“ und der Deklaration von Helsinki von 1964 oder seine späteren Änderungen durchgeführt. Von jedem Teilnehmer an der Studie wurde ein „informed consent“ eingeholt.

3.2.1.2. Knochenersatzmaterialien

Folgende vier, kommerziell erhältlichen KEM wurden analysiert:

- Allogener Ursprung (AKM: maxgraft®, botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland, Porengröße < 2 mm)
- Alloplastischer Ursprung (APKM: maxresob®, botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland, Porengröße 0.8 – 1.5 mm)
- Xenogener Ursprung (XKM1: cerabone®, botiss biomaterials GmbH, Zossen, Deutschland, Porengröße 1.0 – 2.0 mm, XKM2: BioOss®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz, Porengröße 1.0 -2.0 mm)

3.2.1.3. Initiale Interaktion PRF/KEM: Zellzahl und Wachstumsfaktorexpression

Zunächst wurde dann die initiale Interaktion von KEM und PRF analysiert (Drei Proben jeweils in Triplets, n=54). Hierfür wurden 0,5 ml der flüssigen PRF in ein 5 ml Eppendorfgefäß (Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt und mit 100 mg des entsprechenden KEM für 15 Minuten bei Raumtemperatur mittels Tischrüttler inkubiert, wie in der Literatur bereits mit PRP beschrieben [51]. Eine Probe mit EDTA-Blut und eine reine PRF-Probe stellten sie Kontrollgruppen dar. Nach Inkubation wurden 20 µl der entsprechenden Probe entnommen

und die nicht-aggregierten Thrombozyten mittels Zellanalysator ausgezählt (KX21, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Wachstumsfaktorexpression von VEGF, TGF- β und PDGF (alle Antikörper: R&D Systems, Minneapolis, USA) mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA, fünf Proben in Triplets pro Antikörper, n=60) wie in der Literatur bereits beschrieben [6]. Bei einem definierten Wellenspektrum von 450 nm wurde die Expression mittels „ELISA plate reader“ (Molecular Devices, San Jose, USA) bestimmt und IT-gestützt ausgewertet (SoftMax Pro 5.4, Molecular Devices, San Jose, USA).

3.2.1.4. Co-Kultur PRF/Osteoblasten und Analyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern

Für die Co-Kultur wurde eine humane, kommerziell erhältliche Osteoblastenzelllinie (HOB, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit einem Standard-HOB-Medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco Invitrogen, MA, USA) nach Zusatz von fetalen Kälberserum (FCS, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Dexamethason (100 nmol/l, Serva Bioproducts, Heidelberg, Germany), L-glutamin (Gibco Invitrogen, MA, USA) und Streptomycin (100 mg/ml, Gibco Invitrogen, MA, USA) bei 37°C in einer konstanten, angefeuchteten Atmosphäre bei 95% Raumluft und 5% CO₂ kultiviert. Bei regelmäßigem Mediumwechsel wurden die HOBs bis zu einer Konfluenz von ca. 70% mit 0.25% Trypsin (Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland) passagiert. HOBs nach der 5. Passage wurden mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen/well in eine 24 well Platte übertragen (Merck, Darmstadt, Deutschland). Im Anschluss erfolgte, je nach Gruppenzugehörigkeit, die Zugabe von 100 mg des jeweiligen KEM mit und respektive ohne PRF-Zusatz und die Inkubation bei oben genannten Bedingungen für 24h. Dazu erfolgte die Weiterverarbeitung der PRF zu einer stabilen Membran durch manuelle Kompression mit der „PRF Box“ (Mectron, Carasco, Italy) nach Herstellerangaben, die im Anschluss in 10-20 mm² kleine Stücke prozessiert wurden. 0.3-0.5 ml der flüssigen PRF wurden sodann mit einer standardisierten Menge des jeweiligen KEM (100 mg) vermengt, bis nach Zugabe der festen Membranbestandteile, ein homogenes Konstrukt („sticky bone“) entstand. Die alleinige HOBs dienten als Negativkontrolle.

Die Analyse repräsentativer Marker für Osteoblastenproliferation und –migration erfolgte auf Protein- und Genebene. Hierzu wurden 1,4 ml des Überschusses aus dem jeweiligen Well nach Inkubation zu oben genannten Bedingungen für 24h extrahiert und zunächst mittels ELISA wie bereits beschrieben [4] mit folgenden Antikörpern nach Herstellerangaben

analysiert: Alkaline Phosphatase (AP), Collagen (COL), Bone Morphogenic Protein 2 (BMP), Osteocalcin (OCN) und Runt-related Transcription Factor -2 (RUNX, alle Antikörper: R&D Systems, Minneapolis, USA). Im Anschluss wurde die Proteinexpression mittels ELISA plate reader (Molecular Devices, San Jose, USA) bei einem definierten Wellenspektrum von 450nm wie oben beschrieben ausgewertet und mittels spezifischer Software (SoftMax Pro 5.4, Molecular Devices, San Jose, USA) analysiert (pro Versuchsansatz 5 Wiederholungen in Triplets, n=60).

Der Nachweis von Proliferations- und Differenzierungsmarkern für HOB auf Genebene wurde mittels real-time quantitative PCR (qRT-PCR, CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Germany) unter Verwendung eines SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, USA) durchgeführt, wie vielfach in der Literatur beschrieben [52]. Folgende Gene wurden dabei untersucht: Alkaline phosphatase (*ALPL*), Bone Morphogenic Protein 2 (*BMP2*), Collagen Type 1 Alpha 1 Chain (*COL1A1*), Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein (alias: Osteocalcin, *OCN*) und Runt-verwandte Transkriptionsfaktor 2 (*RUNX2*). Als interne Kontrolle wurden die Housekeeping-Gene Actin Alpha 1 (*ACTA1*) und Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) verwendet (pro Gen 3 Wiederholungen in Triplets, n=36). Zusammengefasst wurde die RNA nach 24h Inkubation der jeweiligen Proben mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert und mittels iScript cDNA synthesis kit (BioRad, Hercules, USA) in cDNA ebenfalls nach Herstellerangaben konvertiert. 11 µl des Cyaninfarbstoffs SYBR, jeweils 1 µl des Matrizen ("antisense") und Nichtmatrizenstranges ("sense") und 5 µl RNA-freies Wasser wurden hinzugegeben und die PCR mittels Thermozykler (1.- 95°C für 3min, 2. - 95°C für 10s (39 Wiederholungen), 3. 58°C für 30s, 4. 72°C für 20 s; 5. – 65 °C für 0,5 sec und 6. 95°C für 5 sec.) durchgeführt. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels $\Delta\Delta CT$ Methode wie vielfach in der Literatur beschrieben [52].

3.2.1.5. Analyse der Zellvitalität, -proliferation und Migration

Zur Analyse der Osteoblastenvitalität wurde der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) assay (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), durchgeführt, wie vielfach in der Literatur beschrieben [53]. Hierfür wurden 200 µL/well von 2 mg/mL MTT zu oben genannten Versuchsaufbau nach 24h Co-Inkubation der jeweiligen Probe hinzugegeben und für 4h bei 37°C inkubiert, bevor das Medium abgesaugt, und mit insgesamt 10ml Lysepuffer gewaschen wurde (pro Versuchsansatz 5 Wiederholungen in Triplets, n=60).

Schließlich wurde mittels eines Microplate-Readers (Versamax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) die Fluoreszenz bei 570 nm bestimmt, welche über die metabolische Aktivität die Vitalität der Osteoblasten widerspiegelt.

Der Fluorescence red assay mittels CellTracker (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, um Zellzahl und demnach Proliferationsrate der Osteoblasten darstellen zu können (pro Versuchsansatz 3 Wiederholungen in Duplets, n=54). Zusammengefasst erfolgte nach dem Absaugen des Kulturmediums aus jedem Well die 30 minütige Inkubation des spezifischen „red dye“ Farbstoffs. Nach erneuten Waschvorgang erfolgte die ebenfalls 30 minütige Inkubation mit serum-freien Medium, bevor mittels Fluoreszenzmikroskopie (BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan) die Zellen dargestellt wurden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Anwendung eines automatischen Schwellenwertes zur Graustufenskalierung, mit dem Zellstrukturen besser abgrenzbar waren, und unter Berechnung des prozentualen Flächenanteils der Zellen an der Gesamtfläche wie in der Literatur beschrieben [54].

Letztlich wurde ein Scratch-Test nach Herstellerangaben mittels einer spezifischen Scratch-assay-Platte durchgeführt (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) [52], um die Migration der Osteoblasten nach 24h Inkubation mit der jeweiligen Probe evaluieren zu können (pro Versuchsansatz 3 Wiederholungen in Duplets, n=54). Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Celltracker Red angefärbt (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop und entsprechender Software (BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan) dargestellt. Zur Quantifizierung wurde die ImageJ software (ACTREC, Navi Mumbai, India) genutzt, die Bilder wurden in 10x facher Vergrößerung durch Verwendung eines automatischen Schwellenwertes zunächst in Graustufen skaliert um die Hintergrundfluoreszenz ausblenden zu können und abschließend der prozentuale Flächenanteil der Zellen an der Gesamtfläche berechnet.

3.2.1.6. Rasterelektronenmikroskopie

Abschließend wurden die Proben für die Visualisierung der physikalisch-räumlichen Beziehung zwischen KEM und PRF (n=4) mittels Rasterelektronenmikroskopie erfasst, wie ebenfalls in der Literatur beschrieben [55]. Hierfür wurden die Proben mit Formalin fixiert, dehydriert, in Mountingmedium überführt und mittels „SCD 040 sputter-coater“ (BAL-TEC AG, Leica Microsystems, Solms, Deutschland) mit Gold bestäubt. Dann erfolgte die Darstellung mittels Rasterelektronenmikroskop (Philips XL30, Eindhoven, Niederlande) und die explorative

Analyse der Bilder mittels spezifischer Software und Analyseprogramm (Kontron KS 300, Carl Zeiss Vision, Eching, Deutschland). Die Rasterelektronenmikroskopie wurde in enger interdisziplinärer Zusammenarbeit mit den Kollegen der funktionellen Anatomie, Universität Mainz, durchgeführt.

3.2.2. In vivo Versuche

3.2.2.1. CAM Assay

Für die Quantifizierung der Angiogenese *in vivo* wurde der CAM-Assay verwendet, wie vielfältig in der Literatur beschrieben [6, 56]. Hierfür wurden befruchtete weiße Leghorn Hühnereier verwendet (LSL Rhein-Main, Dieburg, Deutschland), die bis zum vierten embryologischen Entwicklungstag bei 38°C unter konstanter Luftbefeuchtung in einem speziellen Brutkasten (Janneschitz, Hammelburg, Deutschland) inkubiert wurden. Dann erfolgte die Abnahme von ca. 8-10 ml Eiweiß mit einer sterilen Spritze und die Präparation eines 3 × 3 cm² großen Fensters in die äußere Eierschale unter sterilen Bedingungen. Am Folgetag wurden die entsprechenden KEM mit oder ohne die Kombination von PRF gefasst durch einen kieferorthopädischen Gummiring (Elastics, Dentaurum, Ispringen, Deutschland) auf die CAM übertragen. Als Kontrolle diente die alleinige PRF und die CAM ohne Probe (Jeweilige Probe in Triplets, n=36). Nach 24 h Inkubation der Proben erfolgte die lichtbildmikroskopische Darstellung der Gefäße in 30- und 50-facher Vergrößerung mittels digitalen Mikroskops (KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland). Die festgelegte „Region of Interest“ (ROI) an drei definierten Seiten des Ringes zur Auswertung der Gefäß- und Verzweigungspunkanzahl erfolgte nach digitaler Überlagerung des Bildes mit einem Raster (500 µm große Kästchen) und händischen Auszählen der jeweiligen Gefäße/Verzweigungspunkte in diesen sechs definierten Arealen pro mm² (Abbildung 2). Nach der Analyse erfolgte die Tötung des Embryos durch Durchtrennung der Hauptgefäße.

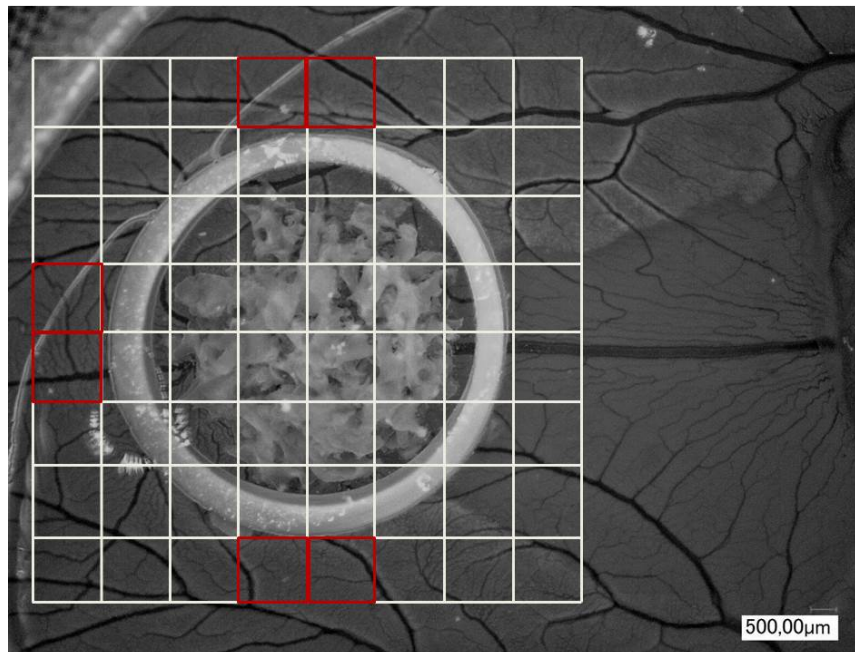
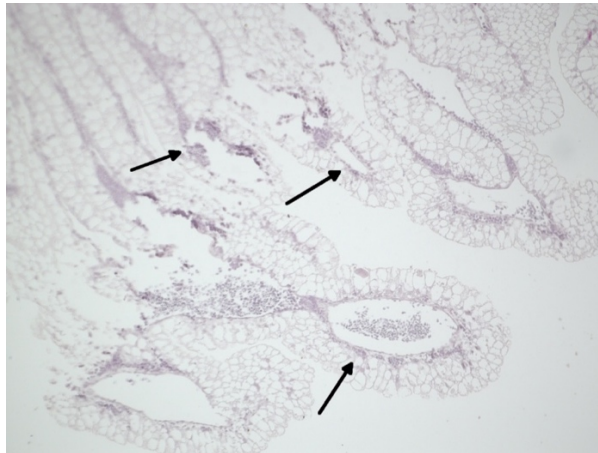


Abbildung 2 Exemplarische Darstellung des inkubierten KEM im Rahmen des CAM-Assay (30 x Vergrößerung). In rot markiert die zur Gefäß-/Verzweigungspunktbestimmung gewählten sechs definierten ROI pro mm² um den Ring [13].

3.2.2.2. Immunhistochemische Färbung

Für die deskriptive immunhistochemische Analyse der Gefäße wurde abschließend der Ring und die zugehörige Probe entnommen und in Formalin für 24 h fixiert, in Paraffin gebettet und in 5 µm dicke Schichten geschnitten (Jeweilige Probe in Triplets, n=36). Es folgte die immunhistochemische Färbung mittels Hämatoxylin-eosin (HE, Merck, Darmstadt, Deutschland) und auf „alpha-smooth muscle actin“ (aSMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben und wie vielfältig in der Literatur beschrieben [6]. Die Analyse der Gefäßanzahl erfolgte dann mittels Lichtbildmikroskop (KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland) ebenfalls nach digitaler Überlagerung eines Rastergitters wie oben beschrieben und Auswertung sechs definierter Regionen pro mm² im Bereich der entnommenen Probe mittels spezifischer Software (BZ-II Analyzer, KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland, Abbildung 3 A/B).

A



B

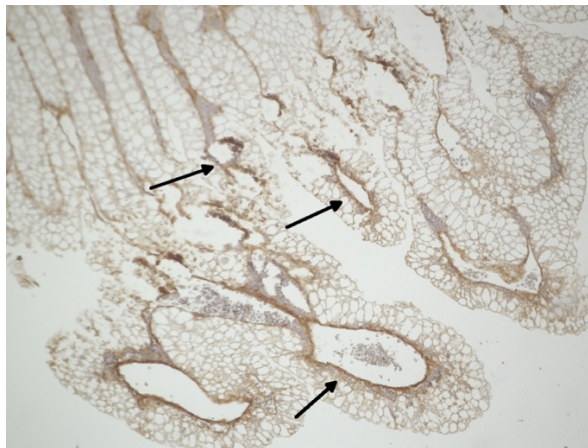


Abbildung 3 Exemplarische immunhistochemische Schnittbilder nach Inkubation von allogenen KEM mit PRF für 24 h im CAM-Assay. (A) HE Färbung, (B) aSMA-Färbung. Die Pfeile markieren jeweils beispielhaft Gefäßstrukturen [13].

3.2.3. Statistische Auswertung

Die Auswertung der generierten Daten erfolgte als jeweiliger Mittelwert mit Standardabweichung über SPSS (Version 23, IBM, Ehningen, Deutschland). Zur graphischen Darstellung wurden Säulendiagramme mit Fehlerbalken gewählt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test analysiert. Nach Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test, erfolgte die statistische Analyse bei normal verteilten Daten mittels Student's t-Test und bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

4.1. Initiale Interaktion PRF/KEM und Analyse der Wachstumsfaktorexpression

Zunächst wurde die initiale Zell-Zell-Interaktion zwischen KEM und PRF untersucht. Hier zeigte sich erwartungsgemäß eine erhöhte Thrombozytenkonzentration für die PRF im Vergleich zur Vollblutanalyse. Die Inkubation von PRF mit den entsprechenden KEM sorgte für eine verminderte Thrombozytenzahl mit einem statistisch signifikanten Unterschied für das Material alloplastischen Ursprungs (vgl. Tabelle 1 und Abb. 4).

Probe	Mittlere Thrombozytenzahl x 10 ³ /μl	p-Wert (entsprechende Probe vs. PRF, Mann- Whitney-U-Test)
PRF	374.66 ± 158.16	-
Blut	294.44 ± 39.83	0.161
AKM	267.22 ± 218.23	0.340
APKM	183.66 ± 183.06	0.05
XKM1	246.67 ± 184.06	0.161
XKM2	326.44 ± 202.59	0.796

Tabelle 2 Mittlere Thrombozytenzahl x 10³/μl ± Standardabweichung nach 15-minütiger Inkubation der jeweiligen Proben mit PRF sowie für Vollblut. P-Werte im Vergleich zum alleinigen PRF (Mann-Whitney-U-test) [13].

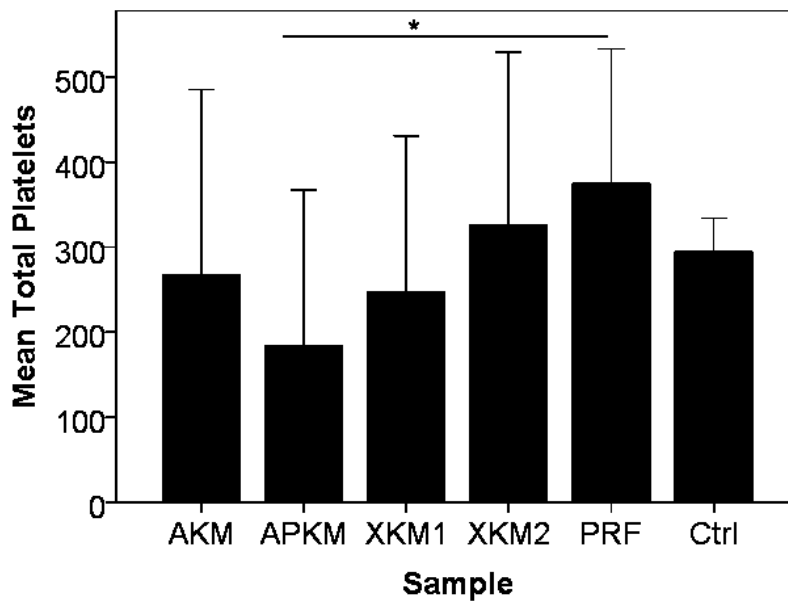


Abbildung 4 Mittlere Thrombozytenzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$ \pm Standardabweichung nach 15-minütiger Inkubation der jeweiligen Proben mit PRF sowie für Vollblut (Ctrl.) im Vergleich zum alleinigen PRF. Hier signifikant verminderte Anzahl für APKM (* $p=0.05$)

Folgend wurde die Wachstumsfaktorexpression nach Inkubation der PRF mit dem entsprechenden KEM mittels ELISA dargestellt. VEGF wurde hier in allen Proben gemindert exprimiert, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dahingegen war die TGF- β -Expression für beide KEM xenogenen Ursprungs im Vergleich zur PRF allein tendenziell erhöht, während PDGF wiederum signifikant geringer in Kombination mit allen Knochenersatzmaterialien exprimiert wurde (Tabelle 3A-C, Abb. 5).

A

Probe	Mittlere VEGF Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. PRF, Mann-Whitney-U-Test)
PRF	111.47 \pm 58.04	-
AKM	85.90 \pm 44.27	0.161
APKM	78.75 \pm 45.00	0.089
XKM1	79.68 \pm 47.48	0.098
XKM2	83.34 \pm 59.95	0.174

B

Probe	Mittlere TGF-β Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. PRF, Mann- Whitney-U-Test)
PRF	298.16 \pm 396.15	-
AKM	283.44 \pm 457.51	0.512
APKM	272.95 \pm 455.23	0.775
XKM1	428.20 \pm 444.10	0.285
XKM2	367.81 \pm 407.39	0.838

C

Probe	Mittlere PDGF Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. PRF, Mann- Whitney-U-Test)
PRF	476.29 \pm 204.94	-
AKM	209.08 \pm 252.08	0.003
APKM	241.29 \pm 268.21	0.002
XKM1	217.12 \pm 223.60	0.004
XKM2	208.82 \pm 160.05	0.013

Tabelle 3 Mittlere Protein-Expression in pg/ml nach ELISA-Quantifizierung für A: VEGF, B: TGF- β und C: PDGF \pm Standardabweichung. P-Werte im Vergleich der jeweiligen Probe zur alleinigen PRF (Mann-Whitney-U-test) [13]

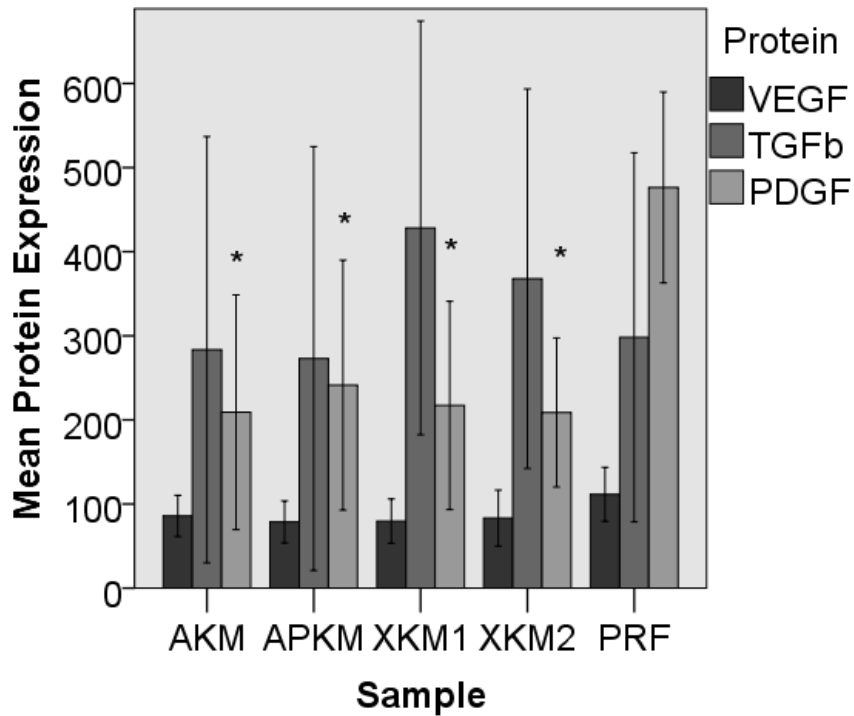


Abbildung 5 Expression von VEGF, TGF-β und PDGF der jeweiligen Proben im Vergleich zum alleinigen PRF. PDGF zeigte sich hier für alle untersuchten Materialien statistisch signifikant erniedrigt (* $p < 0.05$) [13].

Die Darstellung der räumlich-physikalischen Zell-Zell-Interaktion mittels Rasterelektronenmikroskopie zeigte, dass alle untersuchten KEM von einer dünnen PRF-Schicht umgeben waren, welche durch engmaschige Fibrinfibrillen vernetzt sind (Abb. 6).

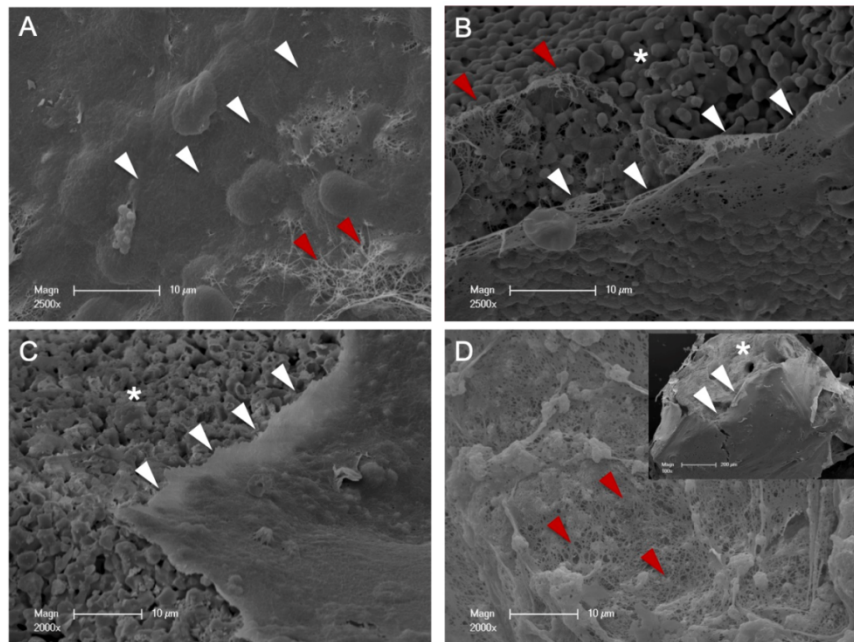


Abbildung 6 Rasterelektronenmikroskopie für allogene (A), alloplastische (B) und xenogene Materialien ((C), XKM1, (D) XKM2), jeweils in Kombination mit PRF. Die KEM-Oberfläche (*) zeigt sich von einer dünnen PRF-Schicht bedeckt (weiße Pfeile), die wiederum aus eng liegenden Fibrinfilamenten gebildet wird (rote Pfeile) [13].

4.2. Einfluss von PRF auf Osteoblasten und Analyse von Proliferations- und Differenzierungsmarkern

Um einen möglichen direkten Einfluss der PRF auf humane Osteoblasten zu untersuchen, erfolgte die Co-Kultur der entsprechenden nativen KEM respektive mit der Kombination aus PRF und KEM und der Zelllinie für 24h. Die Analyse der Genexpression zeigte eine gesteigerte *ALPL* Expression für alle KEM in Kombination mit PRF mit einem statistisch signifikanten Anstieg für alloplastische KEM. Überdies konnte eine statistisch signifikant niedrigere *COL1A1*-Expression für das allogene KEM im Vergleich zur Negativkontrolle (alleinige Osteoblasten) nachgewiesen werden. Im Vergleich zur nativen KEM zeigte sich die *COL1A1*-Expression für die Kombination aus PRF und xenogenes KEM 1 statistisch signifikant gesteigert. Alloplastische und allogene KEM demonstrierten eine signifikant gesteigerte *RUNX-2*-Expression. Für die *BMP2* und *OCN* Expression konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen evaluiert werden (Tabelle 4, A-E, Abbildung 7A,B).

Probe	Mittlere <i>ALPL</i> Expression	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	30.14 ± 1.73	-	-
AKM	26.02 ± 1.02	0.083	0.127
AKM+	28.38 ± 1.37	0.248	
APKM	26.23 ± 0.35	0.083	0.050
APKM+	28.55 ± 1.05	0.248	
XKM1	28.26 ± 0.902	0.121	0.564
XKM1+	27.96 ± 1.04	0.439	
XKM2	27.85 ± 1.04	0.083	0.827
XKM2+	28.14 ± 0.54	0.083	

B

Probe	Mittlere <i>BMP2</i> Expression	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	29.83 ± 3.57	-	-
AKM	30.15 ± 2.99	0.827	0.827
AKM+	29.81 ± 2.77	0.827	
APKM	29.83 ± 3.06	0.827	0.827
APKM+	29.99 ± 2.64	0.827	
XKM1	30.42 ± 2.57	0.827	1.00
XKM1+	30.33 ± 3.78	1.00	
XKM2	29.62 ± 2.65	0.827	0.127
XKM2+	32.35 ± 0.74	0.513	

C

Probe	Mittlere <i>COL1A1</i> Expression	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	27.98 ± 6.24	-	-
AKM	19.89 ± 1.91	0.050	0.127
AKM+	26.54 ± 7.42	0.827	
APKM	22.0 ± 5.11	0.275	0.127
APKM+	29.85 ± 5.68	0.513	
XKM1	27.64 ± 6.40	0.513	0.564

XKM1+	33.99 ± 0.20	0.564	
XKM2	22.46 ± 4.93	0.275	
XKM2+	34.06 ± 0.84	0.513	0.050

D

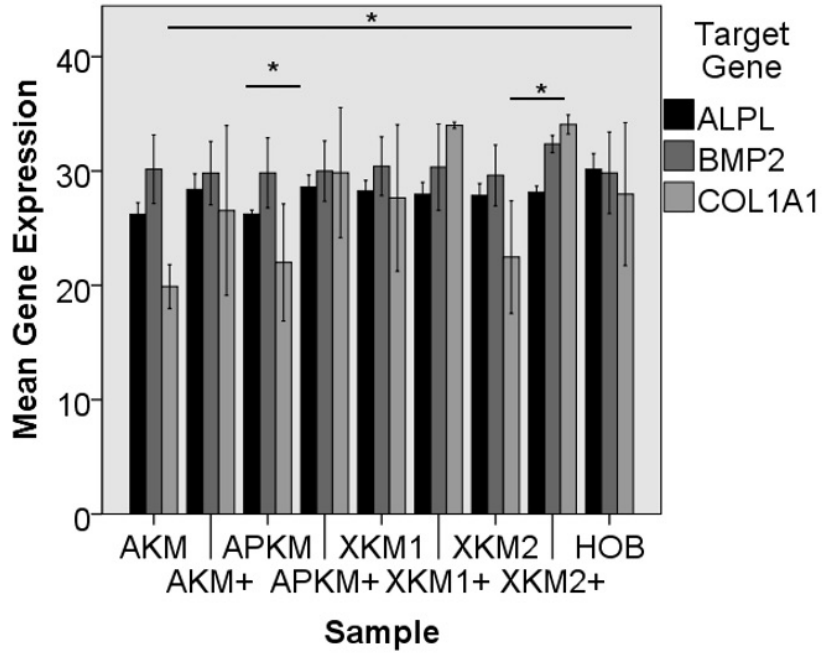
Probe	Mittlere OCN Expression	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	14.34 ± 19.03	-	-
AKM	13.59 ± 17.49	0.827	
AKM+	13.37 ± 17.18	0.827	0.827
APKM	12.96 ± 16.68	0.827	
APKM+	14.98 ± 20.20	0.827	0.827
XKM1	14.47 ± 18.59	0.827	
XKM1+	19.80 ± 24.06	0.564	0.564
XKM2	12.68 ± 16.06	0.827	
XKM2+	26.05 ± 17.52	0.275	0.127

E

Probe	Mittlere RUNX-2 Expression	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	33.09 ± 1.73	-	-
AKM	31.14 ± 0.74	0.050	
AKM+	32.66 ± 2.08	0.827	0.513
APKM	30.75 ± 1.08	0.050	
APKM+	32.55 ± 2.10	0.275	0.257
XKM1	33.26 ± 0.59	0.513	
XKM1+	33.27 ± 1.85	0.564	1.00
XKM2	31.28 ± 1.48	0.275	
XKM2+	33.11 ± 4.41	0.827	0.513

Tabelle 4 Mittlere Gen-Expression nach PCR-Analyse für A: ALPL, B: BMP2, C: COL1A1, D:OCN und E: RUNX-2 ± Standardabweichung. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].

A



B

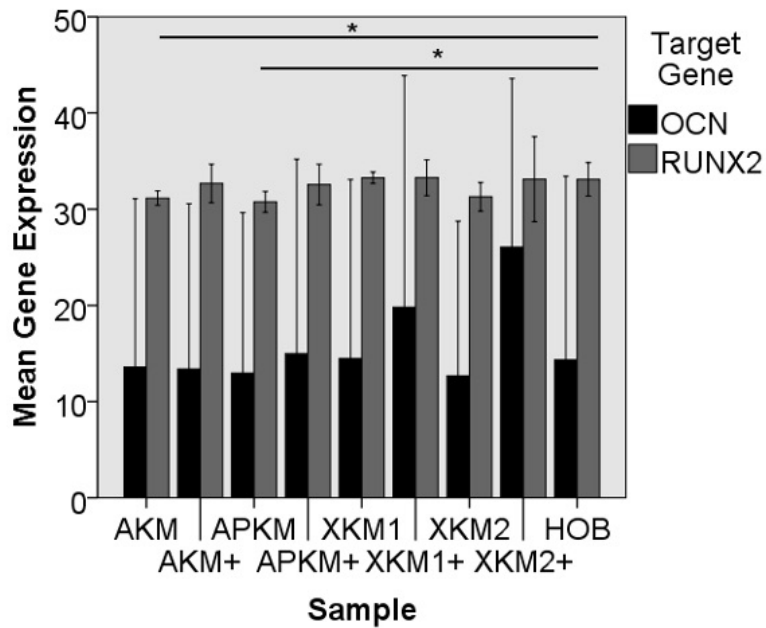


Abbildung 7 Mittlere Gen-Expression von A: *ALPL*, *BMP2* und *COL1A1* und B: *OCN* und *RUNX-2* nach Co-Inkubation der entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF mit HOB für 24h im Vergleich zu nativer Probe und alleinige HOB(* $p < 0.05$, *ALPL*: APKM vs. APKM+: $p = 0.050$, *COL1A1*: AKM vs. HOB $p = 0.050$, XKM2 vs. XKM2+: $p = 0.050$, *RUNX2*: AKM vs. HOB: $p = 0.050$, APKM vs. HOB: $p = 0.050$) [12].

Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis entsprechender Marker mittels ELISA. Hier zeigte sich die ALP Expression im Vergleich zur Negativkontrolle für das allogene und für beide xenogene KEM signifikant reduziert. Für COL und OCN Expression konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden, BMP stellte sich für allogene und xenogene Materialien im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöht dar (Tabelle 5. Abbildung 8A,B).

A

Probe	Mittlere ALP Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	3980.53± 1751.86	-	-
AKM	5893.47± 437.749	0.050	0.275
AKM+	4091.66± 2352.30	0.127	
APKM	6099.42± 3006.82	0.127	0.275
APKM+	6713.18 ± 2330.33	0.127	
XKM1	7031.43± 1955.22	0.050	0.275
XKM1+	3855.01± 2789.08	0.127	
XKM2	3219.49± 706.21	0.050	0.275
XKM2+	3935.84± 392.31	0.275	

B

Probe	Mittlere COL Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	2502.06± 3004.99	-	-
AKM	1101.07± 666.66	0.827	0.513
AKM+	2126.60± 3181.29	0.275	
APKM	2146.64± 2427.82	0.827	0.127
APKM+	2634.02± 3533.55	0.827	
XKM1	2124.46± 3113.57	0.513	0.275
XKM1+	1705.80± 2339.48	0.439	
XKM2	394.48± 305.84	0.127	0.439
XKM2+	1652.37± 2495.20	0.275	

C

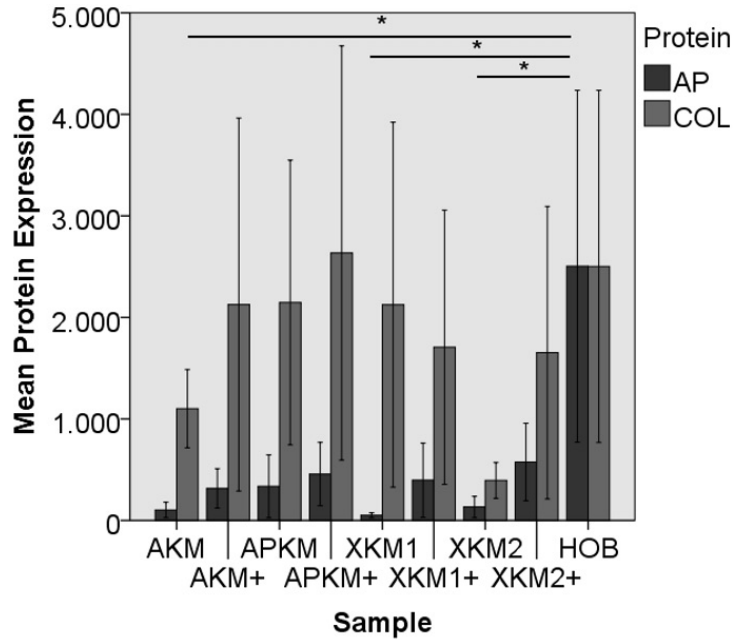
Probe	Mittlere OCN Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	1107.52± 310.94	-	-
AKM	3048.80± 824.21	0.127	0.513
AKM+	3971.44± 2436.41	0.827	
APKM	1524.62± 734.12	0.275	0.827
APKM+	2715.51± 1862.22	0.127	
XKM1	2689.14± 1504.79	0.127	0.275
XKM1+	4117.33± 1746.73	0.827	
XKM2	1977.93± 1412.79	0.513	0.127
XKM2+	4300.08± 1460.49	0.513	

D

Probe	Mittlere BMP Expression (pg/ml)	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	2503.98± 3001.88	-	-
AKM	103.56± 132.29	0.050	0.513
AKM+	315.06± 336.14	0.127	
APKM	336.50± 536.87	0.513	0.275
APKM+	456.91± 540.82	0.275	
XKM1	50.21± 42.82	0.127	0.275
XKM1+	396.22± 634.17	0.050	
XKM2	132.69± 181.62	0.275	0.275
XKM2+	575.36± 661.23	0.050	

Tabelle 5 Mittlere Protein-Expression (pg/ml) nach ELISA Quantifizierung für A: AP, B: COL, C: OCN und D: BMP ± Standardabweichung. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].

A



B

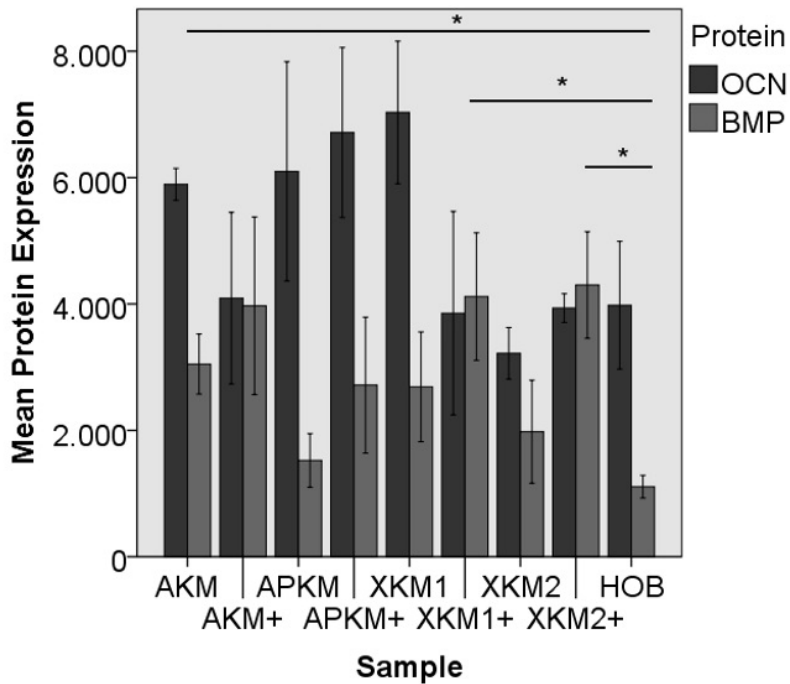


Abbildung 8 Mittlere Protein-Expression von A: AP und COL, sowie B: OCN und BMP nach Co-Inkubation der entsprechenden Proben mit (+) ohne PRF mit HOB für 24h im Vergleich zu nativer Probe und alleinige HOB (* $p < 0.05$, *ALPL*: APKM vs. APKM+: $p = 0.050$, *COL1A1*: AKM vs. HOB $p = 0.050$, *XKM2* vs. *XKM2+*: $p = 0.050$, *RUNX2*: AKM vs. HOB: $p = 0.050$, *APKM* vs. HOB: $p = 0.050$) [12].

Die Vitalitätsbestimmung der Osteoblasten nach 24h Co-Inkubation mit den entsprechenden KEM mit und ohne PRF zeigte eine statistisch gesteigerte metabolische Aktivität für xenogene KEM im Vergleich zu alleinigen HOBs. XKM1 demonstrierte überdies eine signifikant erhöhte Absorption in Kombination mit PRF im Vergleich zur nativen Kontrolle (Tabelle 6, Abbildung 9).

Probe	Mittlere Absorption bei 570nm	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	0.303 ± 0.03	-	-
AKM	0.443 ± 0.11	0.095	
AKM+	0.425 ± 0.13	0.151	0.690
APKM	0.429 ± 0.25	0.310	
APKM+	0.635 ± 0.28	0.151	0.412
XKM1	0.232 ± 0.04	0.016	
XKM1+	0.698 ± 0.21	0.008	0.008
XKM2	0.348 ± 0.09	0.222	0.222
XKM2+	0.545 ± 0.22	0.032	

Tabelle 6 Mittlere Absorption bei 570nm im MTT Assay nach 24h Co-Inkubation der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF und HOBs. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].

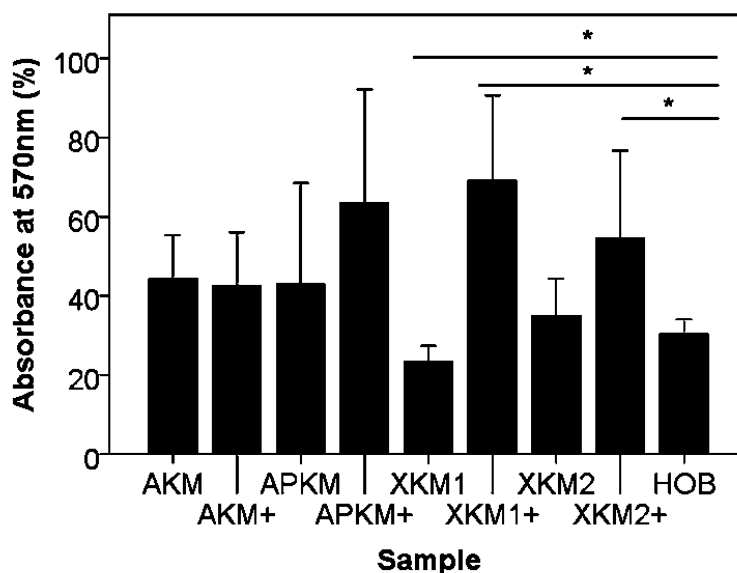


Abbildung 9 MTT assay zum Vitalitätsnachweis über eine Absorption im Bereich von 570nm der HOBs nach Co-Inkubation mit der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF (* p<0.05 Mann-Whitney-U test vs. HOB, XKM1: p=0.016, XKM1+: p=0.008, XKM2+: p=0.032) [12].

Für die Kombination von PRF mit allen entsprechenden KEM konnte eine Tendenz zur Steigerung der Osteoblastenproliferation im Cell Tracker Assay im Vergleich zu alleinigen HOBs analysiert werden. Verglichen mit der nativen Kontrolle zeigte die Kombination mit PRF von alloplastischen und xenogenen Materialien ebenfalls eine Tendenz zur gesteigerten Proliferation (Tabelle 7, Abbildung 10 und 11).

Probe	Mittlere Zellzahl	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	4.843 ± 8.906	-	-
AKM	5.627 ± 12.963	0.439	0.121
AKM+	5.291 ± 6.771	0.121	
APKM	4.228 ± 10.464	0.439	0.439
APKM+	5.403 ± 6.893	1.00	
XKM1	4.970 ± 11.287	0.439	0.121
XKM1+	5.239 ± 5.694	0.121	
XKM2	2.197 ± 6.181	0.121	1.00
XKM2+	4.175 ± 5.746	0.121	

Tabelle 7 Mittlere Zellzahl im Cell Tracker Proliferations Assay nach 24h Co-Inkubation der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF und HOBs. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].

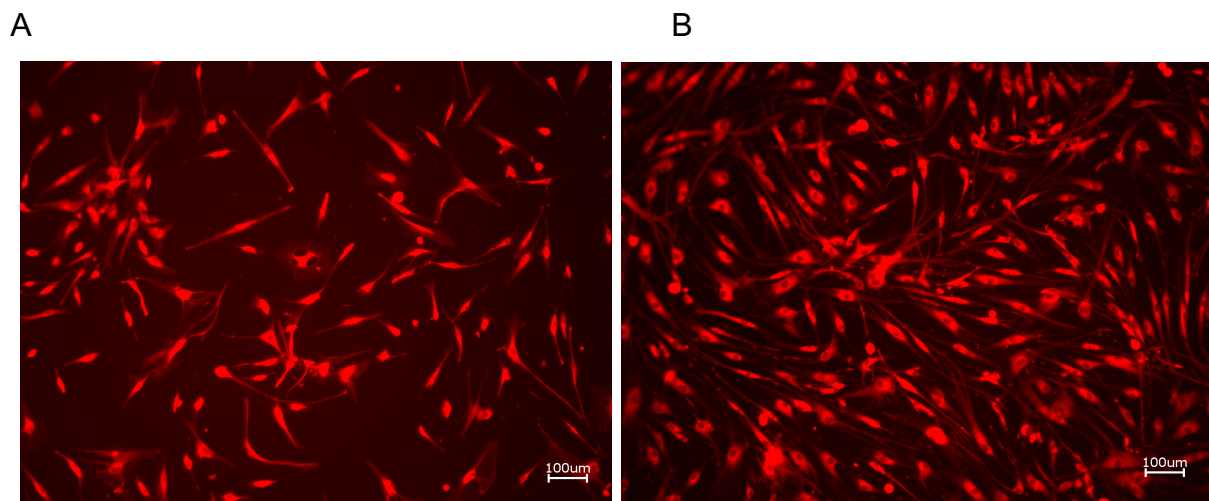


Abbildung 10 Exemplarische Darstellung von allogenen KEM A: nativ und B: in Kombination mit PRF im Cell Tracker Red Assay zur Analyse des Proliferationspotentials (10x Vergrößerung) [12].

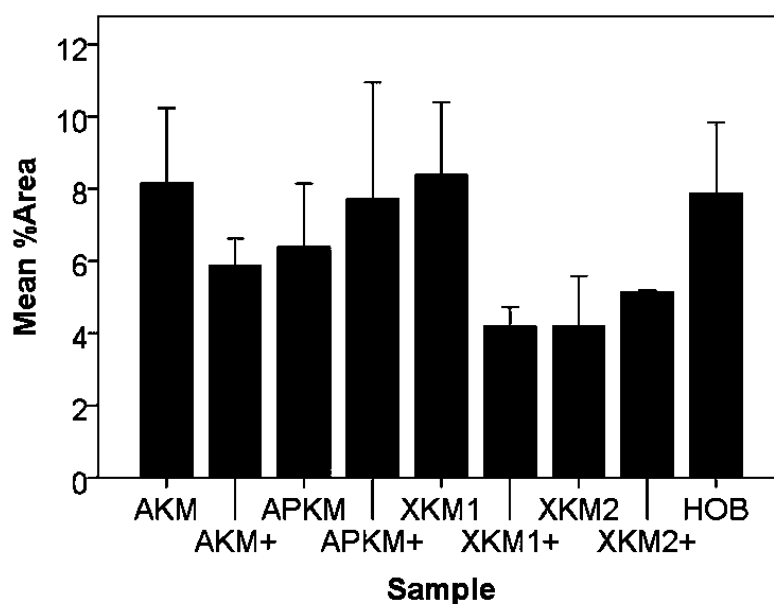


Abbildung 11 Mittlere Prozentzahl der durch Zellen bedeckten Fläche nach Cell Tracker Red Proliferations-assay für die entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF (jeweils $p > 0.05$ im Vergleich zu alleiniger HOB und native KEM) [12].

Die Kombination von PRF hatte mit allen getesteten KEM keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der Osteoblasten, wohlgleich eine tendenziell gesteigerte Anzahl an migrierten Zellen bei allen prävascularisierten KEM im Vergleich zu HOBs allein oder der nativen Kontrolle demonstriert werden konnte (Tabelle 8, Abbildung 12, 13).

Probe	Mittlere Anzahl migrierter Zellen	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
HOB	3.584 ± 5.40	-	-
AKM	3.834 ± 5.688	0.439	1.00
AKM+	6.878 ± 7.634	0.439	
APKM	6.230 ± 6.33	1.00	0.121
APKM+	5.236 ± 9.12	0.439	
XKM1	5.813 ± 6.757	0.439	0.439
XKM1+	6.769 ± 9.368	0.439	
XKM2	3.116 ± 4.537	1.00	0.439
XKM2+	4.872 ± 5.94	1.00	

Tabelle 8 Mittlere Anzahl migrierter Zellen im Scratch Assay nach 24h Co-Inkubation der entsprechenden Probe mit (+)/ohne PRF und HOBs. P-Werte im Vergleich der jeweiligen nativen Probe und zur alleinigen HOB Kontrolle (Mann-Whitney-U-test) [12].

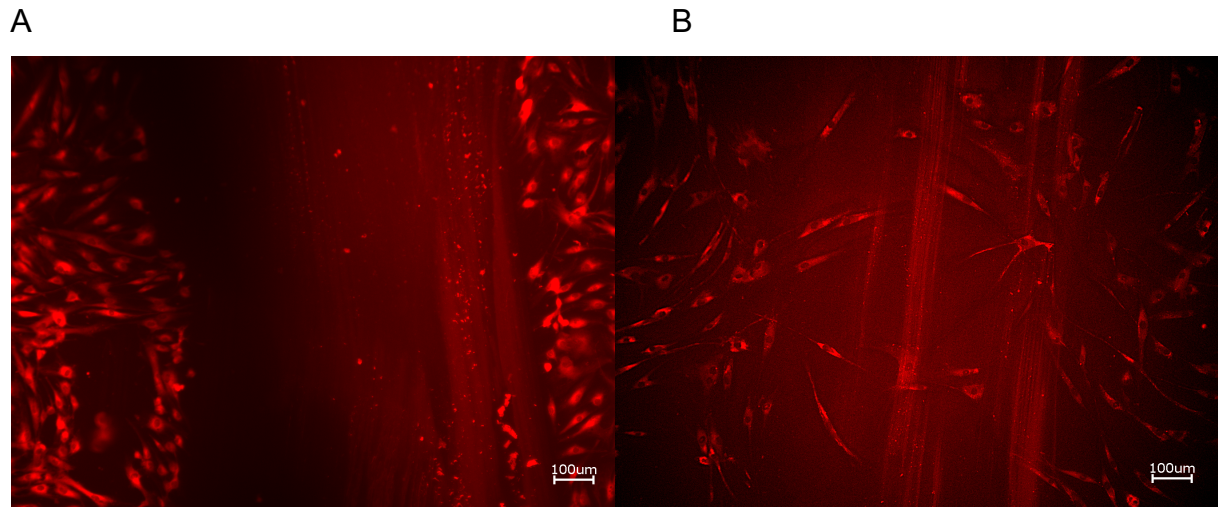


Abbildung 12 Exemplarische Darstellung von allogenen KEM A: nativ und B: in Kombination mit PRF im Scratch-Test-Assay zur Analyse des Migrationspotentials (10x Vergrößerung) [12].

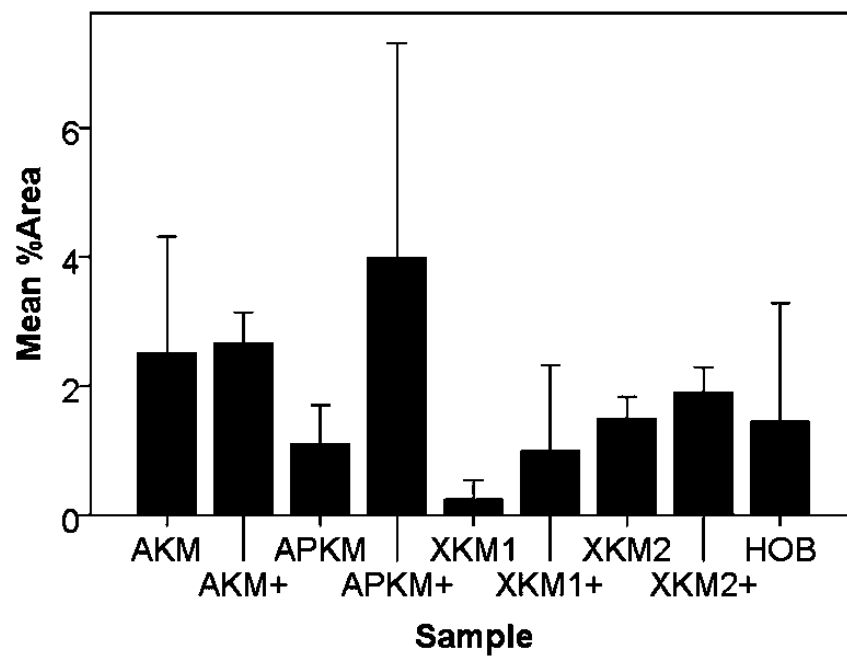


Abbildung 13 Mittlere Prozentzahl der durch Zellen bedeckten Fläche des Spaltes nach Migrations-assay für die entsprechenden Proben mit (+)/ohne PRF (jeweils $p > 0.05$ im Vergleich zu alleiniger HOB und nativer KEM) [12].

4.3. Quantifizierung der Angiogenese in vivo

Abschließend wurde der Einfluss der Kombination von PRF mit den entsprechenden KEM auf die Angiogenese *in vivo* mittels CAM-Assay untersucht. Hier stellte sich eine tendenziell gesteigerte Gefäßanzahl für die alleinige PRF im Vergleich zur Negativkontrolle dar, die Kombination aller untersuchten Materialien zeigte eine geringere Gefäßanzahl im Vergleich zur Negativkontrolle. Hierbei konnte eruiert werden, dass die Kombination von PRF mit KEM eine höhere Gefäßanzahl aufwies, die im Falle der xenogenen und des alloplastischen Materials sogar statistisch signifikant gesteigert war (vgl. Tabelle 4A und Abb. 7A).

Bei Betrachtung der Verzweigungspunkte pro mm² konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen dargestellt werden, obwohl die alleinige PRF, sowie die Kombination aus PRF und KEM im Vergleich zur nativen Gruppe diese leicht erhöhten. Das xenogene Material 1 zeigte hier sogar einen statistisch signifikanten Unterschied auf (vgl. Tab. 4B und Abb. 7B).

A

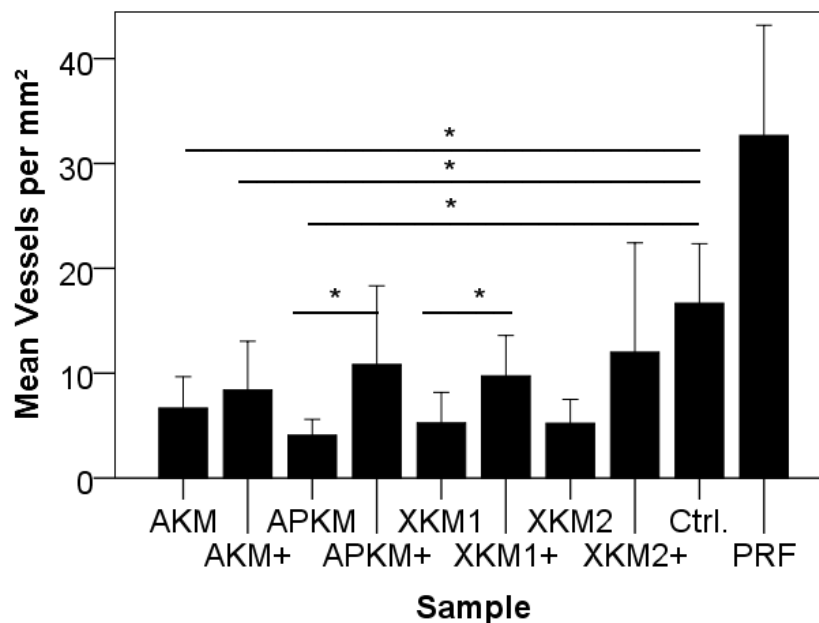
Probe	Mittlere Anzahl an Gefäßen/mm ²	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
Kontrolle	16.67 ± 5.68	-	-
PRF	32.66 ± 10.50	0.127	-
AKM	6.66 ± 2.99	0.014	0.406
AKM+	8.40 ± 4.64	0.041	
APKM	4.08 ± 1.50	0.009	0.007
APKM+	10.83 ± 7.49	0.241	
XKM1	5.25 ± 2.915	0.018	0.015
XKM1+	9.75 ± 3.84	0.051	
XKM2	5.22 ± 2.27	0.012	0.120
XKM2+	12.00 ± 10.43	0.302	

B

Probe	Mittlere Anzahl an Verzweigungspunkten /mm ²	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
Kontrolle	7.33 ± 5.68	-	-
PRF	10.00 ± 7.00	0.275	-
AKM	2.91 ± 2.23	0.217	0.688
AKM+	3.50 ± 2.54	0.347	
APKM	1.58 ± 1.16	0.138	0.135
APKM+	4.5 ± 4.32	0.510	
XKM1	1.75 ± 1.48	0.133	0.005
XKM1+	4.75 ± 1.66	0.412	
XKM2	2.33 ± 1.93	0.211	0.103
XKM2+	5.66 ± 4.63	0.696	

Tabelle 9 Lichtbildmikroskopisch erfasste (A) Mittlere Gefäßanzahl ± Standardabweichung pro mm² und (B) Mittlere Anzahl Verzweigungspunkte ± Standardabweichung pro mm² nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. P-Werte im Vergleich der jeweiligen Probe zur negativen Kontrolle und alleiniger PRF (Mann-Whitney-U-test) [13]

A



B

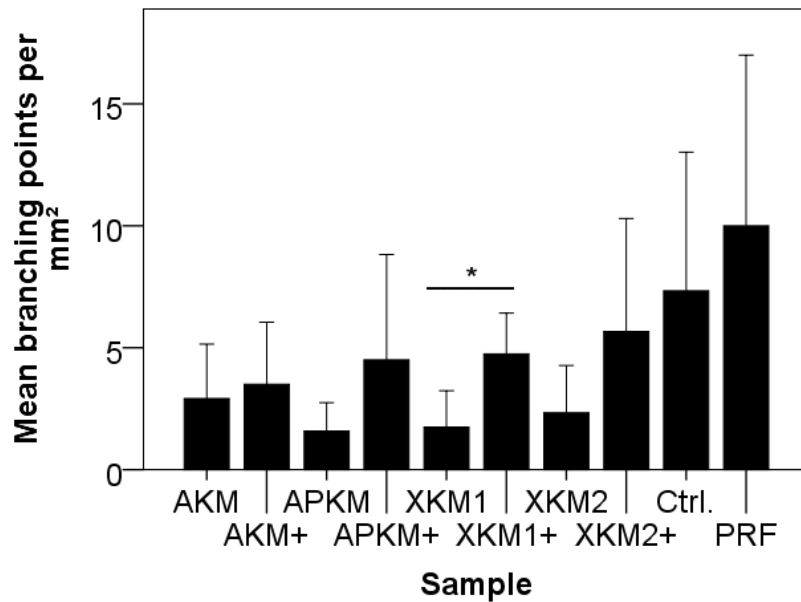


Abbildung 14(A) Mittlere Gefäßanzahl \pm Standardabweichung pro mm² und (B) Mittlere Anzahl Verzweigungspunkte \pm Standardabweichung pro mm² nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. (* <0.05) [13].

Schließlich sollten diese Ergebnisse mittels immun-histochemischer Färbung reproduziert werden. Wie zu erwarten zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, wobei im Rahmen der HE-Färbung die Kombination mit PRF und allopathischen und xenogenen Materials 2 im Vergleich zur nativen Kontrolle eine statistisch signifikant gesteigerte Gefäßanzahl aufwies. Dies konnte in der aSMA Färbung nochmals bestätigt werden, hier mit statistisch signifikant gesteigerter Gefäßanzahl für das allogene, alloplastische und xenogene Knochenmaterial 2 (Vgl. Tabelle 5 A/B und Abb. 8A/B).

A

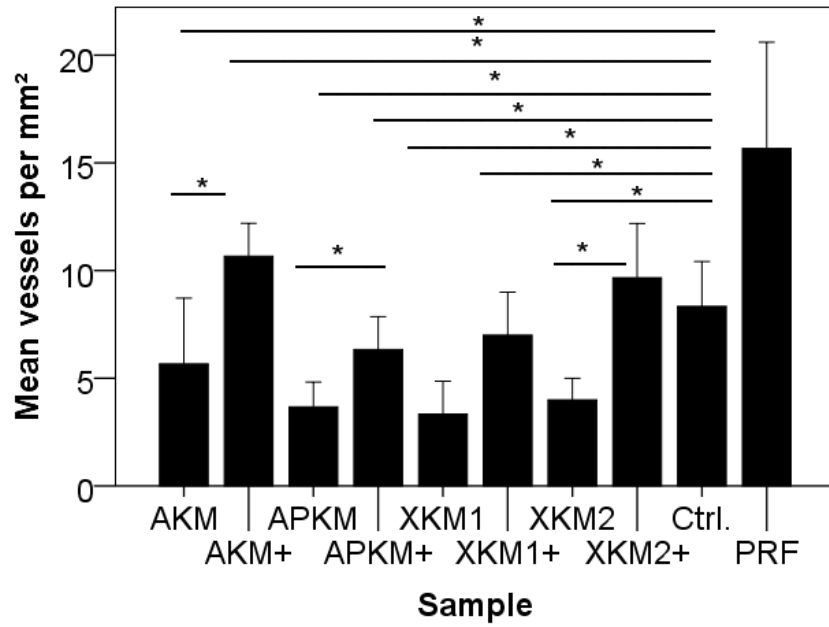
Probe	Mittlere Anzahl Gefäß/mm² (HE Färbung)	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
Kontrolle	11.66 ± 2.51	-	-
PRF	17.66 ± 5.50	0.200	-
AKM	5 ± 1.73	0.046	0.046
AKM+	10.33 ± 1.52	0.500	
APKM	2.66 ± 0.57	0.046	0.046
APKM+	5.33 ± 1.52	0.050	
XKM1	3.66 ± 1.15	0.046	0.072
XKM1+	6 ± 1.00	0.050	
XKM2	3.00 ± 1.00	0.050	0.050
XKM2+	9.00 ± 2.64	0.184	

B

Probe	Mittlere Anzahl Gefäß/mm² (aSMA Färbung)	p-Wert (entsprechende Probe vs. Kontrolle, Mann-Whitney-U-Test)	p-Wert (entsprechende Probe vs. KEM nativ, Mann-Whitney-U-Test)
Kontrolle	8.33 ± 2.08	-	-
PRF	15.66 ± 4.93	0.077	-
AKM	5.66 ± 3.05	0.184	0.077
AKM+	10.66 ± 1.53	0.184	
APKM	3.66 ± 1.15	0.046	0.072
APKM+	6.33 ± 1.52	0.184	
XKM1	3.33 ± 1.15	0.050	0.077
XKM1+	7.00 ± 2.00	0.376	
XKM2	4.00 ± 1.00	0.050	0.050
XKM2+	9.66 ± 2.51	0.376	

Tabelle 10 Mittlere Gefäßanzahl ± Standardabweichung pro mm² nach (A) HE und (B) aSMA Färbung nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. P-Werte im Vergleich der jeweiligen Probe zur negativen Kontrolle und alleiniger PRF (Mann-Whitney-U-test) [13].

A



B

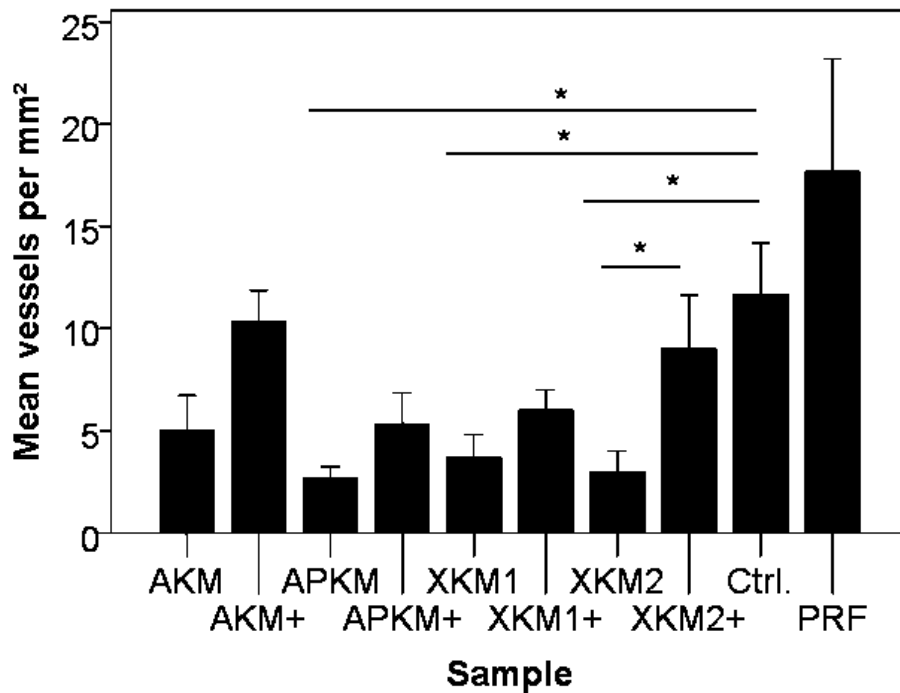


Abbildung 15 Mittlere Gefäßanzahl \pm Standardabweichung pro mm² nach A: HE und B: aSMA Färbung nach 24 h Inkubation der entsprechenden Proben nativ oder mit PRF (+) via CAM-Assay. (*p<0.05) [13]

5. Diskussion

5.1. Zell-Zell-Interaktion der PRF mit KEM *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine vergleichende Studie durchgeführt, um mögliche initiale Interaktionen von PRF in Kombination mit Knochenersatzmaterialien verschiedenen Ursprungs zu analysieren, einen Einfluss auf die Vitalität, Proliferation und Migration von Osteoblasten zu evaluieren und einen potentiellen pro-angiogenen Effekt *in vivo* zu validieren.

In vitro wurde zunächst die zelluläre Interaktion und ein möglicher Einfluss der entsprechenden KEM auf die Wachstumsfaktorexpression der PRF zum frühen Untersuchungszeitpunkt nach 24 h analysiert. Generell wurde sich in dieser Arbeit auf die initiale und frühe Zell-Interaktion fokussiert. So wird in dynamischen Studien, die diese Interaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchten, postuliert, dass gerade die initiale Interaktion zwischen Biomaterial und Spendergefäßsystem im Sinne eines frühen Gefäßanschlusses über angiogene Prozesse zum erfolgreichen Einheilen des Materials führen kann [57].

Als ein wichtiges Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus PRF und KEM zu einer initialen, für KEM alloplastischen Ursprungs signifikante, Reduktion der Thrombozytenkonzentration führte. In vorhergehenden Arbeiten wurde dieser Effekt, hier beschrieben für PRP, mit einer erhöhter Thrombozytenaktivierung, sukzessive -aggregation und schließlich -verbrauch korreliert [47]. Daher kann hypothetisiert werden, dass das PRF initial mit dem jeweiligen KEM über eine Thrombozytenaktivierung interagiert. Vor diesem Hintergrund demonstrierte die Kombination aus alloplastischen KEM und PRF eine statistisch signifikante Reduktion der Thrombozytenanzahl, weswegen hier von einer besonders starken Interaktion ausgegangen werden kann. Es konnte in der Literatur keine vergleichbare Studie gefunden werden, welche die interzellulären Zusammenhänge von KEM unterschiedlichen Ursprungs und PRF näher durchleuchtet und die Ergebnisse dieser Studie vergleichbar analysiert.

Im aktuellen Fokus zum Beitrag der PRF im Hinblick auf die optimierte Hartgewebsregeneration steht insbesondere seine Wachstumsfaktorexpression in Kombination mit KEM. Hier scheinen die ebenfalls im Rahmen dieser Studie untersuchten Faktoren VEG, PDGF und TGF- β von überragender Bedeutung. Wie Eingangs beschrieben regt VEGF primär die Proliferation und Migration der Endothelzellen an [27] und wird u.a. durch TGF- β im Rahmen einer positiven Rückkopplung vermehrt sezerniert [29] während PDGF vorzugsweise zur Reifung der ausgesprosten Gefäße beiträgt [28]. Durch die Kopplung von

Angiogenese und Osteogenese repräsentieren alle drei Faktoren eine exponierte Rolle im Regelkreis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und dem daraus wachsenden „bone remodelling“ und subsequent der ossären Regeneration [58-60].

In vorliegender Arbeit zeigten sich alle untersuchten Faktoren erniedrigt gegenüber der alleinigen PRF, was zunächst im Kontrast zur erhöhten Expression bei der Kombination aus PRP und KEM zu stehen scheint [47, 52] und die Idee eines pro-angiogenen Einfluss der PRF in Kombination mit dem entsprechenden Knochenersatzmaterial zur Optimierung der Osteogenese zu konterkarieren scheint. Eine Studie von Cho *et al.* konnte ebenfalls keine erhöhten Expressionsmuster bei der Kombination von PRP und einem Hydroxylapatit nachweisen [61]. Eine Studie, welche die Expressionskinetik bei Kombination von PRF und KEM unterschiedlichen Ursprungs *in vitro* untersucht, konnte nicht aus der Literatur extrahiert werden. In vorliegender Arbeit zeigte sich einzig TGF- β im Gegensatz zum alleinigen PRF in Kombination mit allen KEM tendenziell erhöht. Interessanterweise wird in anderen Studien postuliert, dass insbesondere TGF- β eine herausragende Rolle im Sekretom der PRF spielt und von Titanoberflächen (wie beispielsweise eines enossalen Implantates) und Kollagenmembranen absorbiert werden kann. Dieser Aspekt könnte die klinische Einsatzmöglichkeit der PRF in Kombination mit dentalen Titanimplantaten und Kollagenmembranen wissenschaftlich untermauern [62]. In wie weit diese Erkenntnisse auf mögliche Implikationen im Zusammenhang mit unterschiedlichen KEM zu übertragen sein könnten, bleibt mit vorliegender Arbeit offen und muss in zukünftigen Studien weitergehend analysiert werden.

Eine mögliche Erklärung für die gewonnenen Daten zu den Wachstumsfaktorexpressionsmuster kann in der Hypothese gefunden werden, dass es über die Kombination zwischen PRF und KEM initial zu einer (hauptsächlich durch das Fibrinnetz bio-physikalischen) Retention der Wachstumsfaktoren zu kommen und damit ihre Expression zu einem frühen Zeitpunkt noch reduziert scheint [47]. Betrachtet man die Wachstumsfaktorexpressionskinetik von VEGF, PDGF oder TGF- β bei der alleinigen PRF wird überdies ersichtlich, dass, im Gegensatz zur PRP, eine kontinuierliche Freisetzung mit einem Höhepunkt nach 3-7 Tagen erreicht wird [53]. Dies geschieht primär passiv über den Zerfall der Fibrinnetzwerkes, welches durch die Plasminprotease Serin zersetzt wird [54]. Auf diese Weise korrelieren die Freisetzungskinetik der PRF im Gegensatz zur PRP (simultane Freisetzungskinetik) mit den Phasen der physiologischen Wundheilung und optimieren so die Regeneration [42]. Die in der vorliegenden Studie beschriebene initiale Minderung der Faktorexpression bei Kombination der PRF mit einem KEM kann in anderen Studien in der Literatur bestätigt werden. Castro *et al.* zeigten vergleichbare Ergebnisse mit einer dann folgenden kontinuierlichen Expression über

14 Tage [63]. Die vorliegende Rasterelektronenmikroskopie bestätigte eine enge räumliche Lagebeziehung des Fibrinnetzes der PRF und des jeweiligen Knochenersatzmaterials. Dadurch kann die Hypothese der biophysikalischen Faktorretention über das Fibrinnetz zwischen PRF und KEM validiert werden.

Es ist bekannt, dass bei Biomaterialien wie Kollagenmatrizes oder Knochenersatzmaterialien entsprechende Porengrößen von Bedeutung für die Initiierung der Angiogenese sind, da hierüber in einer Art Leitstruktur die Gefäß einsprossung erfolgen kann; so zeigte eine frühere Studie aus unserer Arbeitsgruppe bei der Kombination von PRP mit großporigem KEM einen gesteigerten Thrombozytenverbrauch und erhöhte PDGF-Freigabe im Vergleich zu kleinporigen KEM des gleichen (xenogenen) Ursprungs [64]. Für die vorliegende Arbeit wurden daher vergleichbare Porengrößen für alle vier untersuchten KEM gewählt, um die jeweiligen physiologischen Eigenschaften des KEM je nach Ursprung ohne einen Einfluss durch die Porengröße betrachten zu können, z. B. das mögliche osteoinduktive Potential des allogenen KEM. In diesem Kontext konnte eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass bei längerer Inkubationsdauer von bis zu 10 Tagen die Kombination aus PRF und KEM allogenen Ursprungs die Viabilität, Proliferation und Migration von co-inkubierten Osteoblasten *in vitro* signifikant deutlicher steigert als die Kombination mit einem xenogenen Material [55]. Zu dem untersuchten frühen Zeitpunkt konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings für das allogene Material keine exponierte Interaktion mit der PRF festgestellt werden, während xenogene Materialien die TGF- β Expression am stärksten beeinflussten.

Insgesamt sollten weitere biophysikalischen Studien initiiert werden, um Eigenschaften und charakteristische Materialbeschaffenheit der jeweiligen KEM und ihren Einfluss auf die Wachstumsfaktorexpression – insbesondere in Kombination mit PRF - näher zu untersuchen. Von besonderem Interesse erscheint hierbei, ob genannte biophysikalischen Eigenschaften beispielsweise den als möglich osteokonditiv diskutierten Charakteristika allogener KEM gleichwertig oder überlegen erscheinen hinsichtlich der möglichen frühen Beeinflussung der Wachstumsfaktorexpression. Weitere komparative Studien sind hier dringend nötig, um wissenschaftlich fundierte Empfehlungen für die klinische Anwendung oder gar Bevorzugung einer bestimmten Materialklasse geben zu können.

5.2. Einfluss der PRF auf humane Osteoblasten *in vitro*

In dieser Arbeit sollte weiterführend ein möglicher Einfluss der prävascularisierten Knochenersatzmaterialien auf die Zellregulation von Osteoblasten anhand von Vitalität, Proliferation und Migration der Zellen, sowie Analyse der wichtigsten Migrations- und Proliferationsmarker auf Gen- und Proteinebene untersucht werden.

Als ein wichtiges Ergebnis dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Kombination von PRF mit Knochenersatzmaterialien unterschiedlichen Ursprungs zu einer initialen gesteigerten Vitalität der Osteoblasten führt, insbesondere für xenogene Materialien. Dies steht im Einklang mit Daten aus der Literatur, in einer kürzlich erschienenen *in vitro* Studie konnte der negative Effekt eines antiresorptiven Bisphosphonats (Zoledronsäure) auf die Osteoblastenvitalität und -proliferation durch PRF teilweise inhibiert werden [65]. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Studie die Kombination aus PRF und Knochenersatzmaterial nur eine starke Tendenz zur Steigerung der Proliferation und Migration der co-inkubierten Osteoblasten nach 24h nachweisen. In diesem Zusammenhang muss als eine Limitation dieser Arbeit festgehalten werden, dass sich auf die initiale und frühe Zell-Zell-Interaktion fokussiert wurde und demnach nachfolgende Zeitpunkte nicht validiert wurden. In der bereits zitierten vorhergehenden Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass bei längerer Inkubationsdauer von bis zu 10 Tagen die Kombination aus PRF und KEM neben der Vitalität auch die Proliferation und Migration von co-inkubierten Osteoblasten *in vitro* signifikant zu steigern vermag [55]. Es kann daher hypothesiert werden, dass die beschriebene Wachstumsfaktorretention durch das dem KEM umgebende Fibrinnetz initial zuvorderst die Vitalität steigert, ehe die daraus resultierende langsame, graduelle Freisetzung wichtiger Proliferations- und Differenzierungsmarker auch diese Zellfunktion hochreguliert werden kann.

Diese Hypothese wird durch die gefundenen Expressionsmuster mit den evaluierten Wachstumsfaktoren untermauert: als ein weiteres relevantes Ergebnis der Studie konnte hier demonstriert werden, dass die Kombination aus PRF und insbesondere alloplastischen und xenogenen Materialien spezifische Marker wie RUNX-2, alkaline Phosphatase oder Kollagen auf Gen- und Proteinebene im Vergleich zur nativen Kontrolle und den alleinigen Osteoblasten tendenziell zu steigern vermag. In der aktuellen Literaturdiskussion wird diese Frage der möglichen Beeinflussung der Markerexpression weiterhin kontrovers diskutiert. Sumida *et al.* fanden keine gesteigerte ALP, RUNX2 oder BMP2 Freisetzung in Kombination mit PRF nach 4 und 8 Tagen. Im Gegenteil, die Studie zeigte, dass mRNA Level von ALP sogar erniedrigt erschienen im Vergleich zu heranwachsenden und sich noch differenzierenden Osteoblasten [66]. Als eine mögliche Erklärung postulierten die Autoren, dass ALP Expression in reifen

Osteoblasten am höchsten erscheint und PRF womöglich die Differenzierung nicht inhibierte, sondern sie nur zeitlich herauszögern könnte. Dadurch könnte die ossäre Regeneration sogar optimiert werden, da ein initialer „osteogener“ Status der Osteoblasten aufrecht erhalten werden könnte, bevor die ALP Expression durch graduelle Freisetzung weiter zunimmt und die Differenzierung der Zellen abgeschlossen werden kann [66]. Die in dieser Studie nachgewiesene gesteigerte *ALPL*-Gen-Expression nach 24h und im Gegensatz dazu signifikant erniedrigte Expression auf Proteinebene kann als Hinweis zur Untermauerung der genannten Hypothese gesehen werden. In diesem Zusammenhang demonstrierten Wang *et al.* eine subsequent gesteigerte ALP, RUNX-2 und OCN Expression bei der Co-Inkubation von PRF mit Osteoblasten zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt (7.-14. Tag) [67]. Weiterhin kann die Hypothese durch neuaufgetretene Evidenz gestützt werden, die besagt, dass TGF- β und PDGF, zentrale Wachstumsfaktoren der PRF, eine ALP Expression sogar reduzieren könnten [68].

Die weiterhin in dieser Arbeit nachgewiesene gesteigerte Kollagen-Expression durch die Kombination mit PRF konnte durch andere präklinische Studien ebenfalls belegt werden, bei denen von Kollagen abhängige Proteinsignalwege die Proliferation und Zellanhaftung von Osteoblasten steigerten [69]. Auch die gesteigerte BMP und RUNX2 Expression bei der Kombination aus PRF und allogenen, alloplastischen respektive xenogenen KEM ist in Übereinstimmung mit anderen präklinischen Untersuchungen. Durch die gesteigerte Expression könnten folgend wichtige Proteine der ossären Homöostase wie Osteoprotegerin ebenfalls vermehrt freigesetzt werden, die wiederum den Knochenaufbau durch eine erhöhte Kollagen- oder Osteocalcinproduktion vorantreiben könnten [66, 70].

Weiterführend konnte in einer kürzlich vorgestellten *in vitro* Studie gezeigt werden, dass PRF die Formation von Osteoklasten von hämatopoetischen Vollläuferzellen zu inhibieren vermag. Da diese Zellen für den Abbau und die Resorption von Knochensubstanz zuständig erscheinen könnte über diesen Signalweg zusätzlich die ossäre Regeneration über die oben gewonnen initialen Erkenntnisse hinaus optimiert werden [71]. Dies spiegelt sich in *in vivo* Studien wieder, die im Tiermodell bei der Anwendung eines Hydroxylapatits mit inkorporierten PRF eine gesteigerte Osteoblastenzahl und verminderte Osteoklastogenese im Gegensatz zum nativen Knochenersatzmaterial nach 14 und 21 Tagen nachweisen konnten [72].

Im Rahmen der Limitationen dieser Studie muss letztlich konsterniert werden, dass unklar bleibt, welches Knochenersatzmaterial in Kombination mit der PRF die stärkste Zell-Interaktion mit humanen Osteoblasten zu haben vermag. Zu den hier untersuchten initialen Zeitpunkten scheinen allogene Materialien, die über ein mögliches osteoinduktives Potential verfügen, den

alloplastischen und xenogenen Materialien nicht überlegen. Im Gegenteil dazu zeigten insbesondere allogene Materialien in Kombination mit PRF eine stärkere Beeinflussung von Osteoblastenvitalität, -proliferation und -migration zu späteren Analysezeitpunkten [54]. Analog zur Betrachtung der Zell-Zell-Interaktion zwischen PRF und KEM muss im Rahmen der Hypothese einer vornehmlich biophysikalischen Retention der Wachstumsfaktoren und dementsprechend gradueller Freisetzung wichtiger Marker für Migration und Proliferation in der Kommunikation zwischen PRF und Osteoblasten diskutiert (und in zukünftigen Studien geprüft) werden, ob nicht viel mehr Materialcharakteristika der KEM eine entscheidendere Rolle in dieser Frage spielen könnten.

Zusammenfassend kann daher geschlossen werden, dass die Kombination aus PRF und KEM unterschiedlichen Ursprungs humane Osteoblasten initial über eine gesteigerte Vitalität und Freisetzung spezifischer Marker auf Gen- und Proteinebene für die spätere Differenzierung, Proliferation und Migration humane Osteoblasten bedeutend beeinflussen. Durch die graduelle Freisetzung weiterer spezifischer Wachstumsfaktoren wird die subsequente ossäre Regeneration demnach entscheidend positiv beeinflusst, welche in Kombination mit dem unten beschriebenen pro-angiogenen Effekt einen synergistischen Effekt auf die erfolgreiche Implantation der mittels PRF prävascularisierten Knochenersatzmaterialien zu haben vermag.

5.3. Pro-angiogener Effekt der PRF in Kombination mit KEM *in vivo*

In der vorliegenden Studie konnte eine initiale Interaktion der PRF mit allen untersuchten Knochenersatzmaterialien zum frühen Zeitpunkt der Co-Inkubation demonstriert werden. Weiterführend sollten diese Zusammenhänge nun auf einen möglichen Effekt *in vivo* untersucht werden.

Nur durch das komplexe Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen und interzellulärer Mechanismen in der Gesamtheit eines Organismus können mögliche Aussagen validiert und für die klinische Anwendung vorbereitet werden. In der Regel kann hierzu zunächst ein Kleintiermodell dienen, beispielsweise das Rückenhautmodell der Ratte oder Maus, um die gewonnenen *in vitro*-Erkenntnisse zu bestätigen und weiterzuentwickeln [73]. In vorliegender Arbeit wurde sich für den CAM-Assay zur *in vivo*-Analyse der Angiogenese und Neovaskularisation entschieden. Für diese Indikation ist der Assay suffizient in der Literatur dokumentiert [46, 49]. Zusätzlich kann eine mögliche Antwort auf osteogene Stimuli untersucht werden und es daher als mögliches Modell zur Xenograftkultur und -analyse dienen [57, 58]. Als ein überragender Vorteil des CAM-Assays gegenüber dem Kleintiermodell kann konsterniert werden, dass durch die Verwendung des Assays Kleintierversuche reduziert und ersetzt und Testprotokolle verbessert werden können. Dies steht im Einklang mit den „3R Aspekten“ zum Tierschutz, namentlich Tierversuche falls möglich vollständig zu vermeiden (Replacement), sowie die Zahl der Tiere (Reduction) und ihr Leiden (Refinement) im Rahmen des Versuchs auf das unerlässliche Maß zu beschränken, wie in einer europäischen Richtlinie verankert [56].

Weiterhin verdichtet sich zunehmende Evidenz, dass der Assay auch zur Erfassung und Beurteilung immunologischer Prozesse genutzt werden kann [49, 59]. Bedenkt man den entscheidenden Einfluss von Thrombozyten im Rahmen des inerten Immunsystems und beispielsweise im Hinblick auf die Polarisierung von Makrophagen zu einem pro-inflammatorischen oder entzündungsmodulierenden Phänotyp [74], könnte dies zukünftig genutzt werden um zum entscheidenden Verständnis der Rolle des PRF bei einer möglichen Biomaterialinteraktion mit dem Empfängerorgan im Rahmen der Einheilung beizutragen. In vorliegender Arbeit wurden immunologische Aspekte als weitere Limitation der Studie nicht näher untersucht. Folgestudien wurden bereits initiiert, um dieser zentralen Fragestellung für die spätere weichgewebliche und ossäre Regeneration gerecht zu werden.

Bei extensiver Literaturrecherche konnte keine vergleichbare Studie eruiert werden, welche eine komparative Analyse von KEM verschiedenen Ursprungs in Kombination mit autologen Thrombozytenkonzentraten mittels CAM-Assay untersuchte. Einzelne Arbeiten bestätigen

allerdings die Durchführbarkeit zur Analyse der pro-angiogenen Effekte von KEM mittels CAM-Assay [59, 61].

In vorliegender Arbeit wurde die induzierte Gefäß- sowie Gefäßverzweigungspunkanzahl nach 24 h Inkubation von mit PRF biologisierten oder nativen KEM im Vergleich zur alleinigen CAM lichtbildmikroskopisch als auch mittels immunhistochemischer Färbung für HE und α SMA-Antikörper analysiert. Es wurde sich für die Färbung mittels α SMA-Antikörper entschieden, da das Antigen primär von Periozyten exprimiert wird, die in der Gefäßwand verankert u.a. essentiell zur Stabilisierung von Kapillaren, Arteriolen und Venolen beitragen [75]. Somit kann es als Indikator für die Gefäßversorgung angesehen werden. Überdies wird ein möglicher Einfluss von TGF- β , wie von PRF sezerniert, auf eine gesteigerte α SMA-Expression in der Literatur diskutiert [76].

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass in der Kombination aus PRF und KEM die Gefäß- und Verzweigungspunkanzahl gegenüber der Negativkontrolle tendenziell weniger reduziert erschien als bei Inkubation mit nativen KEM. Die alleinige PRF zeigte eine deutliche Tendenz für eine gesteigerte Gefäßproliferation, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Andere Studien konnten diese Tendenz bestätigen und fanden einen signifikanten Einfluss der PRF auf die gesteigerte Gefäßanzahl [60]. In unserer Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang ein positiver, signifikanter Effekt der PRF auf Gefäßanzahl und -verzweigung im CAM-Assay gegenüber der negativen Kontrolle und in Kombination mit verschiedenen Kollagenmembranen eruiert werden. Hierbei erfolgte die Inkubation ebenfalls für 24 h, was einen möglichen initialen Einfluss der PRF auf die Gefäßentstehung validiert [46]. Im Kontext mit der in dieser Arbeit validierten Hypothese der Zytokin- und Wachstumsfaktorretention durch das Fibrinnetz der PRF um die KEM scheint die Kollagenmembran hier aufgrund seiner Materialeigenschaften mit Absorption von TGF- β [62] und rascher Penetration der PRF-Wachstumsfaktoren durch die Kollagenmembran eine frühzeitigere Freisetzung der Faktoren aufzuweisen [77]. Es kann somit ein konsekutiver Freisetzungsmechanismus diskutiert werden, der durch die initialen pro-angiogenen Eigenschaften der PRF langfristig eine optimierte hart- und weichgewebliche Regeneration durch den Einsatz von mit PRF funktionalisierten Biomaterialien möglich erscheinen lässt.

In vorliegender Arbeit war, sowohl lichtbildmikroskopisch als auch immunhistochemisch, eine gesteigerte Gefäßanzahl im Vergleich zwischen nativen und mit PRF funktionalisierten KEM, insbesondere für alloplastische und xenogene Materialien nachvollziehbar. Diese Ergebnisse konnten von weiteren tierexperimentellen und klinischen Studien bestätigt werden. In einer Kleintierstudie konnte die alleinige PRF nicht zur gesteigerten ossären Regeneration eines

„critical size defects“ beitragen und zeigte sogar einen kurzzeitigen negativen Einfluss auf die Wachstumsfaktorexpression [34]. Es kann daher die Hypothese vertreten werden, dass als mögliche Voraussetzung zur optimierten ossären Regeneration für das PRF die Leitstruktur eines entsprechenden Knochenersatzmaterials notwendig sein kann. Analog zu dieser Hypothese demonstrierte die Kombination aus alloplastischen Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat mit PRF einen signifikant positiven Einfluss auf die Formation neuer Knochenstrukturen [62]. In einer weiteren Tierstudie wiesen Nacopoulos *et al.* eine statistisch signifikant gesteigerte Knochenregeneration von PRF und alloplastischen KEM im Vergleich zur alleinigen PRF nach [78]. Auch in multiplen Fallberichten konnte der positive Effekt der Kombination aus alloplastischen KEM und PRF klinisch bestätigt werden [79-81]. In einer Studie bei parodontalen Bifurkationsbefall bestätigten Rani *et al.* diese Ergebnisse und fanden den synergistischen Effekt von alloplastischen KEM und PRF im Sinne einer klinisch erfolgreichen ossären Regeneration [82]. Auch für die Kombination aus PRF und xenogenen KEM konnte ein positiver Effekt auf knöchernen Regeneration nachvollzogen werden [63-65]. In einer randomisierten klinischen Studie stellte sich ebenfalls die Kombination aus allogenen KEM und PRF als effektiv zum Erhalt des knöchernen Alveolenvolumens nach Zahnextraktion dar und demonstrierte damit ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration [66].

Zusammenfassend konnte, nach initialer Interaktion zwischen PRF und KEM, eine gesteigerte Gefäßneubildung insbesondere mit alloplastischen und xenogenen Materialien *in vivo* demonstriert werden. Mit den genannten Limitationen der Arbeit kann jedoch keine Empfehlung zur Bevorzugung eines KEM spezifischen Ursprungs gegeben werden. Weiterführende Vergleichsstudien sollten hier initiiert werden.

5.3. Implikationen für klinische Translation und zukünftige Tissue Engineering-Ansätze

PRF interagiert initial mit allen getesteten Knochenersatzmaterialien und steigerte *in vivo* die Angiogenese. Diese Methode der für das tissue engineering essentiellen Prävascularisierung [3, 22] muss in zukünftigen präklinischen und klinischen Studien weiterführend analysiert werden, stellt jedoch potentiell eine suffiziente alternative Möglichkeit zur Prävascularisierung der getesteten Biomaterialien (zB. Im Vergleich zur additiven Fertigung [31]) mit Potential zur klinischen Anwendung dar [5]- wie in vorliegender Arbeit erfolgreich gezeigt. In einer methodisch interessanten Vergleichsstudie untersuchten beispielsweise Joshi *et al.* den Einfluss der Kombination aus PRF und Tricalciumphosphat gegenüber einer durch Tissue Engineering mit rekombinatem PDGF-Wachstumsfaktor beladenen Kollagenmembran auf die enorale Regeneration. Die Autoren demonstrierten dabei, dass die Wachstumsfaktormenge - gemessen über die parodontale Sulkusflüssigkeit - bei der PRF-Gruppe deutlich höher erschien, bei insgesamt nicht signifikanten Unterschieden in der Wundheilung [83]. Daraus kann geschlossen werden, dass im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit die initiale Reduktion der Faktorexpression bei der Kombination von PRF mit den jeweiligen KEM langfristig zu einer adäquaten und konsistenten Expression führt, die einer Therapie mit rekombinanten Wachstumsfaktoren lokal am Ort der Regeneration gleichwertig erscheinen können.

Jedoch bestehen hinsichtlich der PRF weiterhin Kontroversen, die eine mögliche Nutzung zur Prävascularisierung konterkarieren könnten. So konnte gezeigt werden, dass die PRF deutliche interindividuelle Unterschiede aufweist und je nach Abhängigkeit von Alter und Geschlecht des Spenders in Quantität und Qualität stark variiert [84, 85]. Bedenkt man, dass oftmals im Rahmen von entzündlichen und/oder malignen Grunderkrankung im hohen Patientenalter regenerativer Bedarf besteht, muss dieser Einfluss auf mögliche negative Auswirkungen auf den klinischen Erfolg beachtet und weiterführend analysiert werden. Auch technische Aspekte können zu einer möglichen quantitativen und insbesondere qualitativen Minderung der PRF beitragen: die Verarbeitungszeit, Materialanforderungen an das Entnahmeset und insbesondere optimale Parameter des Zentrifugationsprozesses werden aktuell kontrovers diskutiert [86, 87]. Eine abschließende evidenz-basierte Bewertung zum Umgang den genannten Diskussionspunkten steht aktuell aus.

Aus diesen Unsicherheiten resultieren Bestrebungen, PRF ebenfalls mit Methoden des Tissue Engineerings zu kombinieren, um die nachweislich pro-regenerativen Effekte der PRF trotz o.g. Einschränkungen für eine Prävascularisierung und optimierte hart- und weichgewebliche

Regeneration nutzbar machen zu können. In dieser „Weiterentwicklung“ kann z. B. PRF lyophilisiert und in komplexe, 3D gedruckte Trägermaterialien inkorporiert werden [88]. Erste Untersuchungen zeigen mit dieser Methode beispielsweise bei orthopädischen Fragestellungen eine verbesserte Knorpelregeneration [89]. Auch ist es zukünftig mit der Möglichkeit des biologisch-funktionellen Mehrkomponenten-3-Druck denkbar, Thrombozytenkonzentrate wie PRP oder PRF für die direkte klinische Applikation als zellgeladene, funktionelle Trägermaterialien druckbar zu machen [90]. Erste vielversprechende Ansätze nutzen beispielsweise Spenderplasma als „biologische Tinte“ für diese Form der additiven Fertigung, die in Kombination mit ebenfalls gedruckten Knochenersatzmaterialien *in vitro* erstmals vielversprechende Ergebnisse bei der gesteigerten Knochenneubildung demonstrieren konnten [91].

Zusammenfassend stellen autologe Thrombozytenkonzentrate wie PRF eine mögliche zukunftssträchtige Methode in der regenerativen Chirurgie dar, welche die Gewebsregeneration in der klinischen Translation direkt oder indirekt über Tissue Engineering-Methoden initiieren, steuern und optimieren könnten.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in einer Vergleichsstudie eine mögliche initiale Interaktion von PRF auf Knochenersatzmaterialien unterschiedlicher Herkunft systematisch *in vitro* analysiert und die gewonnenen Erkenntnisse auf einen möglichen Einfluss auf Vitalität, Proliferation und Migration von humanen Osteoblasten und die Gefäßneubildung *in vivo* übertragen.

Es konnte gezeigt werden, dass schon eine Inkubation von fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur ausreicht, um eine Interaktion zwischen Thrombozytenkonzentrat und KEM zu erfassen: alle untersuchten KEM sorgten für einen Abfall der Thrombozytenkonzentration, in Verbindung mit alloplastischem Material sogar für eine statistisch signifikante Reduktion. Da vorhergegangene Studien eine signifikante Korrelation zwischen Abnahme der Thrombozytenkonzentration und ihrer Aggregation und Aktivierung zeigten, kann als ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit die Hypothese vertreten werden, dass die Kombination von PRF mit KEM, insbesondere alloplastischen Ursprungs, schon zu einem frühen, initialen Zeitpunkt zu einer ausgeprägten Interaktion zwischen Thrombozyten und KEM-Oberfläche und konsekutiv zur Thrombozytenaktivierung führt. Dabei waren die untersuchten Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF im Vergleich zur alleinigen PRF geringer exprimiert, im Falle von PDGF statistisch signifikant. Einzig TGF- β zeigte sich tendenziell erhöht. Als mögliche Erklärung der gewonnenen Erkenntnisse kann, gestützt durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse, die eine enge räumliche Beziehung zwischen der jeweiligen KEM mit dem Fibrinnetz der PRF aufwies, eine biophysikalische Interaktion zwischen PRF und KEM angenommen werden, bei der es zunächst zu einer Retention der Wachstumsfaktoren kommt. Diese Hypothese kann auch durch die gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Interaktion zwischen PRF und mit PRF prävascularisierten Biomaterialien und humanen Osteoblasten bestätigt werden: hier zeigte sich initial eine gesteigerte Osteoblastenvitalität, insbesondere in Kombination der PRF mit xenogenen Materialien. Die initiale Freisetzung spezifischer Marker auf Gen- und Proteinebene für die spätere Differenzierung, Proliferation und Migration humaner Osteoblasten wird durch die Co-Inkubation von Osteoblasten und mit PRF prävascularisierten KEM bedeutend beeinflusst. Dadurch kann zunächst ein „osteogener“ Status der Zellen aufrechterhalten werden, der folgend die subsequente ossäre Regeneration zu steigern vermag.

Im Kontext der initialen Interaktion erfolgte die Übertragung dieser Ergebnisse *in vivo* mittels CAM-Assay. Hier konnte erstmals ein signifikanter pro-angiogener Einfluss der PRF in Kombination mit KEM unterschiedlichen Ursprungs auf die Gefäßanzahl sowohl

mikroskopisch als auch immunhistochemisch mittels HE und spezifischer Antikörperfärbung für α SMA, insbesondere für alloplastische und xenogene Materialien, nachgewiesen werden. Dies spiegelt die Hypothese wider, dass es nach dem sukzessiven Abbau des PRF-Fibrinnetzes um die jeweiligen KEM-Partikel durch Proteasen zur kontinuierlichen Freisetzung der analysierten Wachstumsfaktoren kommt, die schlussendlich die Gefäßneubildung und konsekutiv weichgewebliche und ossäre Regeneration signifikant steigern können.

Im Rahmen der genannten Limitationen der Arbeit konnte zusammenfassend PRF als mögliche valide Option zur Prävasikularisierung von Knochenersatzmaterialien eruiert werden, welches sich durch die einfache Herstellung und Handhabung (ohne behördlich-regulative Schwierigkeiten wie häufig bei anderen Tissue Engineering-Methoden) in den klinischen Alltag umsetzen ließe. Eine Empfehlung welches KEM zu bevorzugen sei, lässt sich aus den gewonnenen Daten nicht ableiten. Weiterhin sollten mögliche technische, epidemiologische und immunologische Limitationen dieses Ansatzes in Folgestudien weiterführend analysiert werden.

7. Quellen

1. Turnbull, G., et al., *3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Bioact Mater*, 2018. **3**(3): p. 278-314.
2. Tatullo, M., et al., *Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations*. *Int J Med Sci*, 2012. **9**(10): p. 872-80.
3. Rather, H.A., D. Jhala, and R. Vasita, *Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019. **103**: p. 109761.
4. Bhatt, R.A. and T.D. Rozental, *Bone graft substitutes*. *Hand Clin*, 2012. **28**(4): p. 457-68.
5. Ghanaati, S., et al., *Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence?* *J Oral Implantol*, 2018. **44**(6): p. 471-492.
6. Blatt, S., et al., *Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo*. *Clin Oral Investig*, 2020.
7. Liu, Y., et al., *Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application*. *Biomed Res Int*, 2019. **2019**: p. 3295756.
8. Pripatnanont, P., et al., *The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2013. **41**(8): p. e191-200.
9. Yoon, J.S., S.H. Lee, and H.J. Yoon, *The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2014. **42**(7): p. 1071-7.
10. Miron, R.J., et al., *Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review*. *Clinical Oral Investigations*, 2017. **21**(6): p. 1913-1927.
11. Khalil, G., et al., *Wave front migration of endothelial cells in a bone-implant interface*. *J Biomech*, 2011. **44**(10): p. 1980-6.
12. Blatt, S., et al., *Possible Implications for Improved Osteogenesis? The Combination of Platelet-Rich Fibrin With Different Bone Substitute Materials*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021. **9**(186).

13. Blatt, S., et al., *Does Platelet-Rich Fibrin Enhance the Early Angiogenetic Potential of Different Bone Substitute Materials? An In Vitro and In Vivo Analysis*. Biomedicines, 2021. **9**(1).
14. von Arx, T., et al., *Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible*. Clin Oral Implants Res, 2001. **12**(3): p. 260-9.
15. Giannoudis, P.V., H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: an update*. Injury, 2005. **36 Suppl 3**: p. S20-7.
16. Deev, R.V., et al., *Ordinary and Activated Bone Grafts: Applied Classification and the Main Features*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 365050.
17. Khosropanah, H., et al., *The Impact of Calcium Hydroxide on the Osteoinductive Capacity of Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft: an In-Vitro Study*. J Dent (Shiraz), 2018. **19**(1): p. 19-27.
18. Miron, R.J., et al., *Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts*. Clin Oral Investig, 2016. **20**(8): p. 2259-2265.
19. Hofmann, G.O., C. Falk, and T. Wangemann, *Immunological transformations in the recipient of grafted allogeneic human bone*. Arch Orthop Trauma Surg, 1997. **116**(3): p. 143-50.
20. Asahara, T. and A. Kawamoto, *Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(3): p. C572-9.
21. Djonov, V., O. Baum, and P.H. Burri, *Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 107-17.
22. Yin, S., et al., *Recent Advances in Scaffold Design and Material for Vascularized Tissue-Engineered Bone Regeneration*. Adv Healthc Mater, 2019. **8**(10): p. e1801433.
23. Kusumbe, A.P., S.K. Ramasamy, and R.H. Adams, *Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 323-328.
24. Grosso, A., et al., *It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration*. Front Bioeng Biotechnol, 2017. **5**: p. 68.
25. Ramasamy, S.K., et al., *Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 376-380.
26. Nicosia, R.F., S.V. Nicosia, and M. Smith, *Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1023-9.

27. Ferrara, N. and H.P. Gerber, *The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. Acta Haematol, 2001. **106**(4): p. 148-56.
28. Yao, Q., et al., *Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation*. Blood, 2014. **123**(15): p. 2429-37.
29. Ferrari, G., et al., *Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis*. J Cell Physiol, 2009. **219**(2): p. 449-58.
30. Hinze, M.C., et al., *Bone engineering-vitalisation of alloplastic and allogenic bone grafts by human osteoblast-like cells*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2010. **48**(5): p. 369-73.
31. Piroso, A., et al., *Engineering in-vitro stem cell-based vascularized bone models for drug screening and predictive toxicology*. Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 112.
32. Matras, H., *The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery*. J Oral Maxillofac Surg, 1982. **40**(10): p. 617-22.
33. Ahmed, T.A., E.V. Dare, and M. Hincke, *Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. **14**(2): p. 199-215.
34. Alsousou, J., et al., *The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature*. J Bone Joint Surg Br, 2009. **91**(8): p. 987-96.
35. Knighton, D.R., et al., *Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF)*. Ann Surg, 1986. **204**(3): p. 322-30.
36. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. **85**(6): p. 638-46.
37. Moraes, V.Y., et al., *Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries*. Cochrane Database Syst Rev, 2013(12): p. Cd010071.
38. Weibrich, G., et al., *Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count*. J Craniomaxillofac Surg, 2002. **30**(2): p. 97-102.
39. Anitua, E., et al., *The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields*. Biomaterials, 2007. **28**(31): p. 4551-60.
40. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes*. Curr Pharm Biotechnol, 2012. **13**(7): p. 1131-7.
41. Miron, R.J., et al., *Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review*. Clin Oral Investig, 2017. **21**(6): p. 1913-1927.

42. Fujioka-Kobayashi, M., et al., *Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response*. J Periodontol, 2017. **88**(1): p. 112-121.
43. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(3): p. e37-44.
44. Faot, F., et al., *The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: micro-CT and biomarker results*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 46452.
45. Miron, R.J., et al., *A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation*. J Biomed Mater Res A, 2019. **107**(10): p. 2257-2271.
46. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane*. Platelets, 2018. **29**(2): p. 171-184.
47. Damsaz, M., et al., *Evidence-Based Clinical Efficacy of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Floor Lift, Graft and Surgical Augmentation Procedures*. Front Surg, 2020. **7**: p. 537138.
48. Girish Kumar, N., et al., *To assess the efficacy of socket plug technique using platelet rich fibrin with or without the use of bone substitute in alveolar ridge preservation: a prospective randomised controlled study*. Oral Maxillofac Surg, 2018. **22**(2): p. 135-142.
49. Lekovic, V., et al., *Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects*. J Periodontal Res, 2012. **47**(4): p. 409-17.
50. Strauss, F.-J., et al., *Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies*. Clinical Oral Investigations, 2019.
51. Klein, M.O., et al., *Modulation of platelet activation and initial cytokine release by alloplastic bone substitute materials*. Clin Oral Implants Res, 2010. **21**(3): p. 336-45.
52. Kyyak, S., et al., *Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study*. J Biomater Appl, 2020. **35**(1): p. 83-96.

53. Pabst, A.M., et al., *The influence of geranylgeraniol on human oral keratinocytes after bisphosphonate treatment: An in vitro study*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(5): p. 688-95.
54. Kyyak, S., et al., *Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study*. J Biomater Appl, 2020: p. 885328220914407.
55. Pabst, A.M., et al., *Imaging angiogenesis: perspectives and opportunities in tumour research - a method display*. J Craniomaxillofac Surg, 2014. **42**(6): p. 915-23.
56. Heimes, D., et al., *In Vivo Modulation of Angiogenesis and Immune Response on a Collagen Matrix via Extracorporeal Shockwaves*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
57. Ghanaati, S., et al., *Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts*. J Tissue Eng Regen Med, 2011. **5**(6): p. e136-43.
58. Hu, K. and B.R. Olsen, *The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration*. Bone, 2016. **91**: p. 30-8.
59. Chen, G., C. Deng, and Y.P. Li, *TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(2): p. 272-88.
60. Xie, H., et al., *PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1270-8.
61. Hee Soon, C., et al., *Effect of different bone substitutes on the concentration of growth factors in platelet-rich plasma*. J Biomater Appl, 2008. **22**(6): p. 545-57.
62. Di Summa, F., et al., *TGF β activity released from platelet-rich fibrin adsorbs to titanium surface and collagen membranes*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10203.
63. Castro, A.B., et al., *Characterization of the Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Block: Release of Growth Factors, Cellular Content, and Structure*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2019. **34**(4): p. 855–864.
64. Kammerer, P.W., et al., *Modification of xenogenic bone substitute materials--effects on the early healing cascade in vitro*. Clin Oral Implants Res, 2014. **25**(7): p. 852-8.
65. Steller, D., et al., *Positive impact of Platelet-rich plasma and Platelet-rich fibrin on viability, migration and proliferation of osteoblasts and fibroblasts treated with zoledronic acid*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 8310.
66. Sumida, R., et al., *Platelet-rich fibrin increases the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio in osteoblasts*. Exp Ther Med, 2019. **18**(1): p. 358-365.

67. Wang, X., et al., *Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma*. Platelets, 2018. **29**(1): p. 48-55.
68. Strauss, F.J., et al., *Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies*. Clin Oral Investig, 2020. **24**(2): p. 569-584.
69. Wu, C.L., et al., *Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts*. Aust Dent J, 2012. **57**(2): p. 207-12.
70. Engler-Pinto, A., et al., *Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy*. Clin Oral Implants Res, 2019. **30**(10): p. 962-976.
71. Kargarpour, Z., et al., *Platelet-rich fibrin suppresses in vitro osteoclastogenesis*. J Periodontol, 2020. **91**(3): p. 413-421.
72. Alhasyimi, A.A., et al., *Enhancement of post-orthodontic tooth stability by carbonated hydroxyapatite-incorporated advanced platelet-rich fibrin in rabbits*. Orthod Craniofac Res, 2018. **21**(2): p. 112-118.
73. Fini, M. and R. Giardino, *In vitro and in vivo tests for the biological evaluation of candidate orthopedic materials: Benefits and limits*. J Appl Biomater Biomech, 2003. **1**(3): p. 155-63.
74. Nasirzade, J., et al., *Platelet-rich fibrin elicits an anti-inflammatory response in macrophages in vitro*. J Periodontol, 2020. **91**(2): p. 244-252.
75. Różycka, J., E. Brzóska, and T. Skirecki, *Aspects of pericytes and their potential therapeutic use*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017. **71**(0): p. 186-197.
76. Verbeek, M.M., et al., *Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1*. Am J Pathol, 1994. **144**(2): p. 372-82.
77. Al-Maawi, S., et al., *In vivo Implantation of a Bovine-Derived Collagen Membrane Leads to Changes in the Physiological Cellular Pattern of Wound Healing by the Induction of Multinucleated Giant Cells: An Adverse Reaction?* Front Bioeng Biotechnol, 2018. **6**: p. 104.
78. Nacopoulos, C., et al., *Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft*. J Craniofac Surg, 2014. **25**(6): p. 2164-8.
79. Goyal, L., N. Gupta, and N.D. Gupta, *Autologous platelet-rich derivatives along with alloplastic bone substitute in the management of complex perio-endo cases*. J Indian Soc Periodontol, 2020. **24**(2): p. 182-185.

80. Goyal, L., *Clinical effectiveness of combining platelet rich fibrin with alloplastic bone substitute for the management of combined endodontic periodontal lesion*. Restor Dent Endod, 2014. **39**(1): p. 51-5.
81. Shivashankar, V.Y., et al., *Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion*. J Conserv Dent, 2013. **16**(3): p. 261-4.
82. Rani, N., et al., *Evaluation of the relative efficacy of autologous platelet-rich fibrin membrane in combination with β -tricalcium phosphate (Septodont- resorbable tissue replacement)TM alloplast versus β -TCP alloplast alone in the treatment of grade II furcation defects*. Natl J Maxillofac Surg, 2018. **9**(2): p. 196-204.
83. Joshi, A.A., A.M. Padhye, and H.S. Gupta, *Platelet derived growth factor-BB levels in gingival crevicular fluid of localized intrabony defect sites treated with platelet rich fibrin membrane or collagen membrane containing recombinant human platelet derived growth factor-BB: A randomized clinical and biochemical study*. J Periodontol, 2019. **90**(7): p. 701-708.
84. Mamajiwala, A.S., et al., *Impact of different platelet-rich fibrin (PRF) procurement methods on the platelet count, antimicrobial efficacy, and fibrin network pattern in different age groups: an in vitro study*. Clin Oral Investig, 2020. **24**(5): p. 1663-1675.
85. Miron, R.J., et al., *The effect of age, gender, and time between blood draw and start of centrifugation on the size outcomes of platelet-rich fibrin (PRF) membranes*. Clin Oral Investig, 2019. **23**(5): p. 2179-2185.
86. Kargarpour, Z., et al., *Relative Centrifugal Force (RCF; G-Force) Affects the Distribution of TGF- β in PRF Membranes Produced Using Horizontal Centrifugation*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
87. Tsujino, T., et al., *Striking Differences in Platelet Distribution between Advanced-Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factors: Effects of Silica-Containing Plastic Tubes*. J Funct Biomater, 2019. **10**(3).
88. Song, Y., et al., *Nano-biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol composites with enhanced bioactivity for bone repair via low-temperature three-dimensional printing and loading with platelet-rich fibrin*. Int J Nanomedicine, 2018. **13**: p. 505-523.
89. Ahmed, T.A., et al., *Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(3-4): p. 323-35.

-
90. L, T.S., et al., *Formulation and Characterization of Alginate Dialdehyde, Gelatin, and Platelet-Rich Plasma-Based Bioink for Bioprinting Applications*. *Bioengineering (Basel)*, 2020. **7**(3).
 91. Ahlfeld, T., et al., *A Novel Plasma-Based Bioink Stimulates Cell Proliferation and Differentiation in Bioprinted, Mineralized Constructs*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020. **12**(11): p. 12557-12572.

7. Danksagung

Vielen Personen darf ich für die Unterstützung zur Umsetzung dieser Arbeit von Herzen dankbar sein.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Familie - Ihr seid das Wichtigste!

8. Lebenslauf