

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

Analyse des Wachstumsfaktorenrelease von i-PRF, A-PRF+ Exsudat und Serum
– eine in-vitro Untersuchung

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

Vorgelegt von

Christopher Boos
aus Worms

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG / ZIEL DER DISSERTATION	3
2. LITERATURDISKUSSION	4
2.1 Grundlagen der Wundheilung	4
2.1.1 Phasen der Wundheilung	4
2.1.2 Formen der Wundheilung	6
2.1.3 Wundheilung im Knochendefekt	6
2.2 Blutblättchen (Thrombozyten) und ihre Rolle bei Gewebeschaden	7
2.2.1 Thrombozyten und die Hämostase	8
2.2.2 Thrombozyten und das Immunsystem	9
2.2.3 Thrombozyten und die Geweberegeneration	10
2.2.4 Thrombozyten und ihre Wachstumsfaktoren – eine Übersicht	11
2.3 Blutblättchen-reiche Konzentrate	18
2.3.1 Historische Entwicklung	18
2.3.2 Platelet-rich Plasma	20
2.3.3 Platelet-rich Fibrin	22
3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 Material	29
3.1.1 Arbeitsgeräte	29
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel	30
3.1.3 Chemikalien und Substanzen	31
3.2 Methoden	31
3.2.1 Blutentnahme	31
3.2.2 Gewinnung von Serum	32
3.2.3 Herstellung und Gewinnung von i-PRF	33
3.2.4 Herstellung von A-PRF+ und Gewinnung von A-PRF+ Exsudat	35
3.2.5 Inkubation von A-PRF+ Membranen in Medium und Gewinnung des Überstandes	37
3.2.6 Nachweis von Wachstumsfaktoren mittels Sandwich-ELISA	38
3.2.7 Eingangsversuch zur Festlegung der Verdünnung	42
3.2.8 Nachweis von PDGF-BB	43
3.2.9 Nachweis von VEGF	44

3.2.10 Nachweis von GDF-15	45
4. ERGEBNISSE	46
4.1 Wachstumsfaktoren in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum	46
4.1.1 PDGF-BB in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum	46
4.1.2 VEGF in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum	47
4.1.3 GDF-15 in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum	49
4.2 Freigesetzte Wachstumsfaktoren durch A-PRF+ Membranen nach 24 h, 48 h, 72 h (2 ml Versuch)	50
4.2.1 PDGF-BB Freisetzung (2 ml Versuch)	50
4.2.2 VEGF Freisetzung (2 ml Versuch)	52
4.2.3 GDF-15 Freisetzung (2 ml Versuch)	53
4.3 Freigesetzte Wachstumsfaktoren durch A-PRF+ Membranen nach 24 h, 48 h, 72 h (6 ml Versuch)	54
4.3.1 PDGF-BB Freisetzung (6 ml Versuch)	54
4.3.2 VEGF Freisetzung (6 ml Versuch)	56
4.3.3 GDF-15 Freisetzung (6 ml Versuch)	57
5. DISKUSSION	59
5.1 Wachstumsfaktoren in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum	59
5.2 Freigesetzte Wachstumsfaktoren durch A-PRF+ Membranen nach 24 h, 48 h, 72 h	65
5.2.1 2 ml Versuch	65
5.2.2 6 ml Versuch	68
6. ZUSAMMENFASSUNG	73
7. LITERATURVERZEICHNIS	75
LEBENS LAUF	83

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A-PRF	advanced platelet-rich fibrin
A-PRF+	advanced platelet-rich fibrin plus
ADP	Adenosindiphosphat
Adj Result	adjusted result, bereinigtes Ergebnis
Aquadest	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Back Calc Conc	back calculated concentration, zurückgerechnete Konzentration
BC	Buffy-Coat
CCL5	CC-chemokine ligand 5
Conc	concentration, Konzentration
CV	coefficient of variation, Variationskoeffizient
CXCL4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
CXCL7	chemokine (C-X-C motif) ligand 7
cm	Zentimeter
Dilution	Verdünnung
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
EGF	epidermal growth factor
FDBA	freeze-dried bone allograft
FGF	fibroblast growth factor
GDF- 15	growth differentiation factor 15
GF	growth factor
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9.81 \text{ m/s}^2$)
gl.	glatte
HRP	horseradish peroxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IGF	insulin-like growth factor
i-PRF	injectable platelet-rich fibrin
IL	Interleukin
L-PRF	leukocyte- and platelet-rich fibrin
LSCC	low speed centrifugation concept
M, Mean	mean, Mittelwert
Mean Result	mittleres Ergebnis
mg	Milligramm

min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NAP-2	neutrophil-activating peptide 2
ng	Nanogramm
NRP	Neuropilin
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PF4	platelet factor 4; Plättchenfaktor 4
pg	Pikogramm
PIGF	placental growth factor
PPP	platelet-poor plasma
PRF	platelet-rich fibrin
PRP	platelet-rich plasma
PSGL	P-selectin glycoprotein ligand
RD	Reagent Diluent
RCF	relative centrifugal force
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RTK	receptor tyrosine kinase
Sample	Probe
SD	standard deviation, Standardabweichung
S-PRF	standard platelet-rich fibrin
svVEGF	snake venom vascular endothelial growth factor
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	tumor necrosis factor- alpha
Value	Wert
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VPF	vascular permeability factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
Wdh.	Wiederholung
WF	Wachstumsfaktor(en)

1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Das Ziel jeglicher Wundheilung, ob nach einer Verletzung oder nach einem operativen Eingriff, ist die möglichst optimale Wiederherstellung des Gewebes (1, 2). Neben regenerativen Zellen nehmen dabei Wachstumsfaktoren eine zentrale koordinative Rolle ein. Durch die zusätzliche Anreicherung des Wundgebietes mit diesen heilungsfördernden Zellen und Mediatoren versucht man die Reparaturvorgänge zu verbessern und zu beschleunigen (3, 4). Durch das Zentrifugieren von Blut ist die Konzentrierung von Thrombozyten, die als Hauptquelle von Wachstumsfaktoren während der initialen Wundheilung bekannt sind, möglich (5). Auch wenn unterschiedliche Thrombozytenkonzentrate bereits seit Jahrzehnten in verschiedenen Formen im klinischen Alltag eingesetzt werden und ihre Wirksamkeit bereits in zahlreichen Untersuchungen unter Beweis gestellt haben, ist deren Optimierung nach wie vor Bestandteil aktueller Forschungen. Neben Verbesserungen der Biokompatibilität und Vereinfachung der Herstellungsprotokolle liegt dabei außerdem ein Hauptmerkmal auf der Veränderung der zellulären und molekularen Struktur und Zusammensetzung (6, 7). Durch Weiterentwicklung des Zentrifugationsprotokolls und Veränderung der Blutentnahmeröhrchen des von *Joseph Choukroun* entwickelten autologen PRF (platelet-rich fibrin) gelang die Schaffung zweier neuer PRF-Derivate:

Das „fortgeschrittene“ A-PRF+ (advanced PRF) hebt sich laut seiner Entwickler gegenüber dem klassischen PRF durch seine günstigere Fibrinstruktur sowie seine höhere Anzahl und gleichmäßigere Verteilung enthaltener Leukozyten ab, die neben Thrombozyten die fundamentalen Zellen während der Geweberegeneration sind.

Die Herstellung von i-PRF ermöglicht erstmals die Verwendung von flüssigem PRF, das erst zeitversetzt zu einer gallertigen Masse koaguliert (8-10).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des neuen A-PRF+ auf dessen Freisetzung von Wachstumsfaktoren über den Zeitraum von drei Tagen. Des Weiteren werden in i-PRF enthaltene Wachstumsfaktoren gemessen und mit der in Blutserum und in A-PRF+ Exsudat enthaltenen Menge verglichen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Grundlagen der Wundheilung

Der Begriff Wunde ist definiert als eine mit Schädigung und Verlust einhergehende Kontinuitätsunterbrechung von Gewebe (2). Je nach Art der Entstehungsursache wird zwischen traumatischen, chronischen und iatrogenen Wunden unterschieden (11). Die Befähigung zur Wundheilung, also einer regenerativen oder reparativen Wiederherstellung von Gewebsdefekten, ist ein unerlässliches Instrument des Organismus für dessen Lebenserhaltung (1). Zur völlig identischen Regeneration und Herstellung des Ausgangszustandes sind jedoch nur wenige Zellarten (z. B. Epithel, Blut, Knochen) in der Lage. Meist erfolgt der Verschluss und Ersatz des Defektes im Sinne einer Reparatation unter Ausbildung einer Narbe (12).

2.1.1 Phasen der Wundheilung

Auch wenn sich die molekularen Vorgänge der Wundheilung von Gewebe zu Gewebe leicht unterscheiden, unterliegen sie dennoch ähnlichen pathophysiologischen Heilungsvorgängen, die traditionell in vier Wundheilungsphasen eingeteilt werden:

- exsudative Phase
- resorptive Phase
- proliferative Phase
- reparative Phase

Diese scharfe Abgrenzung erfolgt allerdings mehr aus didaktischen Gründen, da in Wirklichkeit eher ein dynamischer Wechsel und überlappender Übergang der einzelnen Prozesse stattfindet.

Als direkte Folge einer Verletzung liegen eröffnete Blut- und Lymphgefäße vor und es kommt zu einem Auffüllen der Gewebelücke mit Wundsekret. Während der anschließenden Gerinnung kontrahieren die Gefäße für etwa 10 Minuten und aus den Thrombozyten und Fibrin bildet sich im thrombokinasereichen (Faktor X) Milieu der Wunde ein hämostatisches Blutkoagulum. Ausgelöst durch lokale Entzündungsmediatoren wird die anfängliche Vasokonstriktion durch eine Dilatation abgelöst, was zu einer Verlangsamung des Blutstroms und einem Austritt von serösem Exsudat ins Wundbett führt. Dieses namensgebende Exsudat der **exsudativen Phase** ist reich an Immunglobulinen, Leukozyten und Thrombozyten, welche Wachstumsfaktoren und andere

chemotaktisch wirkende Zytokine sezernieren, die wiederum weitere für den Heilungsprozess notwendige Entzündungs- und Reparaturzellen anlocken (1). Die sich nach etwa sechs Stunden anschließende **resorptive Phase** ist geprägt durch das Einwandern von neutrophilen Granulozyten. Die Hauptaufgabe dieser Mikroorganismen besteht in der Opsonisierung, Abtötung und Phagozytose zellulärer Erreger und Bakterien. Nach ca. zwölf Stunden infiltrieren weitere Lymphozyten und Makrophagen in das Wundgebiet und unterstützen die Wundreinigung und Infektbekämpfung durch Abbau und Phagozytose abgestorbener Zelldebris, Fibrinreste und Gewebdetritus. Auch in dieser Phase werden stimulierende und modulierende Wachstumsfaktoren freigesetzt. Mit dem dritten Tag beginnt in der **proliferativen Phase** der Abbau des vorhandenen Fibrinnetzes und das Ersetzen und Auffüllen des Gewebedefektes mit Granulationsgewebe. Die sich im Wundareal befindlichen Leukozyten, Bindegewebszellen und Thrombozyten sezernieren zahlreiche verschiedene Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, VEGF, FGF und TGF- β , wodurch es zur Einwanderung, Differenzierung und Proliferation zirkulierender Zellen und Stammzellen wie Angioblasten, Fibroblasten und Keratinozyten kommt. Neben der Neubildung von Kapillaren (**Vaskulogenese**) findet außerdem eine Einsprossung aus angrenzenden Kapillaren statt (**Angiogenese**). Die Vaskularisationsdichte ist dabei entscheidend für eine ungestörte Wundheilung und den Infektionsschutz tiefer liegender Gewebeschichten. Während der abschließenden **reparativen Phase** reifen die neu gebildeten Kollagenfasern aus und unter ausgeglichener Beteiligung von Matrixmetalloproteinasen sowie deren Inhibitoren (Tissue inhibitors of metalloproteinases) erfolgt ein Umbau der extrazellulären Matrix entsprechend der aktuellen Anforderungen. Abgesehen von der Reparatur des Bindegewebes beginnt etwa drei Tage nach der Verletzung die Epithelialisierung des Defektes. Unter Einfluss von PDGF sowie aus Leukozyten und Fibroblasten stammenden Enzymen kommt es zu einem Lösen der interzellulären Verbindungen (Desmosomen) im Bereich der basalen Hautschicht. Die gelösten Zellen wandern anschließend amöboid von den Wundrändern in Richtung Wundmitte und proliferieren EGF vermittelt so lange, bis der Defekt vollständig epithelialisiert ist und sich die Zellen gegenseitig per Zellkontakt inhibieren. Abschließend erfolgt während der epithelialen Rückbildungsphase eine Anordnung der Epithelzellen und eine Rückbildung zur normalen Schichtdicke (2, 13).

2.1.2 Formen der Wundheilung

Klassisch unterscheidet man bei der Wundheilung dem klinischen Bild entsprechend zwischen primärer und sekundärer Wundheilung. Beide Formen unterscheiden sich zwar nicht im grundlegenden Ablauf der Heilungsvorgänge, wohl aber in dessen Zeitdauer und Quantität der einzelnen Zellreaktionen.

Eine **primäre Wundheilung** (*sanatio per primam intentionem*) erfolgt bei glatten, nah aneinander liegenden Wundrändern ohne Gewebsverluste, wie sie beispielsweise nach einem Schnitt mit dem Skalpell vorliegen. Im Regelfall werden die Phasen der Wundheilung hierbei sehr schnell durchlaufen, da nur ein feiner Wundspalt vorliegt und sich nur eine dünne Narbe ausbildet, sodass teilweise sogar eine *restitutio ad integrum* (Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands) erreicht wird.

Dem gegenüber erfolgt bei Verletzungen mit Substanzdefekten und auseinanderklaffenden Wundrändern eine **sekundäre Wundheilung** (*sanatio per secundam intentionem*). Als grundlegender Unterschied zur primären Wundheilung liegt hier eine offene Wundfläche vor, die anfälliger für Infektionen, Wundheilungsstörungen und Chronifizierung ist. Vor allem die proliferative Phase ist bei dieser Form sehr ausgeprägt, da der Gewebsdefekt mit viel Granulationsgewebe aufgefüllt werden muss und erst anschließend eine Epithelialisierung erfolgen kann. Die entstehende Narbe ist wesentlich ausgeprägter als bei einer primären Wundheilung, wodurch mit funktionellen und optischen Beeinträchtigungen zu rechnen ist.

Lediglich bei oberflächlichen Hautverletzungen, die rein auf die Epidermis begrenzt sind, ist von einer regenerativen Wundheilung auszugehen. Diese Sonderform, die als **epitheliale Wundheilung** unter Schorf bezeichnet wird, kann ohne Narbe abheilen (2, 12).

2.1.3 Wundheilung im Knochendefekt

Knochengewebe zählt zu den wenigen Gewebearten, die nach einem Defekt zu einer regenerativen Wiederherstellung des Ausgangszustandes fähig sind. Abhängig von der Größe des Defektes und dem Abstand der Fragmente zueinander wird auch hier zwischen einer primären und sekundären Knochenheilung unterschieden.

Voraussetzung zur **primären Knochenheilung** (Kontaktheilung und Spaltheilung) ist die genaue Adaption der Knochenkanten, die stabile Fixierung und eine ausreichende Blutversorgung (12). Bei der Kontaktheilung liegen die durchtrennten Knochenteile direkt aneinander. Der Heilungsprozess entspricht dabei dem „normalen“ Knochenum-

bau („bone remodeling“) und Zusammenspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. Senkrecht zum Bruchspalt wachsen Blutgefäße aus den eröffneten Havers-Kanälen ein, an deren Spitze sich Osteoklasten befinden, die Kanäle zwischen den beiden Frakturrenden bilden. Folgende Osteoblasten füllen die geschaffenen Resorptionskanäle mit Osteoid und Lamellenknochen auf und bilden neue Osteone, die den Bruchspalt durchwachsen.

Liegt zwischen den beiden Knochenkanten ein schmaler Frakturspalt von weniger als 0,5 mm vor, erfolgt die Regeneration im Sinne einer zweiphasigen Spaltheilung. Induziert durch Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β wachsen ausgehend vom Periost und Markraum her Mesenchymzellen ein, die unstrukturierten Geflechtknochen bilden. Dieser wird in den folgenden Wochen in Lamellenknochen umgebaut (13, 14).

Befindet sich ein größerer Abstand zwischen den Knochenenden heilt der Defekt sekundär (**sekundäre Wundheilung**), wobei die beiden Fragmente initial über einen bindegewebigen Kallus stabilisiert und verbunden werden und die Ossifizierung erst zeitweilig erfolgt. Entsprechend den klassischen Phasen der Wundheilung folgt auf die anfängliche Einblutung und Hämatombildung eine Entzündungsphase, in der Immunzellen einwandern und nekrotische Gewebereste abgebaut werden. Ab dem dritten Tag beginnt die ca. dreiwöchige Granulationsphase. Gesteuert durch Wachstumsfaktoren kommt es dabei zur Einsprossung und Neubildung von Kapillaren, sowie zur Differenzierung und Proliferation ortsständiger Fibroblasten und Osteoblasten. Es entsteht ein bindegewebiger Kallus. Unter Einfluss von Wachstumsfaktoren produzieren Osteoblasten das organische Osteoid, das durch Einlagerungen von Kalzium- und Magnesiumsalzen mineralisiert. Der Kallus verhärtet sich zunehmend und es bildet sich unstrukturierter Geflechtknochen. In den folgenden Monaten wird durch abwechselnde Auf- und Abbauprozesse der Osteoblasten und Osteoklasten die ursprüngliche Knochenstruktur wiederhergestellt (12-14).

2.2 Blutplättchen (Thrombozyten) und ihre Rolle bei Gewebeschaden

Thrombozyten sind kernlose 2 - 4 μm große zytoplasmatische Abschnürungen der knochenmarkständigen Megakaryozyten. Mit einer Lebensdauer von 7 - 10 Tagen zirkulieren durchschnittlich 150.000 bis 450.000 Thrombozyten in einem Mikroliter Blut.

Blutplättchen sind keine klassischen Zellen und aufgrund der Abwesenheit eines Zellkerns nur eingeschränkt, über verbliebene mRNA aus den Megakaryozyten, in der Lage neue Proteine zu synthetisieren (15, 16).

Obwohl Thrombozyten erstmals bereits 1882 von *Bizzozero* beschrieben wurden, sprach man ihnen jahrzehntelang lediglich die Beteiligung an der Hämostase zu (17). Heute ist bekannt, dass Blutplättchen darüber hinaus noch an weiteren, vor allem regenerativen Prozessen wie der Wundheilung, Angiogenese, aber auch an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Thrombozyten enthalten verschiedene Speichergranula (α -Granula, dichten Granula und Lysosomen), gefüllt mit unterschiedlichen Biomolekülen, über deren Freisetzung aktivierte Blutplättchen regulatorischen Einfluss auf andere Zellen nehmen (18).

2.2.1 Thrombozyten und die Hämostase

Im physiologischen Normalzustand zirkulieren die diskoiden Blutplättchen frei in der Blutbahn. Als Folge einer Störung der Integrität der Gefäßwand (z. B. bei einer Verletzung oder Entzündung) kommen die Thrombozyten in Kontakt mit freiliegendem Kollagen und bleiben, verknüpft durch den vWF (von-Willebrand-Faktor), an den subendothelialen Bindegewebsfasern der Läsionsränder haften. Durch diese initiale Adhäsion vermittelt, kommt es zu einer intrazellulären Kalziumfreisetzung aus den dichten Granula, was eine Aktivierung und Formveränderung (Ausbildung von Pseudopodien) der Blutplättchen verursacht. Diese adhären, aktivierten Thrombozyten bilden Thromboxan A₂ (aus Arachidonsäure) und sezernieren außerdem ihre Granulainhaltsstoffe in die Blutbahn. Die freigesetzten Mediatoren (v. a. Serotonin, Thromboxan A₂, Thrombin und ADP) lösen eine kaskadenartige Aktivierung und Formveränderung weiterer noch freier zirkulierender Thrombozyten aus, die daraufhin über „Fibrinogenbrücken“ miteinander verkleben (Aggregation, über Glycoprotein IIb/IIIa), einen weißen Thrombus bilden und ebenfalls ihre Speichergranula sezernieren. Darüber hinaus verursachen Thromboxan A₂ und Serotonin eine Vasokonstriktion im Wundgebiet, was zu einer Verlangsamung des Blutflusses führt (16, 19).

Auch an der anschließenden sekundären Hämostase, bei der die Bildung von Thrombin und einem durch ein Fibrinnetz stabilisierten Thrombus im Mittelpunkt steht, nehmen die Blutplättchen eine zentrale Rolle ein. Zum einen ist die aktivierte Plättchenoberfläche und ihr exprimierter Plättchenfaktor 3 an der Aktivierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren beteiligt. Zum anderen steuern die Thrombozyten selbst essentielle

Faktoren der Gerinnungskaskade aus ihren Granula bei (Gerinnungsfaktor V, VIII, XIII, Kalzium, Prothrombin, Fibrinogen, u. a.) (16, 19, 20).

Während die sezernierten Moleküle der dichten Granula (ADP, ATP, Serotonin, Kalzium, u. a.) primär eine Schlüsselrolle während der Hämostase einnehmen, übernehmen die in den α -Granula gespeicherten Stoffe darüber hinaus regulatorische Funktionen der folgenden Heilungsphasen.

Dichte Granula	α-Granula	Lysosomen
<ul style="list-style-type: none"> - ATP - ADP - Kalzium - Serotonin - anorganisches Phosphat 	<ul style="list-style-type: none"> - von-Willebrand-Faktor - Faktoren V, VIII, XI, XIII - Thrombospondin - Fibrinogen - Prothrombin - α2-Antiplasmin - Antiheparin - P-selectin - CXCL4 (= PF4) - CXCL7 - CCL5 (= RANTES) - IL-1, IL-6, IL-8 - Glycoprotein IIb/IIIa - Wachstumsfaktoren 	<ul style="list-style-type: none"> - saure Hydrolasen

Tabelle 1: Inhalte der Thrombozytengranula (eine Zusammenstellung der in der Arbeit erwähnten).

2.2.2 Thrombozyten und das Immunsystem

Nachdem die anfängliche Blutung durch einen stabilen Fibrinthrombus gestoppt ist, wandern während der exsudativen und resorptiven Phase der Wundheilung Immunzellen in das Wundgebiet ein (13). Die im Blut frei zirkulierenden oder gewebeständigen Leukozyten werden durch Chemo- und Zytokine (PF4, Tissue factor, Interleukine, CCL5, u. a.) der defektgebunden Thrombozyten angelockt, festgehalten und zur Differenzierung angeregt (20).

Ähnlich wie bei der Leukodiapedese zwischen Immun- und Endothelzellen erfolgt die Kontaktaufnahme (Rolling) zwischen Thrombozyten und Leukozyten über P-selectin, einem Zellanhänsionsmolekül, das bei der Blättchenaktivierung aus den α -Granula in die Zellmembran eingebaut wird und sich mit dem P-selectin glycoprotein ligand (PSGL) der Leukozyten locker verbindet. Diese Verknüpfung löst eine Aktivierung der gebundenen Leukozyten aus und die schwache Fixierung wird durch zusätzliche Verbindungen zwischen Integrinen (α M β 2 der Leukozyten) und Liganden (GPIb der

Thrombozyten, Fibrinogen) verfestigt. Darüber hinaus sezernieren die aktivierten Leukozyten Botenstoffe, die ihrerseits weitere Immunzellen anlocken, die über L-selectin fixiert werden (18). Um von der Thrombusperipherie zum Zentrum der Gewebeschädigung zu gelangen, folgen die Immunzellen einem chemotaktischen Gradienten, der von den Thrombozyten erzeugt wird. Neuen Erkenntnissen zufolge wird dieser über die Freisetzung von NAP-2 (CXCL-7), einem Molekül aus den α -Granula, aufgebaut (21).

Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht ganz verstanden sind, deutet außerdem vieles darauf hin, dass Thrombozyten neben ihrer koordinativen auch noch eine wesentlich aktivere Rolle bei der Immunabwehr gegen Pilze, Viren und Bakterien einnehmen. Zum einen sind sie über Rezeptoren (u. a. verschiedene Toll-like receptors) selbst in der Lage Pathogene zu erkennen und zu verinnerlichen (ähnlich einer Phagozytose) und zum anderen sezernieren sie Zytokine (CXCL4, CXCL7, CCL5), die neben dem chemotaktischen auch einen direkten antimikrobiologischen Effekt haben (20, 22).

2.2.3 Thrombozyten und die Geweberegeneration

Ziel nach jeder Gewebeschädigung ist die Auffüllung des Defektes und die möglichst identische Wiederherstellung des Ausgangszustandes. Das vorhandene Fibrinnetz wird hierfür im Rahmen der Fibrinolyse durch Plasmin aufgelöst und durch gefäß- und faserreiche Matrix ersetzt (2). Neben ihrer zentralen Rolle bei der Gerinnung und Thrombusbildung sind Blutplättchen außerdem an der Fibrinolyse, also dessen Auflösung, beteiligt. Über die in ihren α -Granula enthaltenen Substanzen können sie diesen Vorgang sowohl positiv (fibrinolytisch: Plasmin, Plasminogen) als auch negativ (antifibrinolytisch: Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) and α 2-Antiplasmin) beeinflussen (23).

An der abschließenden proliferativen und reparativen Phase sind eine Vielzahl von Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Keratinozyten, Thrombozyten, u. a.) beteiligt. Deren koordinierte Migration, Infiltration, Proliferation und Differenzierung erfordert ein kompliziertes Netzwerk aus Signalstoffen wie Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Thrombozyten dienen hierbei als Quelle von über 60 verschiedenen biologisch aktiven Substanzen. Vor allem die in den α -Granula enthaltenen Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β , VEGF und EGF übernehmen eine zentrale Schlüsselrolle (5, 24).

2.2.4 Thrombozyten und ihre Wachstumsfaktoren – eine Übersicht

Wachstumsfaktoren sind ursprünglich definiert als Proteine, die ruhende Zellen zur Mitose und Zellteilung anregen. Sie werden zu verschiedenen Zeitpunkten von unterschiedlichen Zelltypen, die an Umbauprozessen beteiligt sind, sezerniert. Je nach Wirkungsort unterscheidet man zwischen autokriner (auf die produzierende Zelle), parakriner (auf angrenzende Zellen) und endokriner (auf weit entfernte Zellen) Stimulation. Alle Peptide wirken dabei über eine spezifische Bindung an hoch affinen Membranrezeptoren der Zielzellen. Klassisch werden fünf verschiedene Wachstumsfaktor-Familien mit zahlreichen Untergruppen unterschieden, die an reparativen und regenerativen Prozessen beteiligt sind: EGF, TGF- β , IGF, PDGF und FGF (25, 26).

Bei der Wundheilung sind Thrombozyten die ersten Zellen, die Wachstumsfaktoren aus ihren α -Granula freisetzen. Im zeitlichen Verlauf der anschließenden Umbauprozesse kommen immer mehr andere Zellarten wie Entzündungszellen, Fibroblasten und Epithelzellen hinzu, die ebenfalls WF absondern. Die dadurch entstehenden, phasenabhängigen Konzentrationsunterschiede der WF, bewirken einen strukturierten Vorgang der Geweberegeneration (27).

Wachstumsfaktoren	Funktion bei der Geweberegeneration
EGF (epidermal growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - chemotaktisch für Fibroblasten und Epithelzellen - mitogen für Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten - stimuliert Proliferation von Epithelzellen, Fibroblasten und embryogenetischen Zellen (\rightarrow Reepithelisierung, Angiogenese, Extrazelluläre Matrix)
TGF-β (transforming growth factor beta)	<ul style="list-style-type: none"> - chemotaktisch für Makrophagen u. Fibroblasten - mitogen für Fibroblasten, gl. Muskelzellen, Osteoblasten - stimuliert und kontrolliert Proliferation v. Fibroblasten u. Kollagensynthese - reduziert Narbenbildung (v. a. TGF-β3), stimuliert Wundkontraktion - antagonisiert biologische Aktivität von EGF, PDGF, FGF
FGF (fibroblast growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - mitogen für Keratinozyten, Fibroblasten, Gefäßendothelzellen - beteiligt an Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Zellmigration, Reepithelisierung
IGF (insulin like growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - stimuliert Fibroblasten zur Mitose und Kollagensynthese - chemotaktisch für Endothelzellen (Angiogenese) - stimuliert Proliferation von Knochenzellen, Knorpelzellen, Myoblasten und hämatopoetischen Zellen - unterstützt mit PDGF die Knochenregeneration
PDGF	s. u.
VEGF	s. u.

Tabelle 2: Auswahl thrombozytärer Wachstumsfaktoren mit der jeweiligen Funktion bei der Geweberegeneration (Info: Auch andere Zelle produzieren diese WF) (5, 24, 28).

Im Folgenden werden die im Versuchsteil (3.2.) nachgewiesenen Wachstumsfaktoren **PDGF**, **VEGF** und **GDF-15** vorgestellt.

PDGF – Platelet derived growth factor

Die ersten Zellen, in denen von *Ross et al.* (1974) der mitotisch wirksame Wachstumsfaktor PDGF nachgewiesen wurde, waren Thrombozyten, was folglich zu dessen Namensgebung führte (29). Heute ist bekannt, dass der WF auch noch von zahlreichen anderen Zellen wie Makrophagen, Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert wird. Darüber hinaus sind auch manche Tumorzellen in der Lage PDGF zu bilden. Nach aktuellem Stand existieren vier unterschiedliche PDGF Proteine (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D), die durch vier Gene auf vier verschiedenen Chromosomen (Chromosomen 4, 7, 11, 22) kodiert werden. Freigesetzt wird der Wachstumsfaktor als Homodimer (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD) oder Heterodimer (PDGF-AB), wobei die beiden Peptidketten über Disulfidbrücken verknüpft sind (30, 31).

Es existieren zwei komplementäre Zellmembranrezeptoren (PDGFR- α und PDGFR- β), die zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTK) zählen. In der Membran der Zielzellen bilden jeweils zwei Rezeptoren einen funktionsfähigen Rezeptorkomplex, wodurch entweder die Homodimere (PDGFR- α/α , PDGFR- β/β) oder das Heterodimer (PDGFR- α/β) entstehen. Die fünf unterschiedlichen PDGF Dimere binden unterschiedlich an die Rezeptoren (31, 32):

Wachstumsfaktor	Rezeptoren		
PDGF-AA	PDGFR- α/α		
PDGF-BB	PDGFR- α/α	PDGFR- β/β	PDGFR- α/β
PDGF-CC	PDGFR- α/α		(PDGFR- α/β) ¹
PDGF-DD		PDGFR- β/β	(PDGFR- α/β) ¹
PDGF-AB	PDGFR- α/α		PDGFR- α/β

Tabelle 3: Die unterschiedlichen PDGF Dimere mit entsprechenden Rezeptoren an die sie binden (31).
¹ = geringe Evidenz

Die klassischen A und B Peptide, die bereits seit den 80er Jahren bekannt sind, werden im Endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat gebildet, modifiziert und in aktivierter Form per Exozytose sezerniert. Die „jüngeren“, erst um die Jahrtausendwende entdeckten PDGF-C und PDGF-D werden erst nach der Freisetzung extrazellulär proteolytisch aktiviert (31).

PDGFs spielen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und Organentwicklung. Darüber hinaus stehen pathologisch erhöhte Werte im Zusammenhang mit zahlreichen Krankheiten wie Arteriosklerose, Leber-, Lungen- und Herzfibrosen (33).

In Bezug auf die Wundheilung übernimmt PDGF unterschiedliche Funktionen. Zum einen wirkt es mitogen und chemotaktisch auf Makrophagen, Granulozyten und Fibroblasten. Zum anderen hat es einen proliferativen Effekt auf Fibroblasten, die ECM bilden, und fördert die Angiogenese, Gefäßreifung sowie die Reepithelisation (über Hochregulierung von IGF-1). Auch wenn der direkte angiogenetische Effekt von PDGF geringer ist als der von VEGF, ist PDGF in Kombination mit Hypoxie der zentrale Auslöser für eine gesteigerte VEGF Freisetzung und damit für die Gefäßbildung von grundlegender Bedeutung (4, 24, 28). Der klinische Einsatz von rekombinantem, also gentechnisch hergestelltem PDGF-BB, wurde bereits 1992 von *Robson et al.* beschrieben. Sie konnten positive Effekte bei der Heilung chronischer Druckulcera feststellen (34). In Form eines Hydrogels wurde der Wirkstoff Becaplermin (Handelsname REGRANEX®, ein rekombinanter Wachstumsfaktor rhPDGF-BB) 1997 zur Therapie neuropathischer, chronischer, Diabetes bedingter Ulcera der unteren Extremitäten von der FDA zugelassen (32, 35). Per Rote-Hand-Brief wurde im März 2010 bekannt gegeben, dass bei Patienten die drei oder mehr Tuben REGRANEX® angewandt hatten, die Tumormortalität anstieg und der Einsatz des Gels bei Patienten mit einer bekannten malignen Erkrankung kontraindiziert sei (36). Im Bereich der ZMK-Heilkunde wurde die Verwendung von rhPDGF-BB intensiv im Bereich der Parodontologie untersucht. In zahlreichen Studien konnte durch lokale Anreicherung mit PDGF-BB eine Verbesserung der Regeneration parodontaler Hart- und Weichgewebsdefekte mit klinischem Attachmentgewinn erzielt werden (37).

Die potentielle Kanzerogenität von rekombinantem PDGF-BB (rh-PDGF-BB, Becaplermin) konnte in neueren Studien nicht bestätigt werden. Gerade in Verbindung mit Knochentransplantaten wird das PDGF-BB schnell eliminiert (α 2-macroglobulin) und hat dadurch primär eine lokale und nicht systemische Exposition (38, 39).

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

Der Wachstumsfaktor wurde erstmal 1989 von *Ferrara et al.* benannt, die durch die Namensgebung dessen selektive, mitotische Wirkung auf Gefäßendothelzellen herausstellen wollten (40). Heute sind im menschlichen Genom Codes für fünf unterschiedliche Proteine bekannt, die zur VEGF Familie (Untergruppe der PDGF-Familie) gezählt werden und sich in ihrer Wirkung teilweise unterscheiden: VEGF-A, VEGF-B,

VEGF-C, VEGF-D und PlGF (placental growth factor) (41). Darüber hinaus zählt das im Orf-Virus codierte VEGF-E und das in Schlangengift nachgewiesene VEGF-F (snake venom VEGF) dazu (42). Das in menschlichen Ovarien, Hoden und Plazentagewebe vorhandene organspezifische EG-VEGF (endocrine gland-derived VEGF) gleicht von der biologischen Aktivität her der von VEGF-A, wird jedoch aufgrund seiner anderen Struktur nicht zur klassischen VEGF-Genfamilie dazugezählt (30, 43). Die VEGF-Proteine, die von verschiedenen Zellen (Thrombozyten, Granulozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, u. a.) sezerniert werden, wirken an den Zielzellen (Endothelzellen, Tumorzellen, Nervenzellen, Makrophagen, Muskelzellen) über drei unterschiedliche membranständige Tyrosinkinase-Rezeptoren. Während VEGFR-1 und VEGFR-2 dabei v. a. eine zentrale Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen einnehmen, ist der VEGFR-3 an der Regulation der Lymphangiogenese beteiligt. Neben den drei Hauptrezeptoren binden die Faktoren außerdem an zwei Co-Rezeptoren: Neuropilin 1 und 2 (NRP1, NRP2) (41, 44).

VEGF-A (vor Entdeckung der anderen nur VEGF) ist der am längsten bekannte und am intensivsten erforschte Vertreter. Von diesem, für die Angiogenese bedeutsamsten und während der Embryogenese und Kreislaufentwicklung unerlässlichen Protein, existieren verschiedene Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆). Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Aminosäuren (jeweilige Fußzahl) und entstehen durch alternatives Splicing im Anschluss an die Transkription des Gens. VEGF-A bindet sowohl am VEGFR-1 und VEGFR-2 und reguliert darüber vor allem die Vasculogene und Angiogenese. Darüber hinaus erhöht es die Gefäßpermeabilität (alter Name deshalb VPF = vascular permeability factor) und stimuliert die Zellmigration und Proliferation von Makrophagen und Endothelzellen, welche außerdem vermehrt WF sezernieren. Auch wenn die Affinität des Faktors zum VEGFR-1 höher ist, wird die primäre physiologische Wirkung durch den VEGFR-2 Rezeptor ausgelöst, was auf dessen zehnfach stärkere Tyrosinkinaseaktivität zurückzuführen ist. Der VEGFR-1 übernimmt dabei eher eine negativ regulatorische Funktion, durch die unstrukturierte, überschießende Gefäßbildung verhindert wird. Des Weiteren spielt er v. a. eine Rolle bei pathologischen Prozessen. So konnte man bei mutierten Mäusen mit funktionslosem Rezeptor ein langsames Tumorwachstum mit geringerer Metastasierung und abgeschwächter rheumatischer Entzündungen im Vergleich zu unveränderten Mäusen feststellen. Die gezielte Blockade von VEGF und des VEGFR-1 ist folglich Bestandteil aktueller onkologischer Forschung (30, 41, 44).

Über die Funktionen von **VEGF-B** und **PlGF** war lange Zeit wenig bekannt. Sie wirken beide über den schwächeren VEGFR-1 und nehmen daher eine untergeordnete Rolle während der Embryogenese und bei der Gefäßbildung ein. Dennoch konnte unter pathologischen Bedingungen, wie einer Ischämie, eine synergistische Wirkung von PlGF, die das angiogenetische Potential von VEGF-A begünstigt, nachgewiesen werden (4, 30, 41). VEGF-B spielt nach neuerer Erkenntnis eine Rolle bei pathophysiologischen Prozessen wie der Revaskularisation von ischämischem Myokard (45). Darüber hinaus konnte erstaunlicherweise auch eine protektive Wirkung von VEGF-B auf sensorische Nervenzellen und deren retrograde Degeneration festgestellt werden (46).

Die beiden Faktoren **VEGF-C** und **VEGF-D** wirken mit hoher Affinität am VEGFR-3, der auf lymphatischen Endothelzellen vorkommt, und stimulieren hierüber v. a. die Lymphangiogenese. Darüber hinaus binden sie außerdem schwach an den VEGFR-2. Während VEGF-C eine essentielle Rolle während der Embryogenese einnimmt, reguliert VEGF-D die postnatale Lymphgefäßbildung. Des Weiteren geht man davon aus, dass beide Faktoren an der Metastasierung von Tumoren, über die Lymphwege zu dem Lymphknoten, beteiligt sind (4, 41).

Im humanen Erbgut gibt es kein Gen, das den Faktor **VEGF-E** kodiert. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass er nach einer Parapoxvirus-Infektion mit dem Orf-Virus bei Schafen, Ziegen und auch dem Menschen nachweisbar ist. Als einziger Vertreter der VEGF-Familie bindet VEGF-E spezifisch nur am VEGFR-2 und induziert darüber u. a. eine Angiogenese im Bereich der infizierten Hautstelle. Therapeutisch könnte eventuell VEGF-E, aufgrund seiner selektiven Wirkung am VEGFR-2, zukünftig bei ischämischen Erkrankungen als proangiogenetische Substanz eingesetzt werden (41).

Auch das als **VEGF-F** oder svVEGF (snake venom VEGF) bezeichnete Protein gelangt erst über Umwege in den menschlichen Körper. Enthalten ist es im Gift der Habu-Schlange (*Trimeresurus flavoviridis*) und bewirkt nach einem Biss, über Bindung an VEGFR-1 und VEGFR-2, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität beim Opfer. Andere im Gift enthaltene Toxine können so effektiver ihre schädigende Wirkung entfalten (41).

Rezeptor	Faktor	Wirkung
VEGFR-1 (FLT-1)	VEGF-A VEGF-B PlGF VEGF-F	Beteiligt an pathologische Prozesse wie Tumorstromung und Metastasierung; stimuliert Migration und Proliferation von Entzündungszellen; erhöht Gefäßpermeabilität
VEGFR-2 (KDR, Flk-1)	VEGF-A VEGF-E VEGF-F (Schwach) VEGF-C (schwach) VEGF-D (schwach)	Physiologische Angiogenese und Vaskulogenese (u. a. bei Wundheilung)
VEGFR-3	VEGF-C VEGF-D	Lymphangiogenese

Tabelle 4: Die humanen VEGF-Proteine und ihrer Hauptwirkung an den Rezeptoren; VEGF-E und VEGF-F nur nach Infektion/Schlängenbiss nachweisbar (41).

Auch wenn heute bekannt ist, dass an der Entwicklung und Reifung neuer Blutgefäße ein komplexes System aus Rezeptoren und Liganden beteiligt ist, nimmt VEGF oft eine zentrale Schlüsselrolle ein und ist damit ein unerlässlicher Faktor im Rahmen der Wundheilung und Geweberegeneration (47).

GDF-15 – Growth/differentiation factor-15

Ende der neunziger Jahre wurde von unterschiedlichen Forschungsgruppen ein neues, wenn auch entferntes Mitglied der TGF- β Familie entdeckt, das den jeweiligen Eigenschaften und Nachweismethoden entsprechend unterschiedliche Namen erhielt und heute weitestgehend einheitlich als GDF-15 bezeichnet wird (48). *Bootcov et al.* konnten erstmals in Makrophagen das von ihnen als **MIC-1** (macrophage inhibitory cytokine-1) bezeichnete Protein nachweisen. Sie erkannten, dass seine Expression durch TGF- β sowie proinflammatorische Moleküle wie IL-1, IL-2, TNF- α und M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) gesteigert wird und über eine autokrine Hemmung als Regulator der Makrophagen Aktivität wirkt (49). Des Weiteren wurde das gleiche Protein in Plazentagewebe nachgewiesen und von *Hromas et al.* als **PLAB** (placental bone morphogenetic protein) (50) und von *Lawton et al.* als **PTGF- β** (Placental Transforming Growth Factor Beta) benannt (51).

Heute ist bekannt, dass der erstmals von *Bottner et al.* als **GDF-15** benannte Faktor (52) in geringer Menge in fast allen Geweben (vermehrt in Makrophagen, exokrinen Drüsen, Niere, Prostata, Lunge, Plexus choroideus) vorkommt, über antiinflammatorische, antiproliferative und apoptotische Eigenschaften verfügt und an zahlreichen, teilweise gegensätzlichen, Prozessen beteiligt ist. Die Regulation der intrazellulären

GDF-15 Expression (62 kDa Protein) und Freisetzung des biologisch wirksamen Dimers (28 kDa, verknüpft über Disulfidbindung) wird u. a. über Zytokine, COX-Hemmer, p53 und Hormone bedarfsgerecht gesteuert. Erhöhte Plasmawerte können beispielsweise bei akuten Verletzungen, Entzündungen, Tumorerkrankungen und bei einer Schwangerschaft gemessen werden. Im Bereich der Tumorforschung ist die Rolle von GDF-15 sehr unterschiedlich und teilweise widersprüchlich beschrieben, da dem Faktor manchmal onkogenetische und manchmal suppressive Eigenschaften zugesprochen werden. Es ist davon auszugehen, dass seine biologischen Effekte zum einen vom Tumor Typ und zum anderen vom Tumorstadium abhängig sind (48, 53).

Für den Bereich der Regeneration von Hart- und Weichgewebe ist vor allem die Beeinflussung von Knochenumsatz und Entzündungsreaktionen durch GDF-15 von Bedeutung. Denn auch wenn im Ablauf der Wundheilung eine Entzündungsreaktion unerlässlich ist, bei der Leukozyten (v. a. Makrophagen u. Neutrophile Granulozyten) nekrotische Zellen und Gewebereste beseitigen, um den anschließenden Ersatz durch Narbengewebe zu ermöglichen, ist eine ausgewogene Balance zwischen ab- und aufbauenden Prozessen zur Vermeidung von Rupturen und Dehiszenzen erforderlich. Neben der bereits erwähnten autokrinen Hemmung von Makrophagen, wurde 2011 von *Kempf et al.* ein weiterer regulierender Effekt und Mechanismus zur Vermeidung überschießender Entzündungsreaktionen beschrieben. Sie wiesen nach, dass GDF-15 direkt die Aktivierung der Adhäsionsmoleküle (Integrine) auf der Granulozytenoberfläche inhibiert, wodurch deren Gefäßanheftung und Diapedese verhindert und somit die Leukozytenkonzentration im Entzündungsgebiet verringert wird (54).

Dem gegenüber wurde bei Untersuchungen atherosklerotischer Arterien bei einem GDF-15 Defizit geringere entzündliche Läsionen und Plaque mit weniger Makrophagen und Leukozyteninfiltration bei geringerer Zellapoptose festgestellt. Im Umkehrschluss wurde daraufhin dem Faktor in diesem Zusammenhang proinflammatorisches Potential zugeschrieben, was erneut die teilweise sehr gegensätzliche und ortsabhängige Wirkung von GDF-15 verdeutlicht (55, 56).

In Bezug auf die Knochenregeneration unter hypoxischen Bedingungen, wie sie auch bei einer Fraktur oder Osteotomie durch Zerstörung der Gefäßintegrität vorliegt, scheint GDF-15 einen negativen Effekt zu haben. Der Faktor wird dabei von den Osteozyten gebildet und bewirkt bei Osteoklasten eine verstärkte und bei Osteoblasten eine gehemmte Differenzierung und Reifung, was während des Bone remodeling zu einer erhöhten Osteolyse mit Verlust an Knochenmasse führt (57, 58).

Ob GDF-15 in Bezug auf die Wundheilung und Regeneration förderlich ist oder nicht, ist demnach abhängig von der Betrachtung des jeweiligen Gewebes.

2.3 Blutblättchen-reiche Konzentrate

Zu Beginn jeder natürlichen Wundheilung steht als Folge der Hämostase die Ausbildung eines Thrombozyten-Fibrin-Pfropfs. Die dabei von den Blutblättchen freigesetzten Biomoleküle, allen voran die in den α -Granula enthaltenen Wachstumsfaktoren, nehmen eine zentrale Schlüsselrolle während der nachfolgenden Wundheilung ein. Dem Grundgedanken „viel hilft viel“ folgend, entwickelte sich daraus die Idee, durch eine lokale Thrombozytenkonzentrierung eine schnellere und effizientere Geweberegeneration zu erzielen (3).

2.3.1 Historische Entwicklung

Die Grundzüge zur Verwendung von zentrifugierten Eigenblutpräparaten finden sich bereits in deutschsprachigen Veröffentlichungen aus den 60er Jahren. Hier beschrieb *Schulte* die Vorteile bei der Behandlung von Knochenzysten mit konzentriertem, plasmaarmen, autologen Blut aufgrund geringerer Koagulumsretraktion und Infektanfälligkeit (59). Auch wenn sich die Therapie mit dem „**Schulte-Koagulum**“ in kiefer- und oralchirurgischen Abteilungen deutscher Universitäten etablierte, blieb die internationale Bekanntheit aus.

Ab den 70er Jahren fand der **Fibrinkleber** seinen Einzug in den operativen Alltag und bewährte sich zur Behandlung diffuser Sickerblutungen und kleiner verletzter Blut- und Lymphgefäße (60, 61). Die Verwendung in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie wurde im englischen erstmal von *Matras* 1982 beschrieben. Neben der hämostatischen Eigenschaft erwähnte sie außerdem die erfolgreiche Verwendung zur Adaptierung von Hauttransplantaten und kleiner Knochenfragmente sowie zur Anastomisierung von Nerven und Blutgefäßen. Dieser Gewebekleber, von *Matras et al.* als Zwei-Komponenten System entwickelt und als Tisseel verkauft, besteht zum einen aus Fibrinogenkonzentrat, Faktor XIII und Fibronectin und zum anderen aus Thrombin und Kalziumchlorid sowie Plasminogen als Fibrinolysehemmer. Durch Vermischung der beiden Komponenten werden die letzten Schritte der physiologischen sekundären Hämostase künstlich imitiert und es bildet sich ein Fibrinnetz aus (62). Aufgrund der potentiellen Infektionsgefahr durch das beim Herstellungsprozess verwendete homologe

Fremdplasma wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um autologen Fibrinkleber herzustellen. Diese Methoden waren jedoch allesamt sehr aufwändig und erforderten eine rechtzeitige präoperative Interaktion zwischen Patient und Blutbank, was zu weiteren Forschungen im Bereich der konzentrierten Blutpräparate veranlasste.

Mitte der 90er Jahre publizierten u. a. *Whitman et al.* über die Verwendung von **Platelet-rich Plasma (PRP)** in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Sie beschreiben die Überlegenheit von PRP, bzw. dem daraus gewonnenen Plättchen-Gel, gegenüber dem bereits gebräuchlichen Fibrinkleber. Herausgestellt wurde der Vorteil der lokalen Thrombozyten Konzentrierung sowie der daraus folgenden Anreicherung von Wachstumsfaktoren (u.a. PDGF, VEGF, TGF- β), Thromboxan A₂, ADP und Thrombin und dem damit verbundenen beschleunigenden Effekt auf die Gerinnung und die Wundheilung von Weichgewebe. Außerdem publizierten sie erstmals die Indikationsbereiche von PRP und dessen erfolgreiche Verwendung bei Kieferspalt, Sinusbodenelevationen und Unterkieferrekonstruktionen sowie der Therapie von Mund-Antrum-Verbindungen (63). Die ersten größeren klinischen Studien wurden 1998 von *Marx et al.* und 1999 von *Anitua* veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe um *Marx* untersuchte dabei 88 Patienten mit Unterkieferkontinuitätsdefekten. Bei der Hälfte der Probanden wurde zum Defektaufbau autologer Knochen in Kombination mit PRP und bei der anderen Hälfte ohne PRP verwendet. Sechs Monate nach der Operation erfolgte eine röntgenologische und histologische Evaluation, wobei bei der Patientengruppe mit PRP ein reiferer und dichter Knochen nachgewiesen wurde (64). Ähnlich positive Effekte konnte *Anitua* 1999 mit dem von ihm als **Plasma Rich in Growth Factor (PRGF)** bezeichneten Thrombozytenkonzentrat in einer Studie mit 20 Patienten nachweisen. Er untersuchte die Knochenregeneration nach Zahnextraktionen, wobei die Hälfte seiner Probanden in den alveolären Defekt PRGF appliziert bekamen. Neben der schnelleren Reifung und qualitativ höherwertigen Knochenstruktur wurde bei der PRGF-Gruppe außerdem eine verbesserte Heilung der bedeckenden Weichgewebe festgestellt (65).

Von diesem Zeitpunkt an erschienen zahlreiche Plättchenkonzentrate, die sich in ihrem Herstellungsprozess und ihrer Zusammensetzung teilweise stark unterschieden, aber größtenteils unter dem Begriff PRP publiziert und verkauft wurden. Diese uneinheitliche Terminologie sorgte für ein hohes Maß an Verwirrung und sehr kontroversen Studienergebnissen und Empfehlungen bezüglich des klinischen Einsatzes von PRP (66).

Trotz unterschiedlicher Herstellungsprozesse der verschiedenen PRP-Derivate, verband sie dennoch die Notwendigkeit der Verwendung von Zusätzen wie Aggregationshemmern, Thrombin und Kalzium sowie (im Regelfall) der zweizeitigen Zentrifugation (siehe 2.3.2). 2001 publizierten *Choukroun et al.* erstmals bezüglich **PRF (Platelet-Rich Fibrin)**, einem thrombozyten- und fibrinreichen Blutprodukt, das in einem Zentrifugationsschritt, ohne jegliche Zusätze erzeugt wird (siehe 2.3.3) (67, 68).

2.3.2 Platelet-rich Plasma

2001 definierten *Marx et al.* Platelet-rich Plasma allgemein als autologes Plasmavolumen, dessen Thrombozytenkonzentration über der Normalkonzentration liegt (von ihm als 150.000/µl – 350.000/µl angegeben). Als notwendige Arbeitskonzentration zur therapeutischen Unterstützung von Hart- und Weichgewebsheilung wurde eine Konzentration von 1.000.000 Blutplättchen/µl festgelegt (69).

Heute sind zahlreiche Zentrifugen, Kits und Herstellungsprotokolle zur Produktion plättchenreicher Plasmakonzentrate erhältlich. Auch wenn sich diese Konzentrate sowohl im Namen als auch in der molekularen Zusammensetzung teilweise unterscheiden, unterliegen die meisten der im Praxisalltag verwendeten Produkte dennoch einem grundlegend identischen Herstellungsprozess auf Grundlage der Differentialzentrifugation:

Das vom Patienten abgenommene venöse Vollblut wird, zur Vermeidung einer vorzeitigen Aggregation und Degranulation, mit einem Gerinnungshemmer versetzt und zentrifugiert. Ziel dieser **ersten Zentrifugation** („soft spin“) ist die Separierung der Erythrozyten aus dem Vollblut. Es bilden sich drei Schichten: Die untere Erythrozytenschicht am Boden des Tubes (55 % des Gesamtvolumens), die darüber befindliche Plasmaschicht (40 % des Gesamtvolumens; enthält Fibrinogen, Thrombozyten und wenige Leukozyten) mit dem dazwischenliegenden Buffy-Coat. Dieser kleine Film, der nur etwa 5 % des Gesamtvolumens ausmacht, ist reich an Leukozyten und Thrombozyten.

In einem zweiten Arbeitsschritt werden nun Plasma und Buffy-Coat in ein neues Tube übertragen und erneut zentrifugiert. Dieser **zweite Zentrifugationsschritt** („hard spin“, schneller und länger) dient der erneuten Auftrennung der Blutprobe, wobei die im oberen Bereich erzeugte plättchenarme Plasmafraktion (PPP, Platelet-poor Plasma) verworfen wird und konzentriertes PRP übrigbleibt (67, 70).

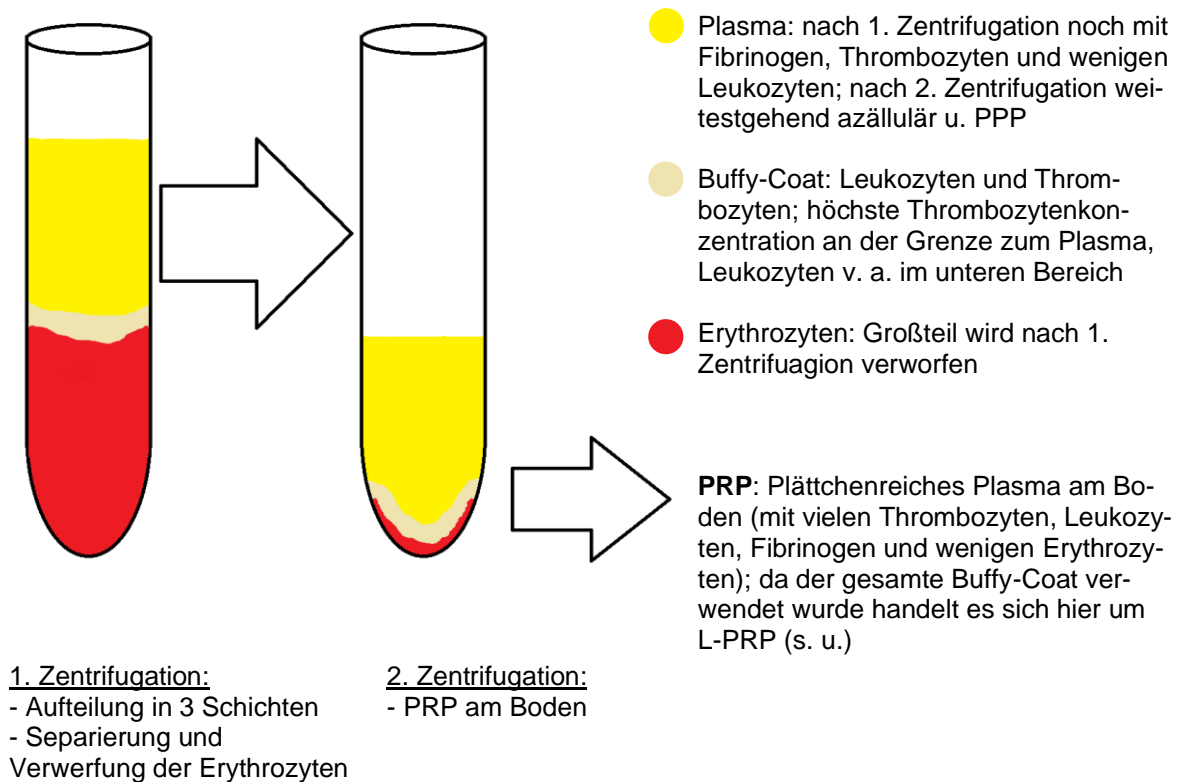


Abb. 1: Schematische Darstellung der PRP Herstellung auf Grundlage der Differentialzentrifugation. (Quelle: Eigene Darstellung)

Je nach Verfahren unterscheiden sich die genutzte Drehzahl, Beschleunigung, Zentrifugationsdauer, Temperatur und der verwendete Aggregationshemmer. Ebenso variieren die Anteile der jeweiligen Schichten, die nach der ersten Zentrifugation in das zweite Tube übernommen werden: Wird ausschließlich PPP und der oberflächliche Anteil des Buffy-Coats verwertet, entsteht nach der zweiten Zentrifugation **P-PRP** (pure PRP), das zwar reich an Thrombozyten ist, jedoch kaum Leukozyten enthält. Übernimmt man dem gegenüber das PPP mit dem gesamten Buffy-Coat (und zwangsläufig ein paar roten Blutzellen) gewinnt man anschließend **L-PRP** (leucocyte-rich PRP) in dem sowohl Thrombozyten als auch Leukozyten konzentriert sind (71).

Uneinheitlich ist außerdem die Art und Weise, wie die Plättchen aktiviert werden. So besteht zum einen (v. a. bei Weichgeweben) die Möglichkeit, das antikoagulierte und flüssige PRP ins Wundgebiet zu sprühen oder zu injizieren, wo freigelegtes Kollagen und negative Oberflächen auf natürliche Weise zu einer Aktivierung der Blutplättchen führen. Zum anderen ist durch das Beifügen von Thrombin (meist allogen, bovin) und Kalziumchlorid eine exogene Aktivierung möglich, was die Thrombozytenaggregation

und Ausbildung eines Fibrinnetzes aus dem ebenfalls angereicherten Fibrinogen auslöst. Das Ergebnis ist eine Verfestigung des PRP zu einem gelartigen Fibrinpfropf mit hämostatischen und adhäsiven Eigenschaften (67, 70).

Dieses PRP-Gel kann zum Auffüllen trockener Alveolen und größerer Knochendefekte verwendet werden, wobei eine Reduktion postoperativer Schmerzen und Knochenentzündung nachgewiesen wurde (72, 73). Ebenso fördert es die Regeneration des Alveolarknochens und des parodontalen Weichgewebes und begünstigt somit die spätere Aufnahme eines Implantates. Weiteren klinischen Einsatz findet es bei der Behandlung parodontaler Defekte und Knochenaufbauten mit Knochenersatzmaterial und gesteuerter Geweberegeneration (Guided Tissue Regeneration), wobei die Untersuchungsergebnisse in diesem Anwendungsbereich teilweise sehr gegensätzlich sind (74).

Auch wenn die Effekte von PRP in vielen klinischen Studien positiv ausfallen und die Anwendung im Bereich der Sportmedizin und Orthopädie nach wie vor diskutiert wird, spielt es im praktischen Alltag der Oral- und Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie nur noch eine untergeordnete Rolle. Aufgrund seiner einfachen, schnellen und kostengünstigen Herstellung sowie der guten Kombinierbarkeit mit den aktuellen chirurgischen Techniken hat sich hier zunehmend die Verwendung von PRF durchgesetzt (66, 74, 75).

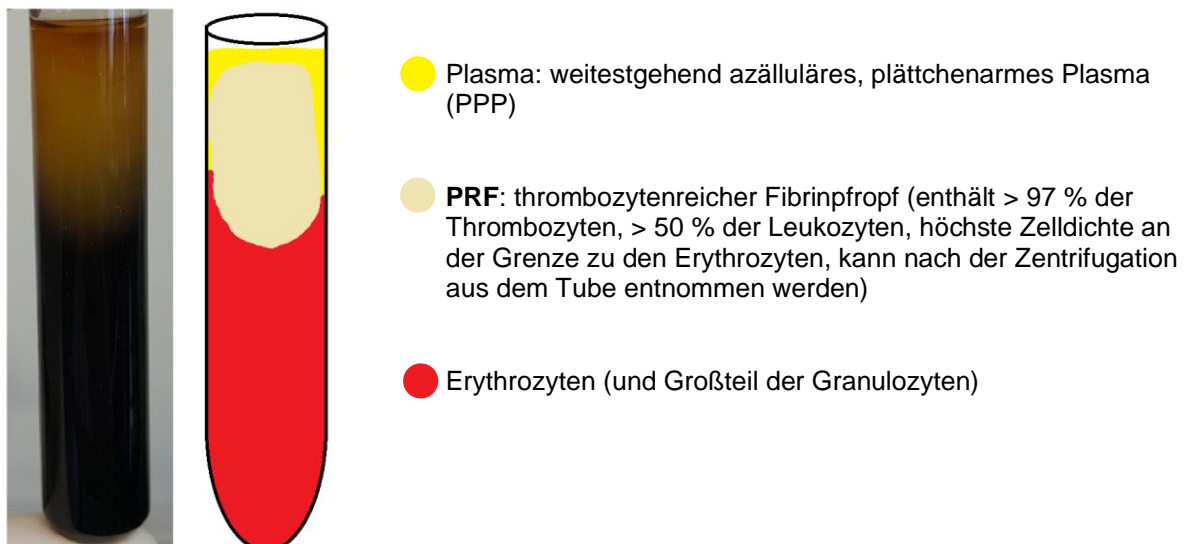
2.3.3 Platelet-rich Fibrin

Die Forschungsgruppe um *Choukroun* und *Dohan Ehrenfest* publizierte erstmals 2006 in der internationalen, englischsprachigen Fachliteratur über das bereits 2001 von *Choukroun* entwickelte Platelet-rich Fibrin (PRF, *Choukroun's PRF*), das sie als ein Plättchenkonzentrat der neuen Generation bezeichneten. Im Gegensatz zur Produktion von Fibrinkleber oder herkömmlichem PRP erfordert dessen Herstellung keine Fremdzusätze wie Aggregationshemmer, Kalziumchlorid und (allogenes) Thrombin, wodurch das Risiko von unerwünschten Immunreaktionen oder Infektionen ausgeschlossen ist. Ebenso unterscheidet es sich in dem weniger komplexen Produktionsprotokoll, das lediglich eine einmalige Zentrifugation erfordert (67, 68).

Zur Herstellung des ursprünglichen PRF werden 10 ml Vollblut für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Ziel des Zentrifugierens ist, ähnlich der Herstellung von PRP, die Verdrängung der Erythrozyten in den unteren Teil des Tubes und die Konzentrierung des oberen Teils mit Fibrinogen und Thrombozyten. Durch die Abwesenheit eines Gerinnungshemmers, setzt unmittelbar nach Blutentnahme und während der Zentrifugation die physiologische Gerinnung, mit Aktivierung der Thrombozyten ein (ausgelöst

durch Kontakt mit der Glasoberfläche des Tubes). Zwischen der unteren Erythrozytenschicht und der oberen azellulären Plasmaschicht (PPP) bildet sich ein thrombozytenreicher Fibrinpfropf: das PRF. Durch mechanisches Herauspressen des Serums (im Folgenden als PRF-Exsudat bezeichnet) kann aus dem weichen PRF eine widerstandsfähige PRF-Membran gewonnen werden (s. u.).

Der entscheidende Faktor für den Erfolg des Verfahrens liegt in der unmittelbaren Verarbeitung des Vollblutes nach dessen Entnahme. Eine zu lange Wartezeit zwischen Blutentnahme und Zentrifugation führt zu einer vorzeitigen ungerichteten Thrombozytenaggregation und diffusen Polymerisation des Fibrins im gesamten Blutröhrchen, wodurch nach der Zentrifugation ein Blutklumpen von kaum nutzbarer Konsistenz entsteht (76).



1. Zentrifugation:
- Aufteilung in drei Schichten

Abb. 2: Reale und schematische Darstellung der PRF-Herstellung durch einzeitige Zentrifugation. (Quelle: Eigene Darstellung)

Einen entscheidenden Unterschied von PRF gegenüber PRP sahen seine Entwickler neben der einfacheren, günstigen und zusatzfreien Handhabung vor allem in der Art der Polymerisation und Struktur des **Fibrins**. Sie stellten fest, dass bei der künstlichen und schnellen, durch hohe Thrombin Zusätze provozierten Gerinnung des PRP (und Fibrinklebers) ein unphysiologisches Fibrinnetz entsteht. Dessen starre und widerstandsfähige Struktur eignet sich zwar zum dichten Verschluss und der Adaptierung von Geweben, ermöglicht jedoch nur einen lockeren Einschluss und folglich schnellen

Verlust von Zytokinen. Dem gegenüber entsteht bei der natürlichen, langsamer ablaufenden Gerinnung während der PRF-Herstellung ein lockeres, flexibles und weitmaschiges Fibrinnetz, das reich an Glykosaminoglykanen (Heparin, Hyaluronsäure) und Glykoproteinen (Fibronektin) ist. Die hohe Affinität von Zytokinen und Wachstumsfaktoren an Glykosaminoglykanen zu binden ermöglicht deren Integration und langfristige Fixierung. Außerdem wird durch die poröse Fibrinstruktur die Migration von regenerativen Zellen erleichtert und damit die Wundheilung über einen längeren Zeitraum (≥ 7 Tage) unterstützt (67, 77, 78). Der Vorteil eines natürlichen weitmaschigen Fibringerüsts gegenüber einem engmaschigen wirkt sich außerdem positiv auf die Einsprossung von Blutgefäßen (Angiogenese) aus (38, 79).

Neben dieser günstigen Fibrinstruktur und den konzentrierten Blutplättchen mit deren Wachstumsfaktoren und Zytokinen sprachen die Entwickler des PRF von Beginn an auch den enthaltenen Leukozyten grundlegenden Einfluss zum regenerativen Potential ihres thrombozytenreichen Fibrins zu. Sowohl im zellfreien Überstand als auch im PRF (bzw. dessen Exsudat) konnten, im Vergleich zu normalem Blutplasma und Blutserum, erhöhte Konzentrationen an leukozytären Mediatoren und Zytokinen (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , u. a.), die Entzündungs- und Immunreaktionen regulatorisch beeinflussen, nachgewiesen werden (78, 80). In einer PRF-Membran, die nach dem ursprünglichen Protokoll hergestellt wird, sind mehr als 97 % der Thrombozyten und mehr als 50 % der Leukozyten (v. a. Lymphozyten und Monozyten; Granulozyten hingegen vermehrt im roten Koagel) konzentriert. Entsprechend der von *Dohan Ehrenfest* eingeführten Einteilung thrombozytenreicher Plasmakonzentrate zählt PRF, das in dieser Art hergestellt wird, aufgrund seiner hohen Leukozytenzahl zur **L-PRF** Familie (Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin). Die höchste Zelldichte befindet sich dabei innerhalb des ersten Millimeters an der Grenze zum roten Koagel (entspricht dem Buffy-Coat), wohingegen in der oberen Hälfte des PRF kaum Thrombozyten und Leukozyten sind (66, 71, 78).

Wurde zu Beginn noch empfohlen, zur Herstellung einer PRF-Membran das Koagel zwischen zwei sterilen Kompressen zu quetschen, erkannten *Choukroun et al.* schnell, dass dies zum Austrocknen und zum Verlust des Exsudates führt. 2007 entwickelte *Choukroun* deshalb die **PRF-BoX**, mit der die zeitgleiche Produktion von 16 Membranen möglich ist. Der gleichmäßige und langsame Druck, der beim Pressen aufgebracht wird, führt zu hydratisierten, homogenen Membranen, die außerdem mehr Wachstumsfaktoren (PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF, u. a.) als trocken gepresste Membranen ent-

halten. Neben der längeren Lagerungszeit ist außerdem das Auffangen des herausgedrückten Exsudates (enthält Zytokine, Wachstumsfaktoren, Fibronectin und Vitronectin) von Vorteil, da es zum Beispiel anstelle von NaCl zur Benetzung von Knochenersatzmaterial verwendet werden kann (81).

Klinische Anwendung findet PRF heute unter anderem im Bereich der Oralchirurgie, Implantologie und Parodontologie, wo es als alleiniges Füllungsmaterial oder vermischt mit Knochenersatzmaterial zur Defektauffüllung genutzt wird. Des Weiteren kann es als Membran zur Abdeckung von Knochenersatzmaterial und als Separationsmembran im Bereich der Guided Bone and Tissue Regeneration verwendet werden. Dabei dient es zum einen als zusätzliche Abschirmung des Augmentates von anderem Gewebe und der Mundhöhle. Zum anderen wirkt es als Heilungsbeschleuniger des bedeckenden Periostes und Weichgewebes, wodurch unter anderem die Gefahr von Infektionen und Dehiszenzen reduziert wird oder aufwändige Verschiebelappen erspart bleiben. In diesem Zusammenhang findet es auch Verwendung beim Auffüllen und Abdecken von Extraktionsalveolen bei Risikopatienten unter Bisphosphonat-Therapie und Diabetikern, bei einer Alveolitis sicca zur Vermeidung einer Ostitis sowie zum Verschluss einer Mund-Antrum-Verbindung. Von praktischem Vorteil ist bei allen Verfahren die stabile und widerstandsfähige Struktur der gepressten PRF-Membranen und Kegeln, die bereits von der Handhabung her dem fragilen und weichen PRP-Gel überlegen sind (74, 75, 82).

Weiterentwicklungen des Standard PRF:

Obwohl bereits das klassische, nach dem ursprünglichen Protokoll hergestellte PRF (von Arbeitsgruppen mit *Choukroun* als Standard PRF bezeichnet, **S-PRF**) in vitro, in vivo sowie in klinischen Untersuchungen mit schnellerer und effizienterer Wundregeneration bei geringerer Morbidität zu positiven Ergebnissen führte (8, 83), wurde versucht, nicht nur die Membranherstellung zu verbessern, sondern auch die gesamte Struktur und zelluläre Zusammensetzung zu optimieren und weiterzuentwickeln:

Gelingt es zwar mit dem Standardprotokoll (von den Entwicklern anfangs angegeben mit 10 ml Blut bei 3000 rpm für 10 min und später mit 9 ml Blut bei 2700 rpm für 12 min) fast alle Thrombozyten zu konzentrieren, sammeln sich hingegen ca. die Hälfte der Leukozyten (v. a. Granulozyten) im unbrauchbaren roten Koagel (78). Um jedoch

den inflammatorischen und nozizeptiven Mediatoren, wie sie nach jeder Gewebeschädigung vorliegen entgegenwirken zu können, ist es von Interesse, den Leukozytenanteil mit deren antiinflammatorischen (IL-4, IL-10, IL-13) und opioiden Peptiden (β -Endorphin, Met-Enkephalin, Dynorphin A) zu erhöhen (66, 84). Des Weiteren erhofft man sich vor allem durch die Vermehrung aktivierter Makrophagen eine Verbesserung der Knochen- und Weichgewebsregeneration, da sie neben den Thrombozyten eine zentrale Quelle proliferativer Zytokine und Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF, TGF- β , BMP-2, u. a.) sind und eine stimulative Rolle im Knochenaufbau einnehmen (85-87).

Durch Veränderung der Zentrifugationsgeschwindigkeit und Zentrifugationszeit gelang der Arbeitsgruppe um *Ghanaati* und *Choukroun* 2014 die Entwicklung eines „fortgeschrittenen“ PRF (**A-PRF**, advanced PRF). Dieses zeichnet sich, im Vergleich zu S-PRF, durch eine lockerere und weitmaschigere Fibrinstruktur, homogenere Thrombozytenverteilung und signifikant gleichmäßigere Verteilung neutrophiler Granulozyten aus. Vor allem in der ausgewogeneren Verteilung der Granulozyten über ca. 2/3 des Fibrinkoagulums sahen seine Entwickler eine Verbesserung gegenüber dem herkömmlichen S-PRF, gehören sie doch gemeinsam mit Thrombozyten, zu den Zellen während der frühen exsudativen Phase (siehe 2.1.1). Über ihre unspezifische Immunabwehr und phagozytäre Fähigkeit sind sie am Wunddebridement (Matrix Metalloproteinase 8 und 9) beteiligt, fördern über VEGF-Freisetzung die Revaskularisation, kommunizieren mit Lymphozyten, erleichtern das Einwandern von Monozyten und fördern deren Differenzierung zu Makrophagen. Folglich ist davon auszugehen, dass sich ihre großflächigere Verteilung sowohl positiv auf die anderen im PRF transplantierten als auch die dem Defekt angrenzenden, ortsständigen Zellen auswirkt. Im Idealfall können so die ersten Phasen der Wundheilung beschleunigt werden, mit geringeren Schmerzen und geringerer Schwellung ablaufen und die angestrebte Hart- und Weichgewebsregeneration verbessert werden (8, 88-90).

Zur Herstellung von „advanced“ PRF empfiehlt die Firma *Process for PRF* in Zusammenarbeit mit *Choukroun* aktuell die Verwendung ihrer neuen A-PRF+ Tubes mit dem entsprechenden modifizierten Zentrifugationsprotokoll (1300 rpm für 8 min). Diese erneute Reduktion der Drehzahl und Zentrifugationsdauer (low speed centrifugation concept: LSCC) zur Produktion dieses **A-PRF+** (zur besseren Abgrenzung vom „alten“ A-PRF, übernommen von *Fujjoka-Kobayashi et al.* und *Ghanaati*) führt, aktuellen Studien zufolge, zu höheren Konzentrationen freigesetzter Wachstumsfaktoren durch höhere Thrombozyten- und Leukozytenzahlen sowie zu verstärkter Migration und Proliferation von Fibroblasten (89, 91, 92).

Eine weitere Innovation ist die Entwicklung von flüssigem, injizierbarem PRF (**i-PRF**, injectable PRF). Ähnlich der Herstellung von klassischem, festen L-PRF (S-PRF, A-PRF, A-PRF+) wird hierzu Vollblut ohne jegliche Zusätze umgehend nach der Blutentnahme zentrifugiert. Der sich dabei absetzende orange Überstand – das i-PRF – kann anschließend, durch Aspiration mit einer Kanüle, vom darunter befindlichen roten Rest getrennt werden (93). Zur Herstellung wird die Verwendung der speziellen i-PRF Tubes mit dem entsprechenden Zentrifugationsprotokoll (700 rpm für 3 min) empfohlen. Das flüssige i-PRF ist für ca. 10 Minuten injizierbar und kann in dieser Zeit beispielsweise in Gewebe eingespritzt oder auf Knochenersatzmaterial gegeben werden. Der Hersteller verspricht sich durch die hohen Konzentrationen von Thrombozyten und Leukozyten im i-PRF ähnlich positive Effekte auf die Hart- und Weichgewebsregeneration wie bei der Verwendung von klassischem L-PRF. Einen weiteren Vorteil sieht er in der Kombination von i-PRF mit Knochengranulat. Durch das zeitversetzte koagulieren besteht dabei die Möglichkeit, das Knochenersatzmaterial in die gewünschte Form zu bringen und zu fixieren (9).

Trotz der vielversprechenden Herstellerangaben lagen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung keine Vergleichsarbeiten vor, die sich mit dem neuen A-PRF+ und i-PRF befassen. Während der Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit publizierte Ergebnisse werden im Diskussionsteil vorgestellt und mit den durch die im Folgenden beschriebenen Versuchsergebnissen verglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung von Wachstumsfaktoren im neuen i-PRF und herausgepresstem A-PRF+ Exsudat, verglichen mit Blutserum, und deren Freisetzung durch A-PRF+ Membranen über den Zeitraum von drei Tagen. Quantifiziert werden dabei zwei typischerweise in Thrombozytenkonzentraten enthaltene Faktoren (PDGF-BB, VEGF) sowie der in diesem Zusammenhang unerforschte Faktor GDF-15.

	(S-PRF, alt) S-PRF, aktuell	(A-PRF, alt) A-PRF+, aktuell	i-PRF
Blutvolumen	(10 ml) 9 ml	10 ml	10 ml
Drehzahl	(3000 rpm) 2700 rpm	(1500 rpm) 1300 rpm	700 rpm
Dauer	(10 min) 12 min	(14 min) 8 min	3 min
Tube- Oberfläche	Glasoberfläche „glass tubes“ (94) glass-coated plastic tubes“ (95)	Glasoberfläche „plain glass-based tubes“ (8)	Plastikoberfläche „plastikbeschichtete Oberfläche“ (89)
Konsistenz	- weicher Pfropf - als gepresste Membran fest und widerstandsfähig	- weicher Pfropf - als gepresste Membran fest und widerstandsfähig	- anfangs flüssig - härtet nach ca. 10 min aus und wird gelartig (gerinnt)
Besonderheit	- dichteres Fibrin- netz als bei A-PRF - enthält > 97 % der Thrombozyten - enthält > 50 % der Leukozyten (v. a. Lymphozyten und Monozyten) - Lymphozyten, Mo- nozyten und Stammzellen v. a. proximal, im vorde- ren 1/3 (BC, Grenze zum roten Koagel) - N. Granulozyten hauptsächlich im ro- ten Koagel, Grenze zum BC - Thrombozytenzahl nimmt von proximal nach distal ab	- weniger dichtes Fibrinnetz mit mehr Zelleinschlüssen - Lymphozyten, Mo- nozyten und Stammzellen v. a. proximal, im vorde- ren 1/3 (Ausge- dehnter BC) - N. Granulozyten auch in den vorde- ren 2/3 des Fibrins - Thrombozyten gleichmäßiger ver- teilt, bis in den dis- talen Bereich	- injizierbar

Tabelle 5: Unterschiedliche Arten von PRF mit den jeweiligen Herstellungsprotokollen und den spezifischen Eigenschaften. Sowohl S-PRF, A-PRF und A-PRF+ können zur L-PRF Familie gezählt werden (8, 78).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arbeitsgeräte

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Brutschrank, Typ BB 16 CO ₂ Incubator Bedingungen: 37 °C mit 5 % CO ₂	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Eismaschine, Scotsman AF80 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Gefrierschrank - 80 °C, Forma™ - 86 °C- Ultratiefkühlschränke der Serie 900	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kryoboxen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kühlschrank + 5 °C, BOSCH KGE3115	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, DE
Einkanal-Pipetten, Pipetman® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, FR
Mikroplattenreader, VersaMax™ ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, USA
Mehrkanal-Pipette, Pipetman® 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, FR
PRF Box	Process for PRF, Nice, FR
PRF Mini Tray	Process for PRF, Nice, FR
PRF Pinzette	Process for PRF, Nice, FR
PRF Schere	Process for PRF, Nice, FR
Spritzflasche	VWR International, Radnor, USA
Staubband, Venenstauer	Intermedical24 GmbH, Regensburg, DE
Vortexmischer, IKA Minishaker MS1	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Werkbank, HERAsafe® Typ HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Zentrifuge, DUO®	Process for PRF, Nice, FR
Zentrifuge, Heraeus™ Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifuge, Heraeus™ Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 6: Im Versuch verwendete Arbeitsgeräte mit Bezeichnung, Name des Herstellers und Land des Firmensitzes.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
A-PRF Röhrchen 10 ml	Process for PRF, Nice, FR
Butterflykanüle, fast collector BC10®	Process for PRF, Nice, FR
Einmalspritze, Injekt® Solo 2 ml	Braun, Melsungen, DE
Einweghandschuhe, Sempercure® premium	Semperit AG, Wien, AT
ELISA Klebefolie, ELISA Plate Sealers®	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Hautdesinfektionsmittel, octeniderm®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
i-PRF Röhrchen 10 ml	Process for PRF, Nice, FR
Kanüle, BD Microlance™3 20 G x 1 1/2", 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Leukosilk®	BSN medical, Luxemburg, LUX
Mikrotiterplatte, Clear Microplates® 96-Well-Platte	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Multi-Adapter für S-Monovette®	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen Diamond® D10, D200, D1000	Gilson, Villiers-le-Bel, FR
Serum-Gel-Monovette, S-Monovette® 7,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Tube, Cellsta® Centrifuge Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Tupfer, Zelletten®	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, DE
Zellkulturplatte Cellstar® 6-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

Tabelle 7: Im Versuch verwendete Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel mit Bezeichnung, Name des Herstellers und Land des Firmensitzes.

3.1.3 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Aqua Dest, Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
Color Reagent A	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Color Reagent B	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human GDF-15 DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human PDGF-BB DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human VEGF DuoSet ELISA	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Medium, Gibco™ DMEM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Reagent Diluent Concentrate 2	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Schwefelsäure (2 N H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Tween® 20 Detergent	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Tabelle 8: Im Versuch verwendete Chemikalien und Substanzen mit Bezeichnung, Name des Herstellers und Land des Firmensitzes.

3.2 Methoden

3.2.1 Blutentnahme

Die Herstellung der verschiedenen Thrombozytenprodukte erfolgte im Rahmen der Forschung an sogenanntem Überschussmaterial (§ 14 Abs. 3 AVB) der Universitätsmedizin Mainz nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung der Probanden über die Versuchsdurchführung sowie der Unterzeichnung einer Einverständniserklärung bei acht männlichen Probanden.

Die Venenpunktion erfolgte lege artis in der Ellenbeuge nach vorausgegangener Hautdesinfektion. Insgesamt wurde jedem Probanden ca. 87,5 ml Blut (vier A-PRF+ Monovetten à 10 ml, vier i-PRF Monovetten à 10 ml, eine Serum Monovette à 7,5 ml) abgenommen und entsprechend weiterverarbeitet (s. u.).

Die Blutentnahme wurde mit den vier i-PRF Röhrchen begonnen und diese umgehend für drei Minuten zentrifugiert. Nach dem Ablauf einer Minute wurden die verbliebenen

zwei Minuten für die Entnahme mit der Serum Monovette und den vier A-PRF+ Monovetten genutzt, welche anschließend ebenfalls direkt zentrifugiert wurden. Durch diesen zeitlichen Ablauf war es möglich, sämtliche Proben eines Probanden mit lediglich einer Venenpunktion zu gewinnen und trotzdem dabei die vom Hersteller vorgegebenen Zeitfenster einzuhalten.

3.2.2 Gewinnung von Serum

Die Blutentnahme erfolgte mit einer 7,5 ml Serum Gel-Monovette. Nach der Entnahme wurde diese für 15 min bei Raumtemperatur in aufrechter Position gelagert. Nach abgeschlossener Gerinnung erfolgte das Zentrifugieren für 10 min bei 2.500 g, wobei auf das Austarieren der Zentrifuge durch ein entsprechendes Gegengewicht geachtet wurde. Hierbei wurde das Vollblut in Serum und Blutreste, abgegrenzt durch eine Gelschicht, aufgetrennt. Anschließend konnte das **Serum** abpipettiert und auf fünf Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilt werden. Die gesammelten Proben wurden beschriftet und bei - 80 °C gelagert.

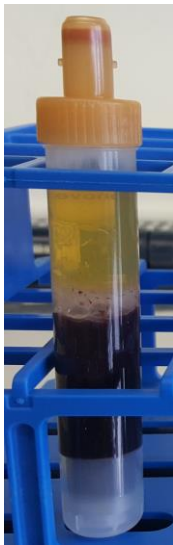


Abb. 3: Serum Gel-Monovette nach 15 min Gerinnung und 10 min Zentrifugation bei 2.500 g. Das Vollblut ist in Serum und Blutreste aufgetrennt.

3.2.3 Herstellung und Gewinnung von i-PRF

Die Blutentnahme erfolgte zügig mit den entsprechenden 10 ml i-PRF Monovetten. Die vier Röhrrchen wurden direkt nach der Blutentnahme für 3 min bei 700 rpm (RCF-max = 60 g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich an der Oberfläche ein oranger Überstand (das i-PRF) mit einer darunter befindlichen roten Schicht. Die Verschlusskappe wurde mit einer sterilen Kanüle durchstoßen und das i-PRF mit einer Spritze aspiriert. Hierbei wurde darauf geachtet, an der Grenze zu der roten Schicht zu stoppen und so wenig Erythrozyten wie möglich einzusaugen. Die Kanüle wurde unter Aufrechterhaltung des Unterdrucks aus der Monovette herausgezogen und das gewonnene i-PRF in einem Eppendorfgefäß gesammelt.

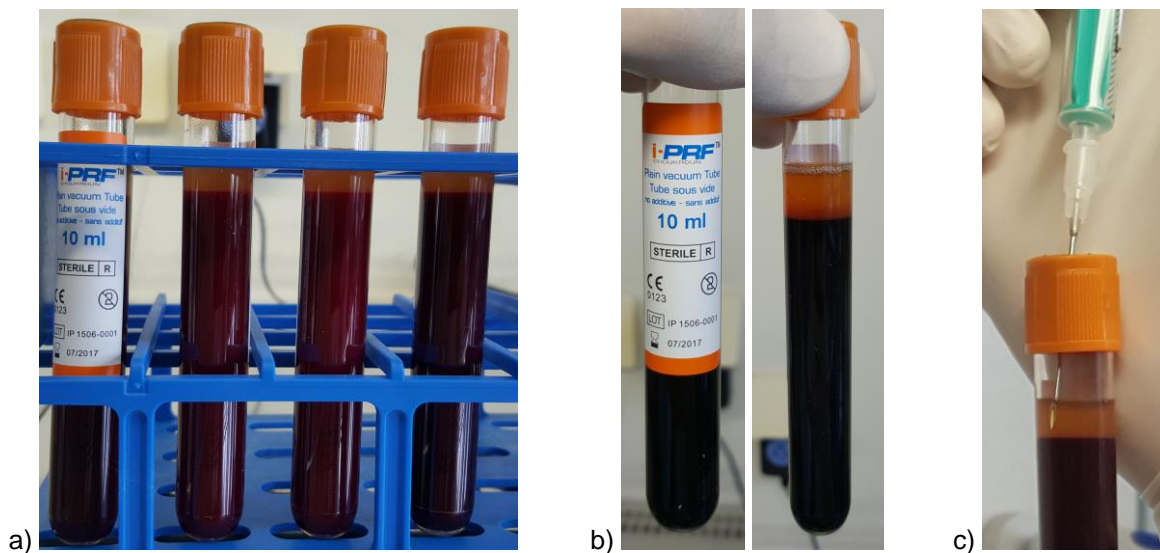


Abb. 4: i-PRF Röhrrchen nach Zentrifugation (3 min bei 700 rpm)

- a) vier i-PRF Röhrrchen eines Probanden
- b) Vorder- und Rückseite eines i-PRF Röhrrchens
- c) Entnahme des orangen i-PRF Überstandes mit einer sterilen Kanüle und Spritze.

Da i-PRF lediglich für ca. 10 min flüssig und in der anschließenden gelartigen Konsistenz für die folgenden Untersuchungen nicht lager- und applizierbar war, wurde es nach abgeschlossener Gerinnung (15 min, in aufrechter Position) mit einem Vortexmischer kräftig durchgemixt und anschließend für 8 min bei 5,5 g zentrifugiert. In dem Eppendorfgefäß lagerte sich am Boden ein kleiner, fester, rotweißer Pfropf ab. Die darüber befindliche Flüssigkeit, das zellfreie i-PRF, konnte abpipettiert und auf fünf Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilt werden. Die gesammelten Proben wurden beschriftet und bei - 80° C gelagert.

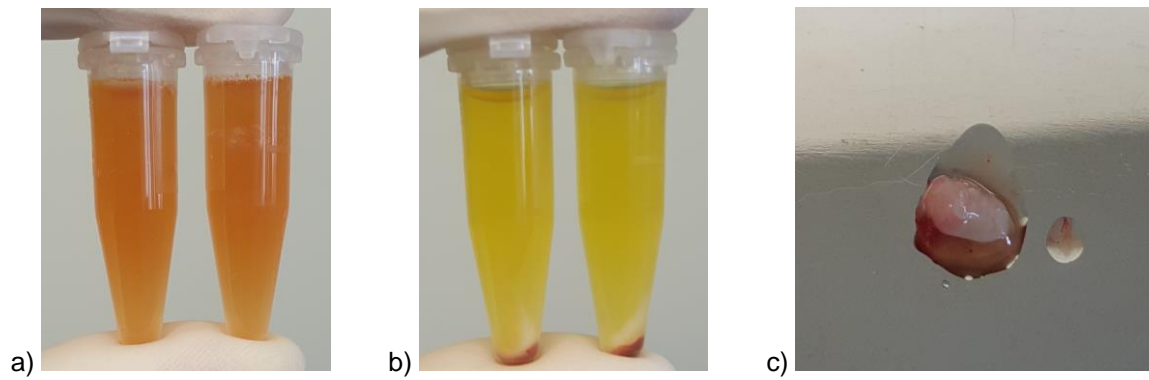


Abb. 5: i-PRF vor und nach erneuter Zentrifugation

a) Gesammeltes i-PRF eines Probanden in zwei Eppendorfgefäßen nach abgeschlossener Gerinnung. Das i-PRF ist orange und enthält noch zelluläre und partikuläre Bestandteile.

b) Gesammeltes i-PRF eines Probanden in zwei Eppendorfgefäßen nach Durchmischung und erneuter Zentrifugation (8 min bei 5,5 g). Die zellulären und partikulären Bestandteile sind am Boden abgeschieden.

c) Der abgeschiedene, feste, rotweiße Pfropf.

3.2.4 Herstellung von A-PRF+ und Gewinnung von A-PRF+ Exsudat

Die Blutentnahme erfolgte zügig mit den entsprechenden 10 ml A-PRF+ Glasmonovetten. Die vier Glasröhrchen wurden direkt nach Blutentnahme für 8 min bei 1300 rpm (RCF-max = 208 g) zentrifugiert (DUO®, Process for PRF, Nice, Fr). Anschließend wurden die Monovetten in einen Röhrchenständer gestellt und für 10 min ruhig stehen gelassen. Unter dem sterilen Abzug wurden im Anschluss die Verschlusskappen der Röhrchen entfernt, die Fibrin-Koagel mit einer sterilen Pinzette herausgenommen und von ihren roten Koageln getrennt. Dabei wurde darauf geachtet den Grenzbereich (entspricht dem Buffy-Coat) zwischen dem gelblichen PRF-Pfropf und dem roten Erythrozyten-Pfropf zur erhalten, da vor allem hier die Thrombozyten und Leukozyten konzentriert sind (77, 78).

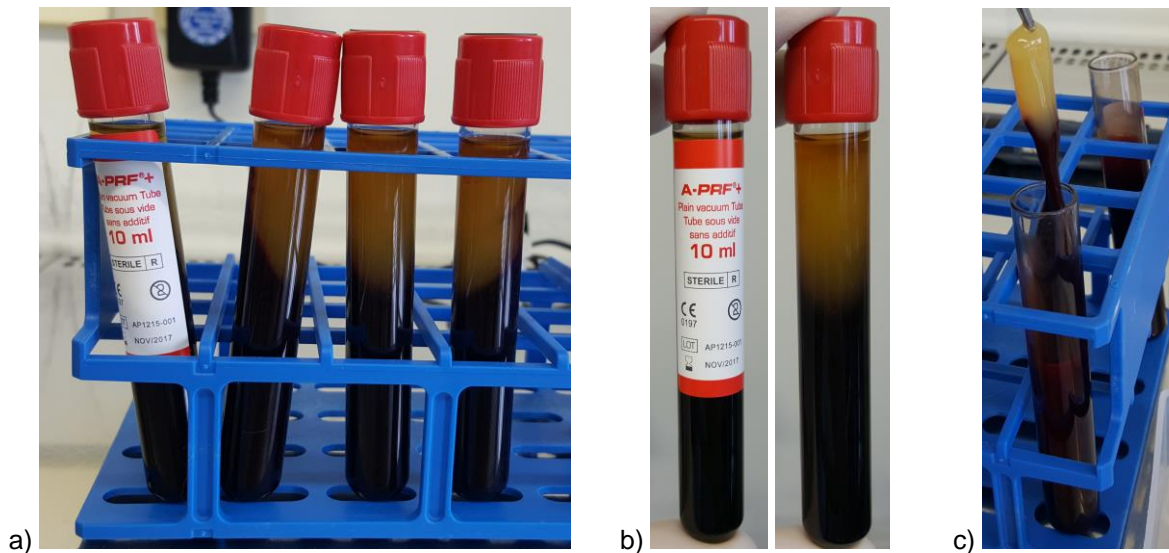


Abb. 6: A-PRF+ Röhrchen nach Zentrifugation (8 min bei 1300 rpm)

a) vier A-PRF+ Röhrchen eines Probanden

b) Vorder- und Rückseite eines A-PRF+ Röhrchens

c) Entnahme des A-PRF+ mit einer sterilen Pinzette. Das A-PRF+ ist dabei noch mit dem roten Koagel verbunden.

Die vier gewonnenen A-PRF-Koagel wurden anschließend auf das BoX-Gitter gelegt, mit dem Tray abgedeckt und anschließend der BoX-Deckel aufgesetzt. Das Tray wirkte als mechanisches Gewicht auf die geleeartigen Fibrinkoagel und presste Flüssigkeit (Exsudat) heraus, wodurch robuste Fibrinmembranen gleicher Stärke entstanden.

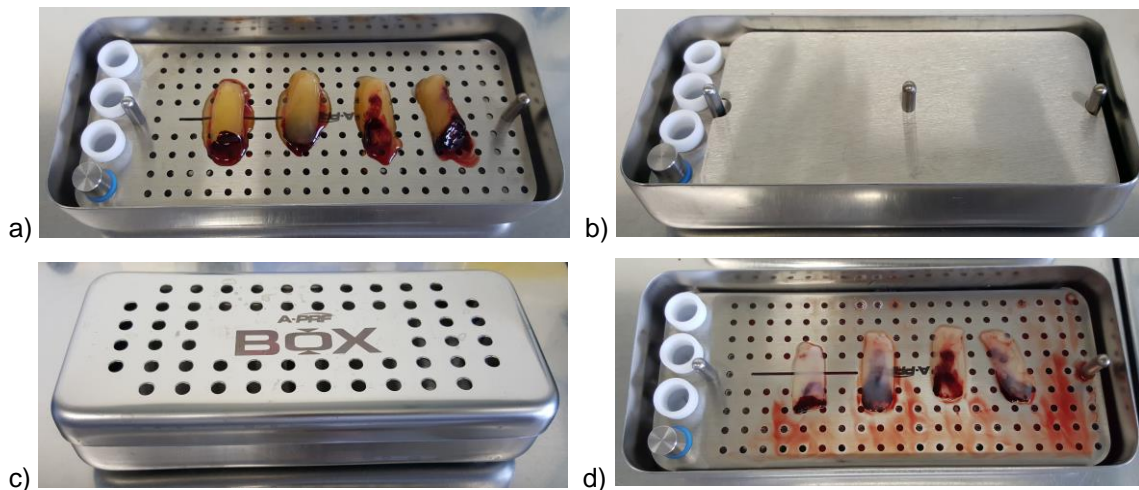


Abb. 7: A-PRF+ Koagel werden in der BoX zu Membranen gepresst.

- a) Vier A-PRF+ Koagel eines Probanden mit erhaltenem Buffy-Coat auf dem BoX-Gitter.
- b) Das Tray wirkt wie ein Stempel auf die A-PRF+ Koagel und presst das Exsudat heraus.
- c) Die mit dem BoX-Deckel verschlossene BoX.
- d) Nach 10 min liegen gleichmäßig dicke, gepresste A-PRF+ Membranen vor.

Das Exsudat, welches während des Pressens (10 min) aus dem PRF und durch das Gitter gedrückt wurde, sammelte sich am Boden der BoX. Es wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend für 8 min bei 5,5 g zentrifugiert. Sämtliche Zellen und Zelltrümmer setzten sich dabei am Boden ab. Die darüber befindliche Flüssigkeit, das zellfreie **Exsudat**, konnte abpipettiert und auf fünf Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilt werden. Die gesammelten Proben wurden beschriftet und bei -80° C gelagert. Von den insgesamt vier erstellten A-PRF Membranen wurden nach Erlangen des Exsudates zwei Stück verworfen und zwei in Nährmedium, zur Gewinnung weiterer Proben, inkubiert (siehe 3.2.5).

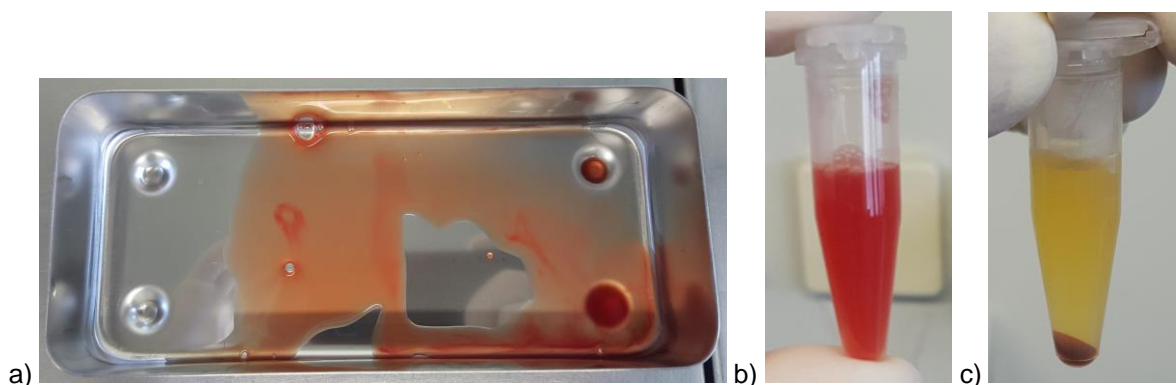


Abb. 8: A-PRF+ Exsudat vor und nach erneuter Zentrifugation

- a) Das beim Pressen der A-PRF+ Koagel gewonnene Exsudat am Boden der BoX.
- b) Gesammeltes A-PRF+ Exsudat eines Probanden in einem Eppendorfgefäß. Es enthält noch Zellen, Zelltrümmer und partikuläre Bestandteile.
- c) Gesammeltes A-PRF+ Exsudat eines Probanden in einem Eppendorfgefäß nach erneuter Zentrifugation (8 min bei 5,5 g). Die zellulären und partikulären Bestandteile sind am Boden abgeschieden.

3.2.5 Inkubation von A-PRF+ Membranen in Medium und Gewinnung des Überstandes

Pro Proband wurde eine sterile 6-Well Kulturplatte unter dem Abzug geöffnet und die beiden mittleren Wells mit Kulturmedium befüllt:

In das eine wurden 2 ml Medium pipettiert und eine A-PRF+ Membran gelegt. Dieses Well diente im Folgenden zur Durchführung des **2 ml Tests**. In das andere wurden 6 ml Medium pipettiert und ebenfalls eine A-PRF+ Membran gelegt. Dieses Well diente im Folgenden zur Durchführung des **6 ml Tests**.

Die vier restlichen Wells wurden, zur Reduzierung des Flüssigkeitsverlustes durch Verdunstung, mit jeweils 1ml PBS befüllt. Im Anschluss wurde die Kulturplatte abgedeckt (Zeitpunkt 0, 0 h) und für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

Nach einem Tag (Zeitpunkt 1, nach 24 h) wurden beim 2 ml Test 2 ml Überstand abpipettiert, in einem Eppendorfgefäß gesammelt und 2 ml frisches Medium in das Well gefüllt. Beim 6 ml Test wurden ebenfalls 2 ml Überstand abpipettiert und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Ein Auffüllen mit frischem Medium erfolgte hier jedoch nicht. Danach wurde die Kulturplatte für weitere 24h im Brutschrank inkubiert. Die beiden mit Überstand befüllten Eppendorfgefäße wurden für 8 min bei 5,5 g zentrifugiert. Sämtliche Zellen, Zelltrümmer und Ablösungen aus der A-PRF+ Membran setzten sich dabei am Boden ab. Die darüber befindlichen Flüssigkeiten, im Folgenden als **Probe 2.1** (vom 2 ml Test) und **Probe 6.1** (vom 6 ml Test) bezeichnet, wurden abpipettiert und gleichmäßig auf fünf Eppendorfgefäße verteilt. Die gesammelten Proben wurden beschriftet und bei - 80° C gelagert.

Dieses Vorgehen wurde am darauffolgenden Tag (Zeitpunkt 2, nach 48 h) wiederholt, wobei beim 2 ml Test wieder 2 ml frisches Medium nach Abpipettieren des Überstandes hinzugefügt wurden und beim 6 ml Versuch nach Abpipettieren von 2 ml Überstand kein neues Medium dazugegeben wurde. So wurden beim 2 ml Test die **Probe 2.2** und beim 6 ml Test die **Probe 6.2** gewonnen und eingefroren.

Nach einem weiteren Tag (Zeitpunkt 3, nach 72 h), dem letzten Tag der Inkubationszeit, wurden die Überstände erneut abpipettiert und die Kulturplatte mit den zwei weiterhin stabilen Membranen entsorgt. Dem oben beschriebenen Vorgehen folgend, wurden aus den Überständen beim 2 ml Test die **Probe 2.3** und beim 6 ml Test die **Probe 6.3** gewonnen und eingefroren.

(Zur Gewinnung weiteren Probematerials für die Eingangsversuche wurden bei drei Probanden insgesamt 4 Membranen inkubiert, sodass die doppelte Anzahl an Proben gewonnen wurde.)

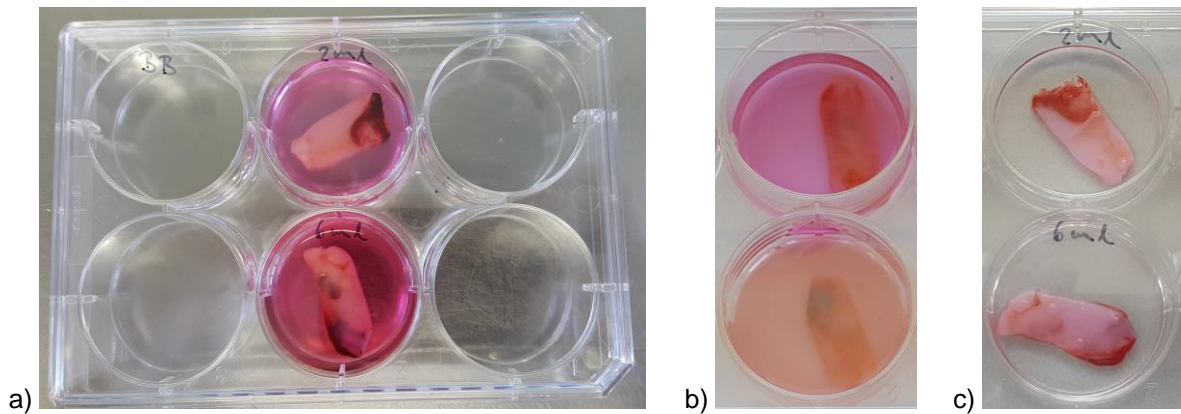


Abb 9: A-PRF+ Membranen während ihrer Inkubation in Medium zu verschiedenen Zeitpunkten.
a) Zu Beginn (Zeitpunkt 0) ist die Membran beim 2 ml Test in 2 ml Medium und die Membran beim 6 ml Test in 6 ml Medium inkubiert.
b) Nach 72 h (Zeitpunkt 3, vor dem letzten Abpipettieren) befindet sich die Membran des 2 ml Test in 2 ml, noch relativ frischem, erst 24 h altem Medium. Die Membran des 6 ml Versuchs befindet sich dagegen in den verbliebenen 2 ml Medium, das bereits 72 h alt ist. Ein deutlicher Farbunterschied mit Trübung des Restmediums des 6 ml Versuchs ist zu erkennen.
c) Nach 72 h und Entfernung der Mediumüberstände sind die A-PRF+ Membranen stabil und nicht aufgelöst.

3.2.6 Nachweis von Wachstumsfaktoren mittels Sandwich-ELISA

Für jeden der acht Probanden lagen neun unterschiedliche Proben vor (Serum, i-PRF, A-PRF+ Exsudat, Probe 2.1, Probe 2.2, Probe 2.3, Probe 6.1, Probe 6.2, Probe 6.3). Mit Hilfe der ELISA Technik (DuoSet ELISA Development Systems von R&D Systems) erfolgte die quantitative Bestimmung der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren PDGF, VEGF und GDF-15.

Auf Mikrotiterplatten (96-Well, Anordnung 8x12) wurden pro Probe und Referenzstandard je drei Wells (Triplett) beschichtet und der dabei gemessene Mittelwert für die Auswertung verwendet.

Für jede Versuchsreihe zum Nachweis eines Wachstumsfaktors wurden vier Mikrotiterplatten genutzt:

- eine für den Eingangsversuch
- eine für die Proben: Serum, i-PRF, A-PRF+ Exsudat
- eine für den 2 ml Versuch: Probe 2.1, Probe 2.2, Probe 2.3
- eine für den 6 ml Versuch: Probe 6.1, Probe 6.2, Probe 6.3.

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der ELISA ist ein gängiges Verfahren, um die Konzentration eines bestimmten Antigens (z. B. Protein, Zytokin, Hormon) in einer Probe zu bestimmen. Wie der Name vermuten lässt, erfolgt der Nachweis durch eine enzymabhängige Reaktion, bei der in Anwesenheit des Antigens ein entsprechender Farbumschlag entsteht. Die Farbintensität korreliert dabei mit der Menge des Antigens, kann mit einem Photometer gemessen werden und Auskunft über die Konzentration geben (96).

Um das gesuchte Antigen gezielt aus der Probe heraus zu selektieren, nutzt man die von Immunkomplexen bekannte spezifische Reaktion zwischen Antigen und Antikörper. Zu Beginn wird der Boden einer Mikrotiterplatte mit einem sogenannten Coating-Antikörper (monoklonal), der spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist, beschichtet. Nach Zugabe der Probe bindet folglich nur das entsprechende Antigen fest an den Coating-Antikörper. Alle anderen Bestandteile aus der Probe können abgewaschen werden. Auf diesen Antikörper-Antigen-Komplex wird nun ein weiterer Antikörper (Detection-Antikörper) gegeben, der an die freie Stelle des Antigens bindet. Nach erneutem Waschen liegen nur noch immobilisierte, sandwichartig geschichtete Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe vor (96, 97). Bei manchen ELISA Systemen ist der Detection-Antikörper bereits mit einem Enzym verknüpft, was jedoch mit einem aufwändigen und kostspieligen Herstellungsverfahren verbunden ist. Bei dem im Versuch genutzten DuoSet Elisa trägt der Detection-Antikörper am konstanten Ende einen Biotin-Rest. Erst daran wird während eines weiteren Arbeitsschrittes ein Enzym (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt, wobei Streptavidin als Verbindungselement dient. Ein zugegebenes Substrat wird dann von dem Enzym umgesetzt, was zu einer Verfärbung führt, deren Intensität proportional zur Menge der vorhandenen Enzym-Moleküle (und Antigene) ist und mit Hilfe eines Photometers gemessen wird. Um von dieser unspezifischen Angabe einer Farbintensität einen Rückschluss auf die Konzentration des Antigens ziehen zu können, muss, neben den Proben unbekannter Konzentration, ein Referenzstandard bekannter Konzentration mitlaufen. Anhand dessen Verfärbung mit zugehöriger Konzentration wird eine Kalibrierungskurve erstellt, über die man die Probenkonzentration ableiten kann (98, 99).

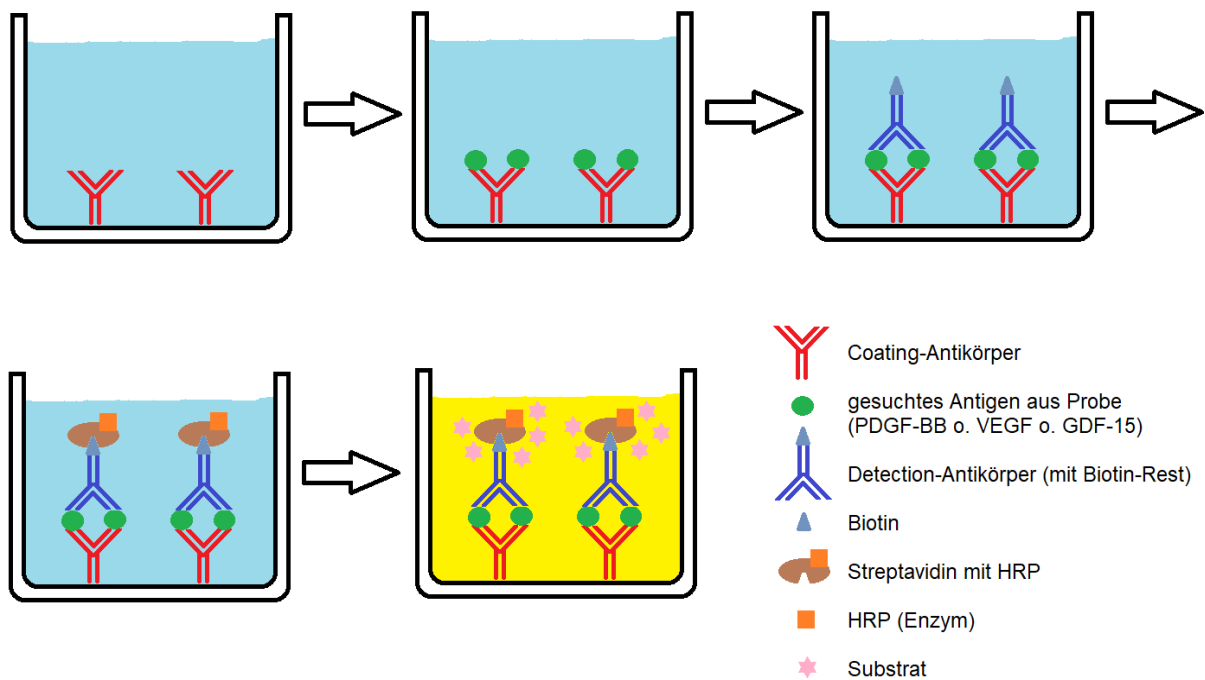


Abb. 10: Schematische Abbildung des beschriebenen DuoSet ELISAs.

(Quelle: Eigene Darstellung)

Die Anwendung der verwendeten DuoSet Elisa erfolgte entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen **General ELISA Protocol**:

- 1) Der Capture Antibody wurde in der entsprechenden Arbeitskonzentration angesetzt und damit die 96-Well Mikrotiterplatten beschichtet. Pro Well wurden hierzu je 100 μL mit einer Multipipette gegeben. Die Platte wurde anschließend mit einer Folie abgeklebt und über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur inkubiert.
- 2) Am darauffolgenden Tag wurde die Platte gründlich gewaschen, um alle ungebundenen Antikörper zu entfernen. Hierzu wurde jedes Well drei Mal mit Wash Buffer (Wasch Lösung: 0,05 % Tween® 20 in PBS) befüllt und danach entleert. Zur vollständigen Entfernung der Wasch Lösung wurde die Mikrotiterplatte gegen Zellstoffpapier geklopft.
- 3) Anschließend wurde die Platte mit Reagent Diluent blockiert, abgeklebt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Zugabe von BSA (gelöst in PBS) ist notwendig um potentiell frei gebliebene Oberflächen in den Wells (zwischen den Capture Antibody) aufzufüllen und dadurch falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.
- 4) Danach wurde die Platte gründlich gewaschen, um alle ungebundenen Moleküle zu entfernen (siehe Schritt 2).

5) Während der einstündigen Wartezeit bei Schritt 3 wurden die Proben aus dem Gefrierschrank geholt, schonend auf Eis lagernd aufgetaut und mit Reagent Diluent (nachfolgend mit RD abgekürzt) auf die jeweilige Arbeitskonzentration verdünnt. Außerdem wurde der Referenzstandard mit entsprechender Verdünnungsreihe angesetzt.

Im Anschluss wurden Proben, Standard und Nullprobe (Reagent Diluent) in die Wells pipettiert (je Well 100 µL mit Einzelpipette). Für jedes Triplet wurde dabei eine neue Pipettenspitze verwendet. Die Mikrotiterplatte wurde abgeklebt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

6) Danach wurde die Platte gründlich gewaschen, um alle ungebundenen Moleküle zu entfernen (siehe Schritt 2).

7) Im Anschluss wurde der Detection Antibody in der entsprechenden Arbeitskonzentration angesetzt und auf die 96 Wells verteilt. Pro Well wurden hierzu je 100 µL mit einer Multipipette gegeben. Die Platte wurde anschließend mit einer neuen Folie abgeklebt und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

8) Danach wurde die Platte gründlich gewaschen, um alle ungebundenen Antikörper zu entfernen (siehe Schritt 2).

9) Streptavidin-HRP wurde auf die jeweilige Arbeitskonzentration verdünnt und davon in jedes Well 100 µL pipettiert (Multipipette). Die Platte wurde abgeklebt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

10) Danach wurde die Platte gründlich gewaschen, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen (siehe Schritt 2).

11) Aus Color Reagent A (H₂O₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) wurde die Substrate Solution angesetzt (1 : 1 Mischung) und davon in jedes Well 100 µL pipettiert (Multipipette). Die Platte wurde abgeklebt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

12) Abschließend wurden in jedes Well 50 µL der Stop Solution (2 N H₂SO₄) gegeben (Multipipette) und dadurch die enzymatische Reaktion beendet.

13) Die Messung der Färbung erfolgte mit einem Mikroplattenreader (VersaMax™ ELISA Microplate Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Um optische Negativeinflüsse durch die Kunststoffplatte zu reduzieren, erfolgte eine Wellenlängenkorrektur. Hierzu wurde zusätzlich bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und dieser Wert vom Messwert bei 450 nm subtrahiert.

3.2.7 Eingangsversuch zur Festlegung der Verdünnung

Bei komplexen Proben wie Serum oder Plasma muss davon ausgegangen werden, dass sich die enthaltenen Moleküle gegenseitig beeinflussen oder die Konzentration des nachzuweisenden Antigens die Sättigung des Capture Antibodys übersteigt. Deshalb ist es empfehlenswert vor der endgültigen Messung, in einem Eingangsversuch die ideale Probenverdünnung zu ermitteln.

Für jeden nachzuweisenden Wachstumsfaktor wurde deshalb ein Eingangsversuch durchgeführt. Die Durchführung erfolgte entsprechend des zuvor beschriebenen General ELISA Protocol. Die Verdünnung (mit RD) und Verteilung der einzelnen Proben (Überschussmaterial von 3 Probanden) erfolgte nach folgendem Schema:

Well	1-3	4-5	7-9	10-12
A	High-Standard Standard 100 %	i-PRF 100 %	Serum 25 %	Med. 6.1 100 %
B	Standard 50 %	i-PRF 50 %	Med. 2.1. 100 %	Med. 6.1 50 %
C	Standard 25 %	i-PRF 25 %	Med. 2.1 50 %	Med. 6.2 100 %
D	Standard 12,5 %	Exsudat 100 %	Med. 2.1 25 %	Med. 6.2 50 %
E	Standard 6,25 %	Exsudat 50 %	Med. 2.2 100 %	Med. 6.2 25 %
F	Standard 3,13 %	Exsudat 25 %	Med. 2.2 50 %	Med. 6.3 100 %
G	Standard 1,56 %	Serum 100 %	Med. 2.3 100 %	Med. 6.3 50 %
H	Nullprobe Standard 0 %	Serum 50 %	Med. 2.3 50 %	Med. 6.3 25 %

Tabelle 9: Eingangsversuch zur Festlegung der Verdünnung der Proben. Verteilung der unterschiedlichen Proben und des Referenzstandard mit unterschiedlichen Verdünnungen mit RD auf einer 96-Well Mikrotiterplatte.

3.2.8 Nachweis von PDGF-BB

Die im Human PDGF-BB DuoSet ELISA-Kit enthaltenen Reagenzien wurden zu Beginn einer Versuchsreihe entsprechend der Herstellerangaben (Certificate of Analysis) angesetzt und bei 5 °C gelagert.

Reagenz	Konzentration in der Viole
Capture Antibody (human PDGF-BB capture reagent)	72,0 µg / 1000 µL PBS
Detection Antibody (biotinylated goat anti-human PDGF-BB)	72,0 µg / 1000 µl RD
Standard (recombinant human PDGF-BB)	85,0 ng / 500 µl RD

Der Nachweis von PDGF-BB in den einzelnen Proben erfolgte nach dem unter 3.2.2 beschriebenen General ELISA Protocol. Für jeden durchgeführten ELISA wurden die angesetzten Reagenzien auf die vorgegebenen Arbeitskonzentrationen verdünnt.

Reagenz	Arbeitskonzentration
Capture Antibody (human PDGF-BB capture reagent)	0,4 µg / 1000 µL PBS
Detection Antibody (biotinylated goat anti-human PDGF-BB)	0,4 µg / 1000 µL RD
Streptavidin-HRP	1 : 200 Verdünnung mit RD
Reagent Diluent Concentrate 2	1 : 10 Verdünnung mit Aquadest

Ausgehend von den Ergebnissen des Eingangsversuchs, wurden folgende Verdünnungen für die Proben und High-Standards (mit entsprechender absteigender Verdünnungsreihe) gewählt.

ELISA für Serum, i-PRF, A-PRF+ Exsudat	
High-Standard	1000 pg / 1000 µL RD
Serum	1 : 10 Verdünnung mit RD
i-PRF	1 : 2 Verdünnung mit RD
A-PRF+ Exsudat	1 : 10 Verdünnung mit RD

ELISA für 2 ml Versuch	
High-Standard	2000 pg / 1000 µL RD
Probe 2.1	1 : 5 Verdünnung mit RD
Probe 2.2	1 : 5 Verdünnung mit RD
Probe 2.3	1 : 5 Verdünnung mit RD

ELISA für 6 ml Versuch	
High-Standard	2000 pg / 1000 µL RD
Probe 6.1	1 : 5 Verdünnung mit RD
Probe 6.2	1 : 5 Verdünnung mit RD
Probe 6.3	1 : 5 Verdünnung mit RD

3.2.9 Nachweis von VEGF

Die im Human VEGF DuoSet ELISA-Kit enthaltenen Reagenzien wurden zu Beginn einer Versuchsreihe entsprechend der Herstellerangaben (Certificate of Analysis) angesetzt und bei 5 °C gelagert.

Reagenz	Konzentration in der Viole
Capture Antibody (mouse anti-human VEGF)	60,0 µg / 500 µL PBS
Detection Antibody (biotinylated goat Anti-Human VEGF)	6,0 µg / 1000 µl RD
Standard (recombinant human VEGF)	60,0 ng / 500 µl RD

Der Nachweis von VEGF in den einzelnen Proben erfolgte nach dem zuvor beschriebenen General ELISA Protocol. Für jeden durchgeführten ELISA wurden die angesetzten Reagenzien auf die vorgegebenen Arbeitskonzentrationen verdünnt.

Reagenz	Arbeitskonzentration
Capture Antibody (mouse anti-human VEGF)	1,0 µg / 1000 µL PBS
Detection Antibody (biotinylated goat Anti-Human VEGF)	0,1 µg / 1000 µl RD
Streptavidin-HRP	1 : 40 Verdünnung mit RD
Reagent Diluent Concentrate 2	1 : 10 Verdünnung mit Aquadest

Ausgehend von den Ergebnissen des Eingangsversuchs, wurden folgende Verdünnungen für die Proben und High-Standards (mit entsprechender absteigender Verdünnungsreihe) gewählt.

ELISA für Serum, i-PRF, A-PRF+ Exsudat	
High-Standard	1000 pg / 1000 µL RD
Serum	1 : 2 Verdünnung mit RD
i-PRF	1 : 2 Verdünnung mit RD
A-PRF+ Exsudat	1 : 2 Verdünnung mit RD

ELISA für 2 ml Versuch	
High-Standard	2000 pg / 1000 µL RD
Probe 2.1	pur (keine Verdünnung)
Probe 2.2	pur (keine Verdünnung)
Probe 2.3	pur (keine Verdünnung)

ELISA für 6 ml Versuch	
High-Standard	2000 pg / 1000 µL RD
Probe 6.1	pur (keine Verdünnung)
Probe 6.2	pur (keine Verdünnung)
Probe 6.3	pur (keine Verdünnung)

3.2.10 Nachweis von GDF-15

Die im Human GDF-15 DuoSet ELISA-Kit enthaltenen Reagenzien wurden zu Beginn einer Versuchsreihe entsprechend der Herstellerangaben (Certificate of Analysis) angesetzt und bei 5 °C gelagert.

Reagenz	Konzentration in der Viole
Capture Antibody (mouse anti-human GDF-15)	360,0 µg / 1000 µL PBS
Detection Antibody (biotinylated goat anti-human GDF-15)	2,25 µg / 1000 µl RD
Standard (recombinant human VEGF)	120,0 ng / 1000 µl RD

Der Nachweis von GDF-15 in den einzelnen Proben erfolgte nach dem unter 3.2.2 beschriebenen General ELISA Protocol. Für jeden durchgeführten ELISA wurden die angesetzten Reagenzien auf die vorgegebenen Arbeitskonzentrationen verdünnt.

Reagenz	Arbeitskonzentration
Capture Antibody (mouse anti-human VEGF)	2,0 µg / 1000 µL PBS
Detection Antibody (biotinylated goat Anti-Human VEGF)	12,5 ng / 1000 µl RD
Streptavidin-HRP	1 : 200 Verdünnung mit RD
Reagent Diluent Concentrate 2	1 : 10 Verdünnung mit Aquadest

Ausgehend von den Ergebnissen des Eingangsversuchs, wurden folgende Verdünnungen für die Proben und High-Standards (mit entsprechender absteigender Verdünnungsreihe) gewählt.

ELISA für Serum, i-PRF, A-PRF+ Exsudat	
High-Standard	250 pg / 1000 µL RD
Serum	1 : 2 Verdünnung mit RD
i-PRF	1 : 2 Verdünnung mit RD
A-PRF+ Exsudat	1 : 2 Verdünnung mit RD

ELISA für 2 ml Versuch	
High-Standard	250 pg / 1000 µL RD
Probe 2.1	pur (keine Verdünnung)
Probe 2.2	pur (keine Verdünnung)
Probe 2.3	pur (keine Verdünnung)

ELISA für 6 ml Versuch	
High-Standard	250 pg / 1000 µL RD
Probe 6.1	pur (keine Verdünnung)
Probe 6.2	pur (keine Verdünnung)
Probe 6.3	pur (keine Verdünnung)

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsfaktoren in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum

4.1.1 PDGF-BB in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum

Von den drei nachgewiesenen Wachstumsfaktoren liegt bei allen Proben mit Abstand am meisten PDGF-BB vor. Auffällig ist, dass abgesehen von Proband 7 die höchsten Konzentrationen im Blutserum nachweisbar sind ($M = 8475,56$ pg/ml). Im Vergleich dazu ist in den i-PRF Proben im Schnitt mehr als ein Zehntel weniger PDGF-BB messbar ($M = 804,77$ pg/ml). Im gewonnenen PRF-Exsudat liegt etwa die Hälfte des im Serum gemessenen Faktors vor ($M = 4647,22$ pg/ml).

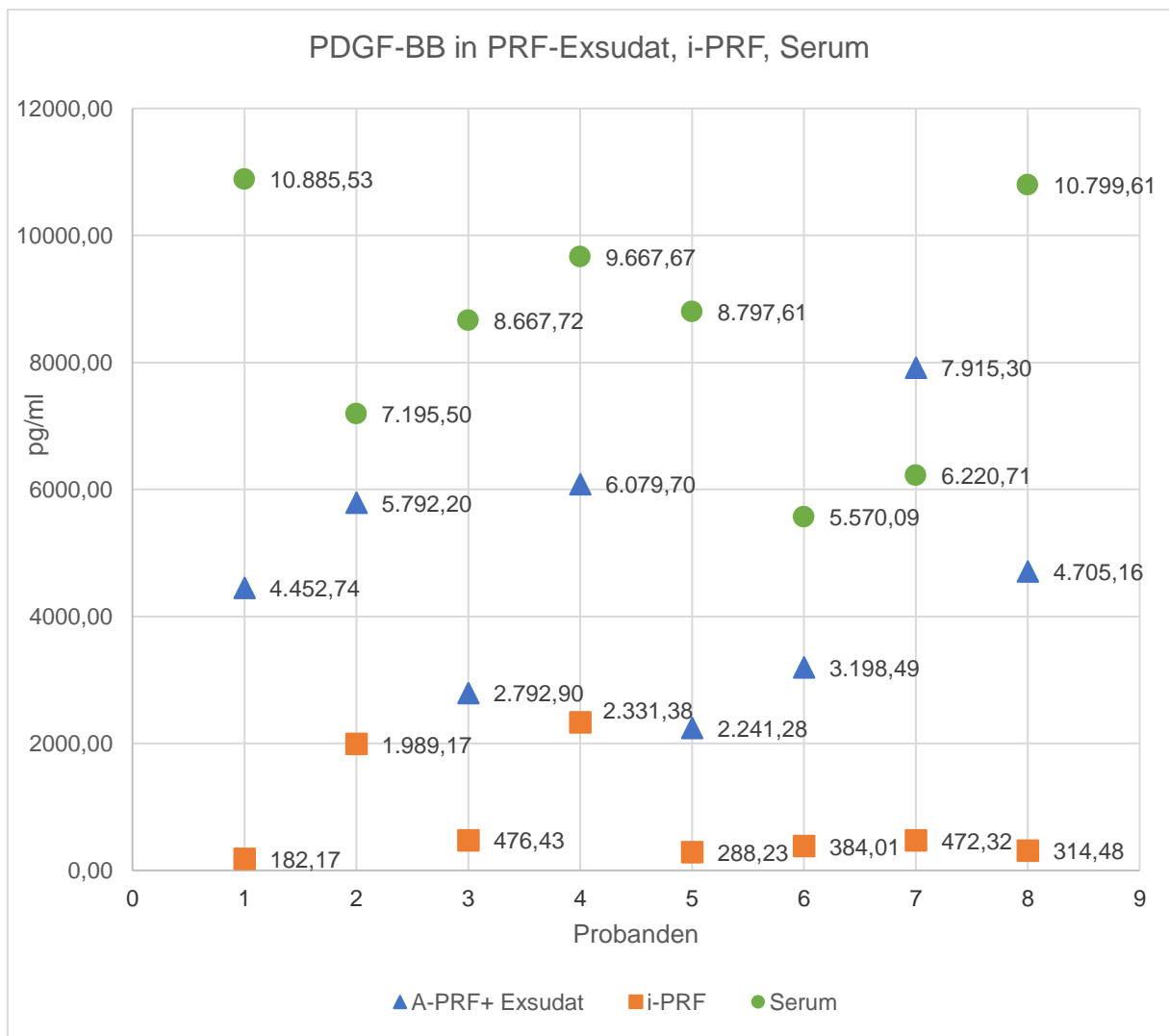


Abb. 11: Einzelwerte der in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum gemessenen PDGF-BB Konzentrationen (pg/ml) für jeden Probanden.

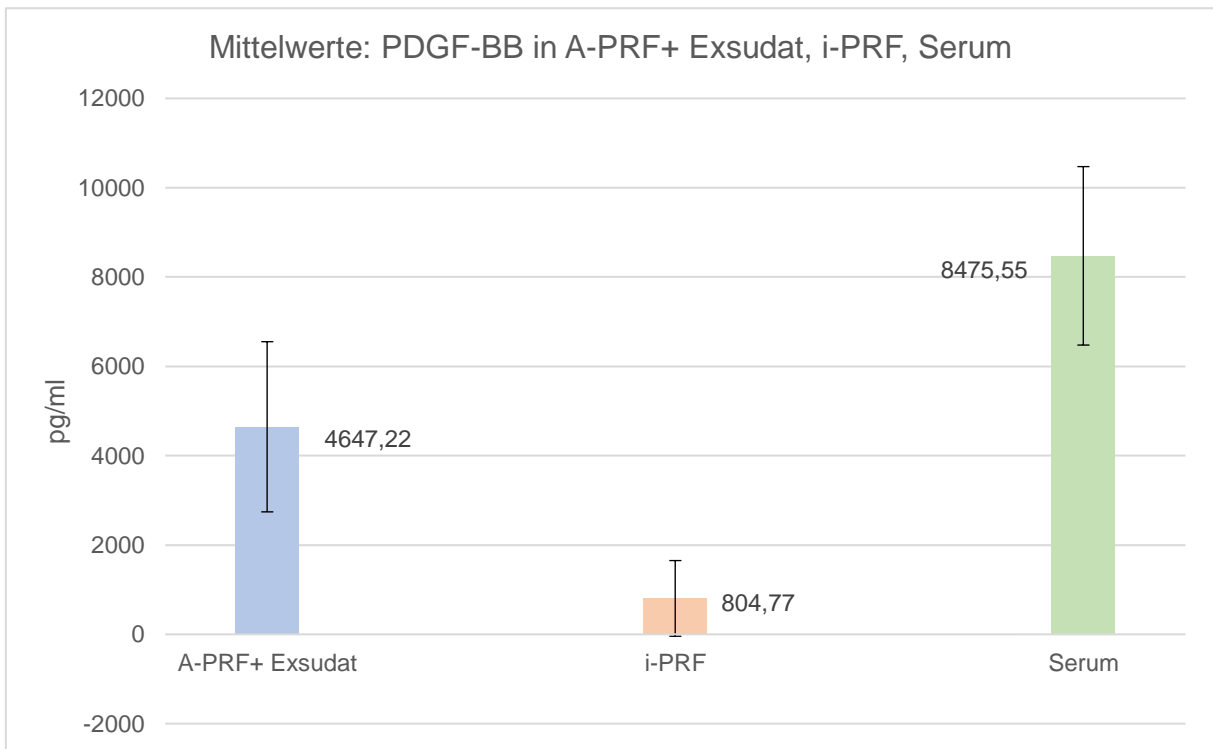


Abb. 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum gemessenen PDGF-BB Konzentrationen (pg/ml).
 $M \pm SD$ (pg/ml): A-PRF+ Exsudat ($4647,22 \pm 1905,27$), i-PRF ($804,77 \pm 847,14$), Serum ($8475,56 \pm 1997,70$).

4.1.2 VEGF in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum

Durchschnittlich werden die höchsten Konzentrationen von VEGF im A-PRF+ Exsudat gemessen ($M = 113,64$ pg/ml). Sie liegen in etwa ein Viertel über den im Blutserum gemessenen Werten ($M = 90,80$ pg/ml) und deutlich (fast die Hälfte) über den im i-PRF nachgewiesenen Konzentrationen ($M = 60,80$ pg/ml).

Auffällig ist die große Streuung der Einzelwerte in i-PRF. So fällt auf, dass bei drei Probanden (1, 4 und 7) im i-PRF gar kein VEGF nachweisbar ist, bzw. dessen Konzentration unterhalb des sensitiven Bereiches des ELISA liegt. Dem gegenüber liegen bei den Probanden 3 und 5 die gemessenen Werte in allen Blutderivaten annähernd beieinander.

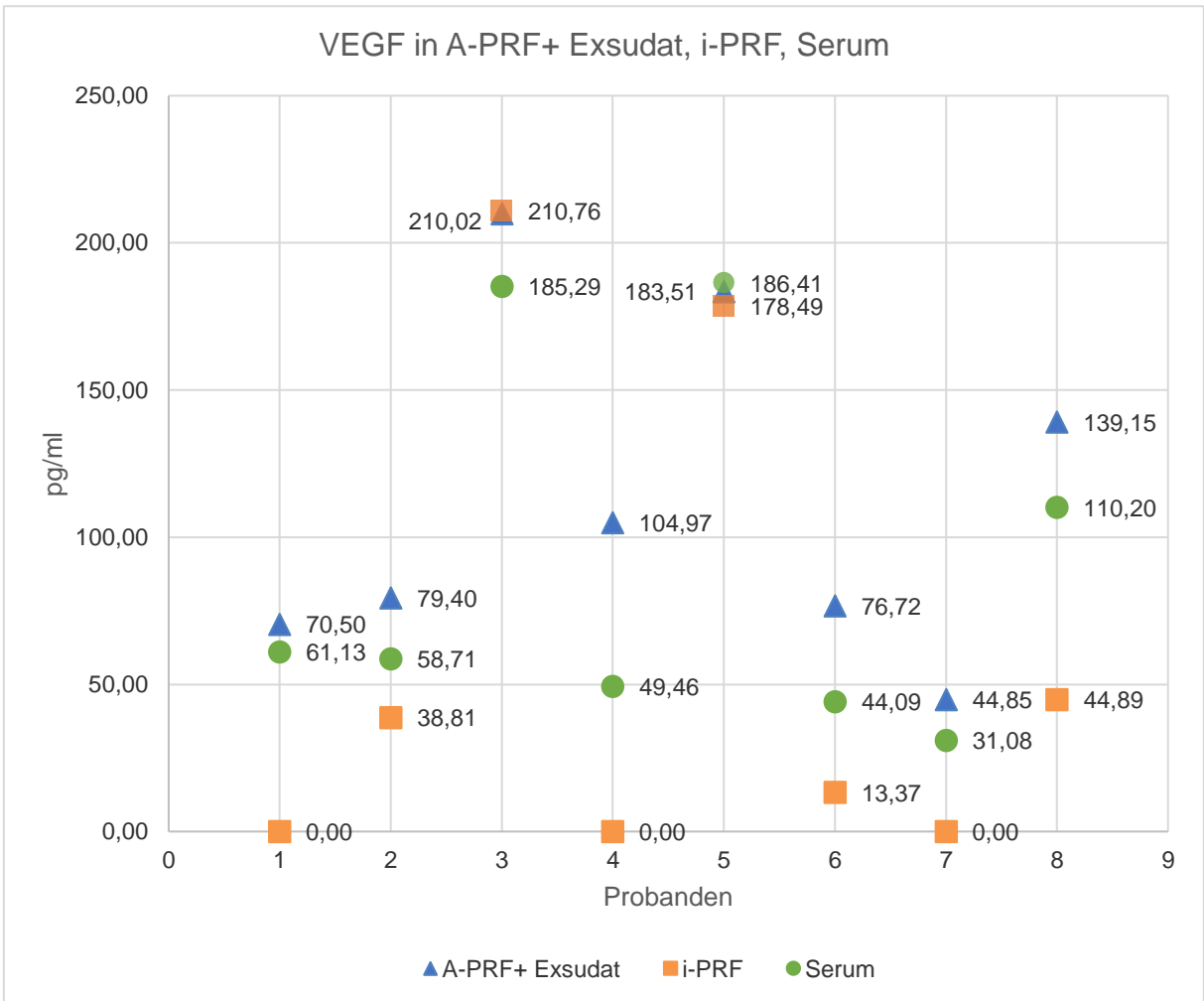


Abb. 13: Einzelwerte der in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum gemessenen VEGF Konzentrationen (pg/ml) für jeden Probanden.

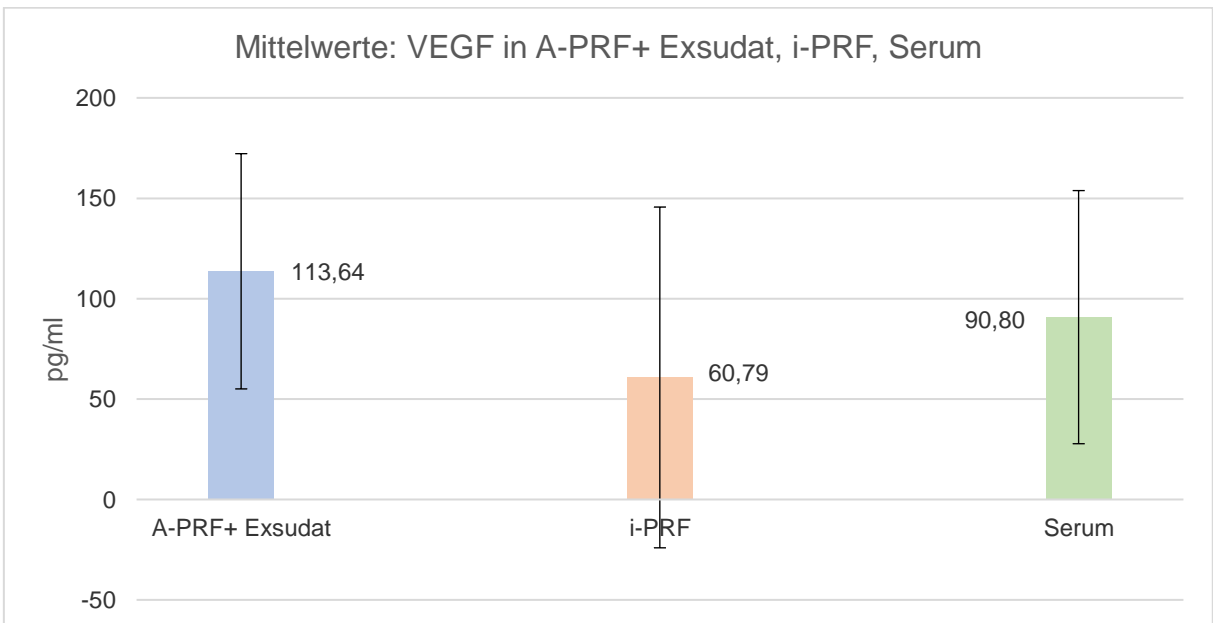


Abb. 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum gemessenen VEGF Konzentrationen (pg/ml).
 $M \pm SD$ (pg/ml): A-PRF+ Exsudat (113,64 \pm 58,59), i-PRF (60,79 \pm 84,87), Serum (90,80 \pm 63,03).

4.1.3 GDF-15 in A-PRF+ Exsudat, i-PRF, Serum

Die höchsten Konzentrationen an GDF-15 werden im Durchschnitt in den i-PRF Proben gemessen ($M = 108,59$ pg/ml), wobei sie nur unwesentlich über den Werten des untersuchten A-PRF+ Exsudats liegen ($M = 106,81$ pg/ml). Abgesehen von Proband 7 sind die Konzentrationen im Serum probandenübergreifend am niedrigsten ($M = 92,77$ pg/ml).

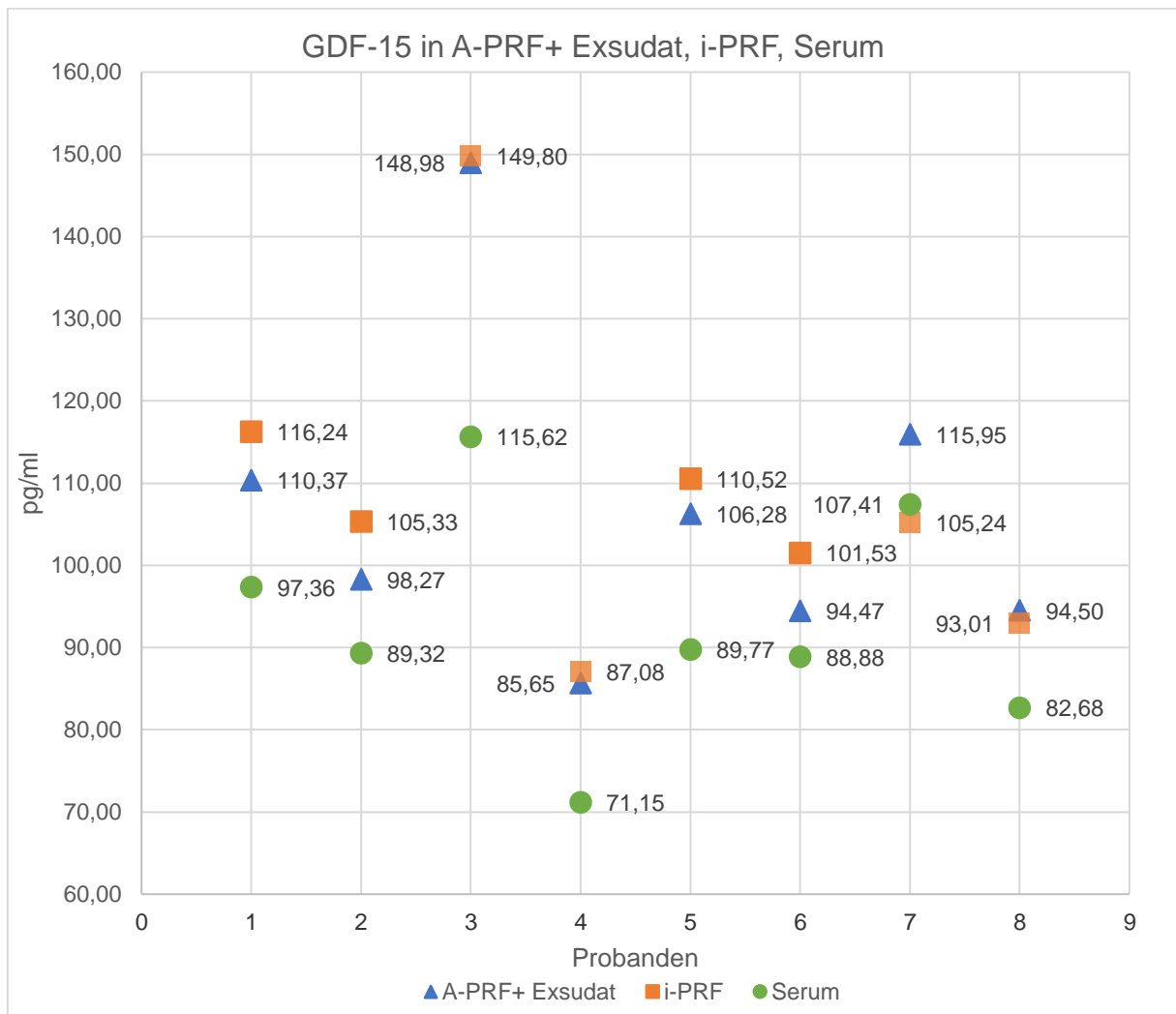


Abb. 15: Einzelwerte der in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum gemessenen GDF-15 Konzentrationen (pg/ml) für jeden Probanden.

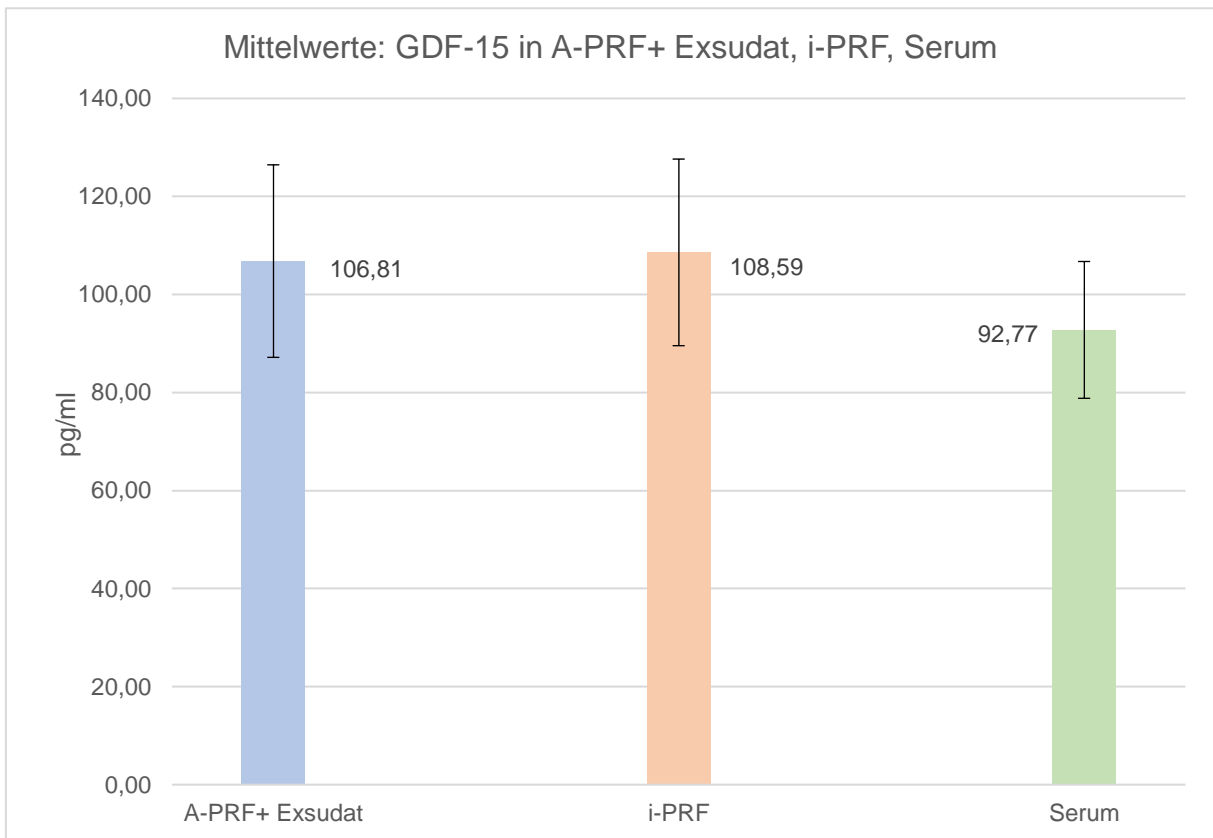


Abb. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum gemessenen GDF-15 Konzentrationen (pg/ml).

$M \pm SD$ (pg/ml): A-PRF+ Exsudat ($106,81 \pm 19,64$), i-PRF ($108,59 \pm 19,04$), Serum ($92,77 \pm 13,95$).

4.2 Freigesetzte Wachstumsfaktoren durch A-PRF+ Membranen nach 24 h, 48 h, 72 h (2 ml Versuch)

4.2.1 PDGF-BB Freisetzung (2 ml Versuch)

Die A-PRF+ Membranen der Probanden setzen nach 24 h ($M = 1513,45$ pg/ml), 48 h ($M = 2401,41$ pg/ml) und 72 h ($M = 1826,40$ pg/ml) jeweils vergleichbare Mengen an PDGF-BB frei, wobei die durchschnittliche Konzentration zwischen 24 h und 48 h am höchsten ist. Wie in Abbildung 17 und 18 zu sehen folgt die Anhäufung von PDGF-BB einer annähernd gleichmäßigen linearen Freisetzung. Lediglich bei Proband 7 sind nach zwei Tagen die sechsfache und nach drei Tagen die vierfache sezernierte Menge an PDGF-BB vorhanden.

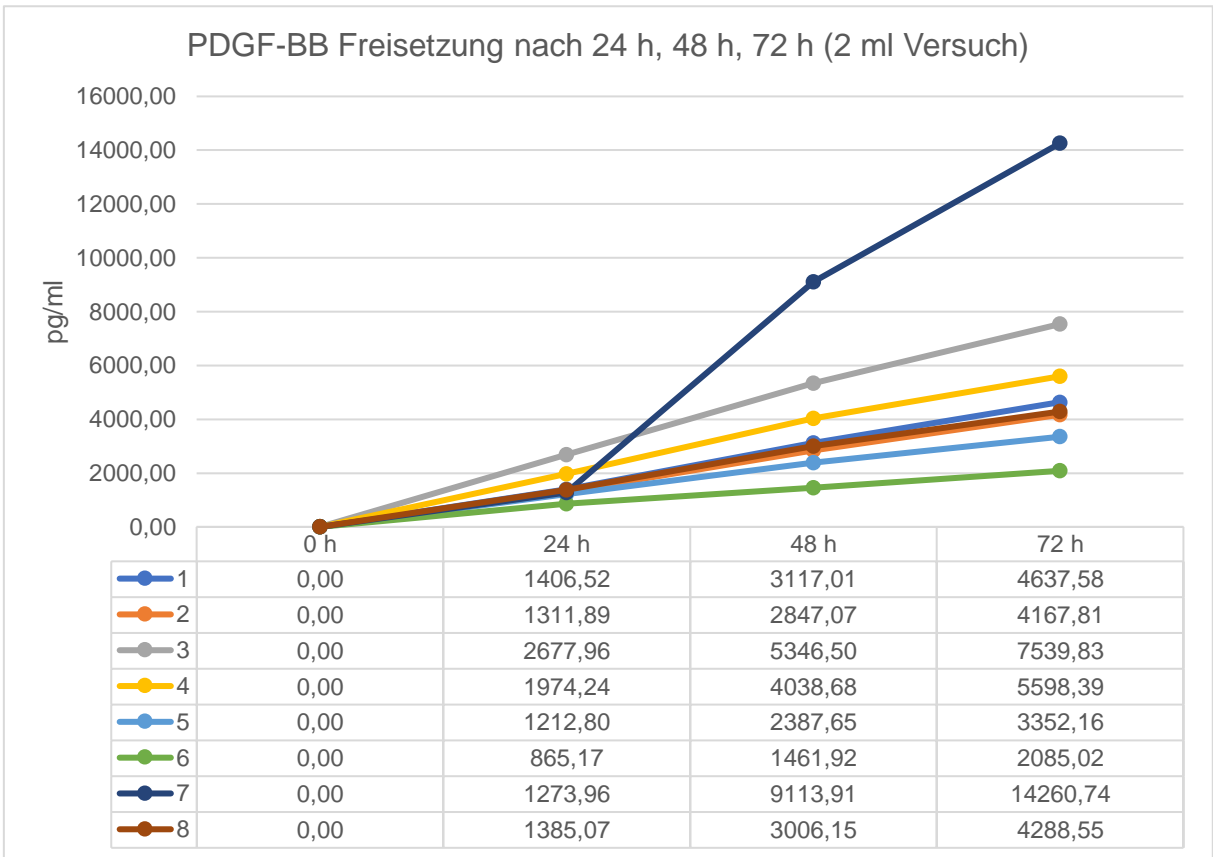


Abb. 17: Kumulierte Einzelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen PDGF-BB Freisetzung (pg/ml) für jeden Probanden.

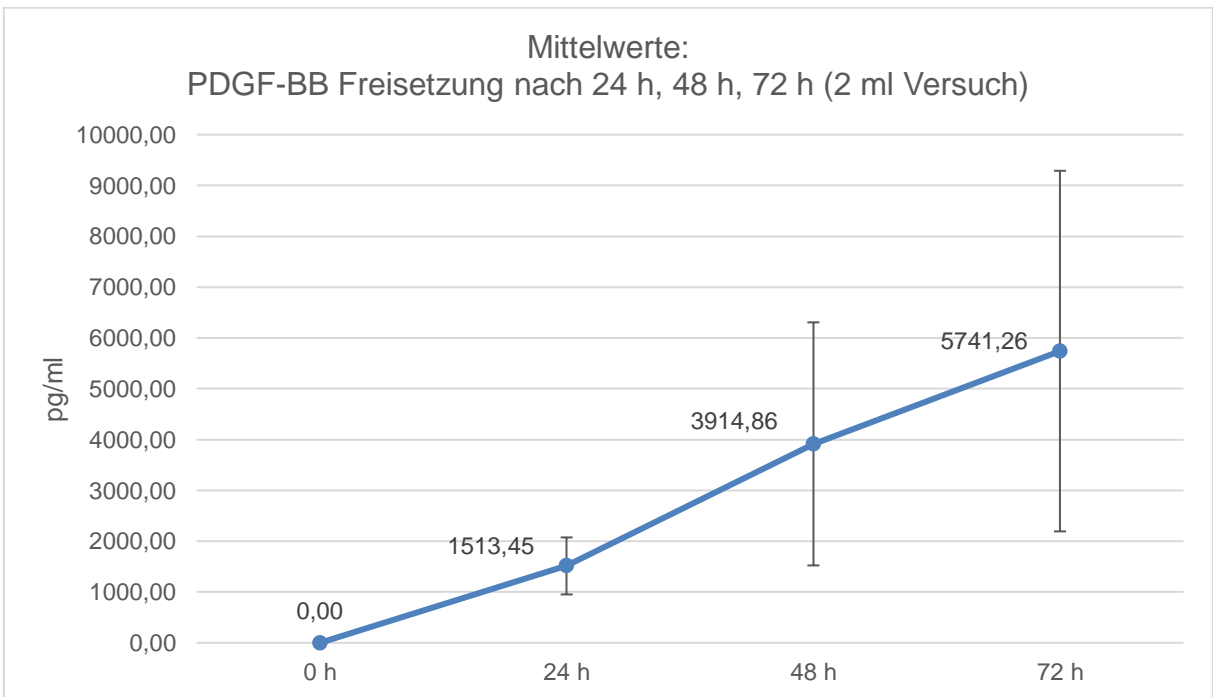


Abb. 18: Kumulierte Mittelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen PDGF-BB Freisetzung (pg/ml) mit Standardabweichungen.
 $M \pm SD$ (pg/ml): 24 h ($1513,45 \pm 561,24$), 48 h ($3914,86 \pm 2391,86$), 72 h ($5741,26 \pm 3548,18$).

4.2.2 VEGF Freisetzung (2 ml Versuch)

Insgesamt folgt die VEGF Freisetzung aller Probanden einem ähnlichen Verlauf. So ist sie einheitlich durch die inkubierten A-PRF+ Membranen in den ersten 24 h am höchsten ($M = 260,37$ pg/ml). Zwischen 24 h und 48 h wird durchschnittlich weniger als ein Drittel dieser Menge sezerniert ($M = 73,24$ pg/ml). Am dritten Tag wird bei allen Membranen der Probanden kaum noch VEGF freigesetzt ($M = 8,27$ pg/ml).

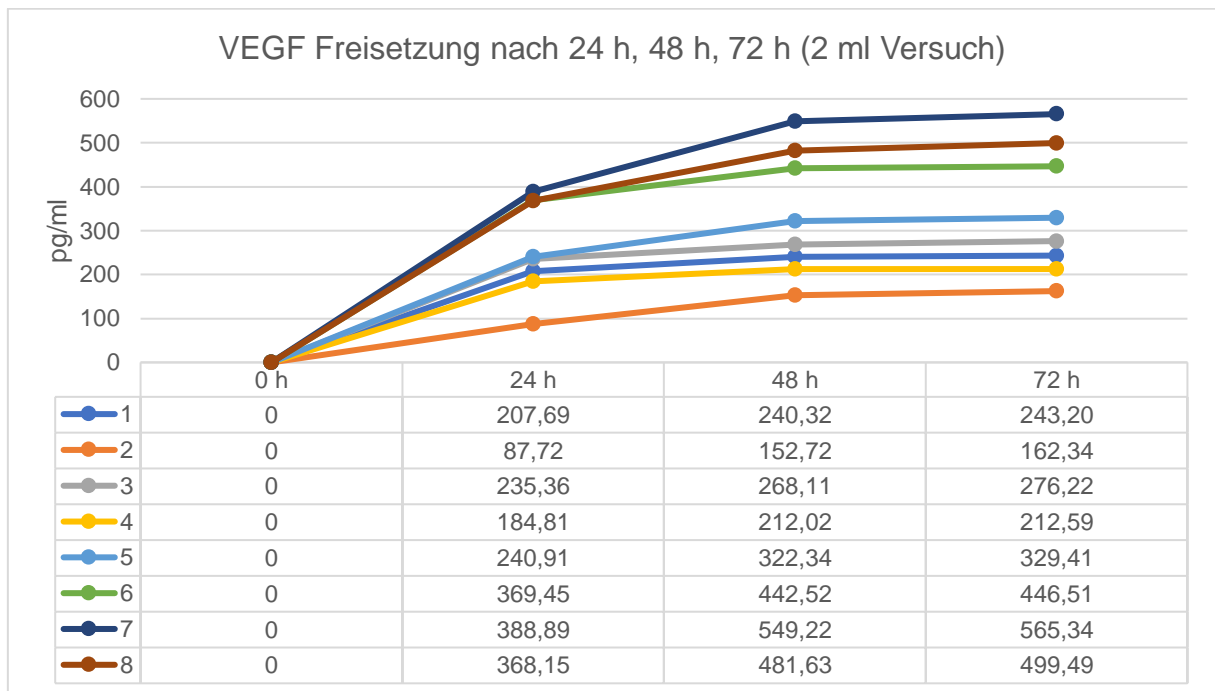


Abb. 19: Kumulierte Einzelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen VEGF Freisetzung (pg/ml) für jeden Probanden.

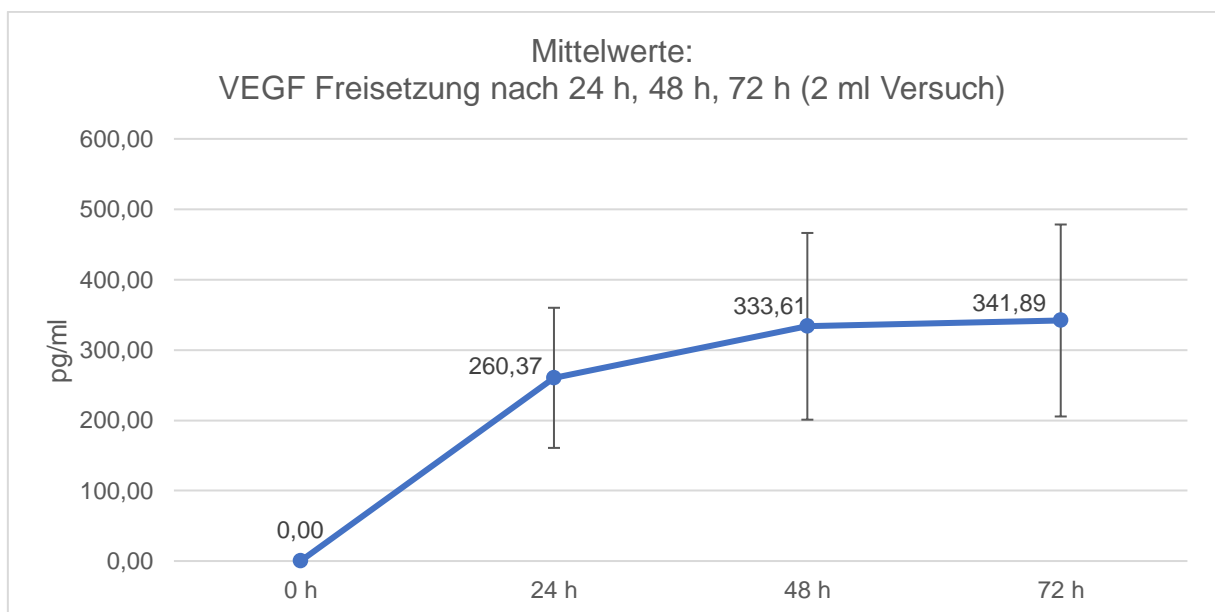


Abb. 20: Kumulierte Mittelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen VEGF Freisetzung (pg/ml) mit Standardabweichungen.
 $M \pm SD$ (pg/ml): 24 h ($260,37 \pm 99,58$), 48 h ($333,61 \pm 132,70$), 72 h ($341,89 \pm 136,42$).

4.2.3 GDF-15 Freisetzung (2 ml Versuch)

Auch der Verlauf der GDF-15 Freisetzung ist über die Probanden hinweg annähernd ähnlich. Alle untersuchten Membranen sezernieren in den ersten 24 h die größten Konzentrationen an GDF-15 ($M = 36,65 \text{ pg/ml}$). In den folgenden 24 h wird durch die PRF-Membranen einheitlich weniger als die Hälfte an GDF-15 freigesetzt ($M = 13,62 \text{ pg/ml}$). Es fällt auf, dass die neu sezernierte Menge am dritten Tag im Durchschnitt über der von Tag zwei liegt ($M = 14,85 \text{ pg/ml}$). Nur bei drei Probanden (1, 7 und 8) setzen die Membranen nach 48 h weniger GDF-15 frei.

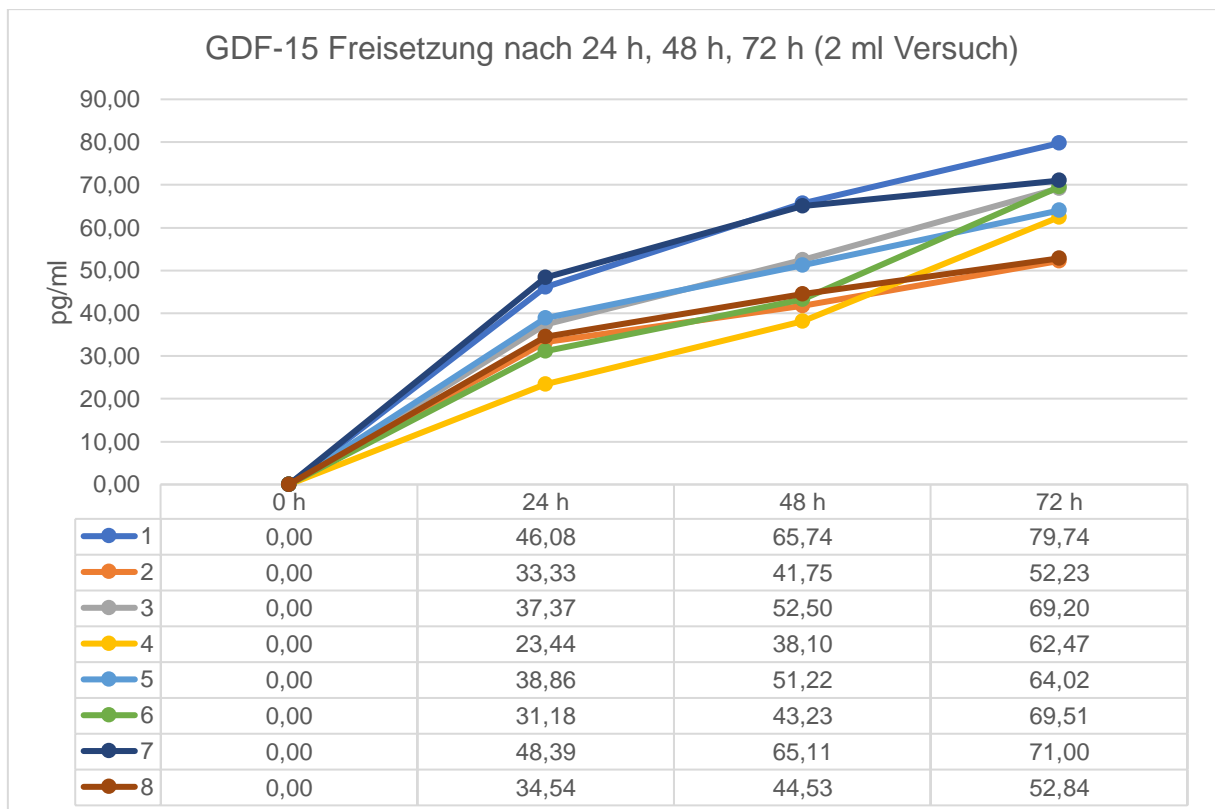


Abb. 21: Kumulierte Einzelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen GDF-15 Freisetzung (pg/ml) für jeden Probanden.

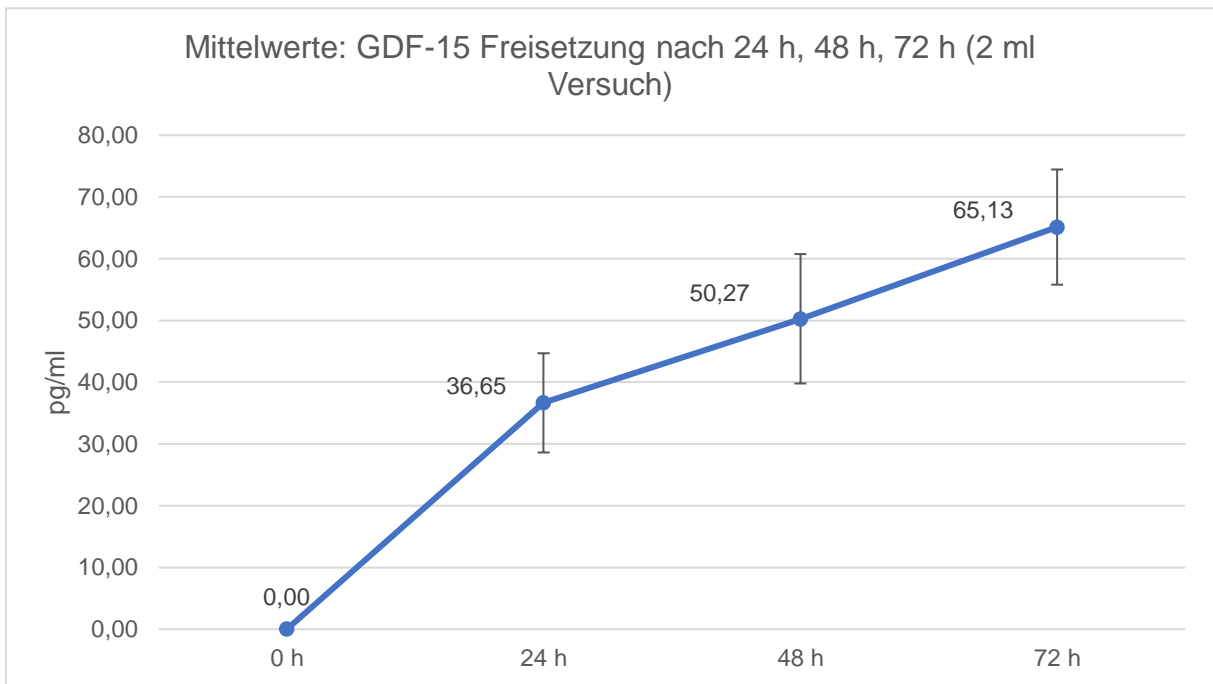


Abb. 22: Kumulierte Mittelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen GDF-15 Freisetzung (pg/ml) mit Standardabweichungen.

$M \pm SD$ (pg/ml): 24 h ($36,65 \pm 8,04$), 48 h ($50,27 \pm 10,48$), 72 h ($65,13 \pm 9,33$).

4.3 Freigesetzte Wachstumsfaktoren durch A-PRF+ Membranen nach 24 h, 48 h, 72 h (6 ml Versuch)

4.3.1 PDGF-BB Freisetzung (6 ml Versuch)

Trotz der während der Versuchsreihe abnehmenden Volumina des Inkubationsmediums, zeichnet sich ein gleichmäßiger, annähernd linearer Anstieg der gemessenen Konzentrationen ab.

Die Konzentration zum Messzeitpunkt 1 ($M = 1069,44$ pg/ml), nach 24 h, bezieht sich dabei auf ein Gesamtvolumen von 6 ml. Mit den zur Gewinnung der Proben abpipetierten 2 ml werden dabei zwar WF entfernt, die Konzentration (pg/ml) in den verbliebenen 4 ml bleibt jedoch unverändert. Die sich während der nächsten 24 h in den 4 ml ändernde Konzentration (Zunahme von $M = 1234,6$ pg/ml) wird zum Messzeitpunkt 2 nach insgesamt 48 h ($M = 2304,04$ pg/ml) ermittelt. Erneut werden zur Probengewinnung 2 ml bei gleichbleibender Konzentration entfernt. In den letzten 24 h ändert sich die Konzentration in den verbliebenen 2 ml um einen annähernd gleichen Wert wie zwischen Messzeitpunkt 1 und 2 (Zunahme von $M = 1234,42$ pg/ml) zu $M = 3538,46$ pg/ml.

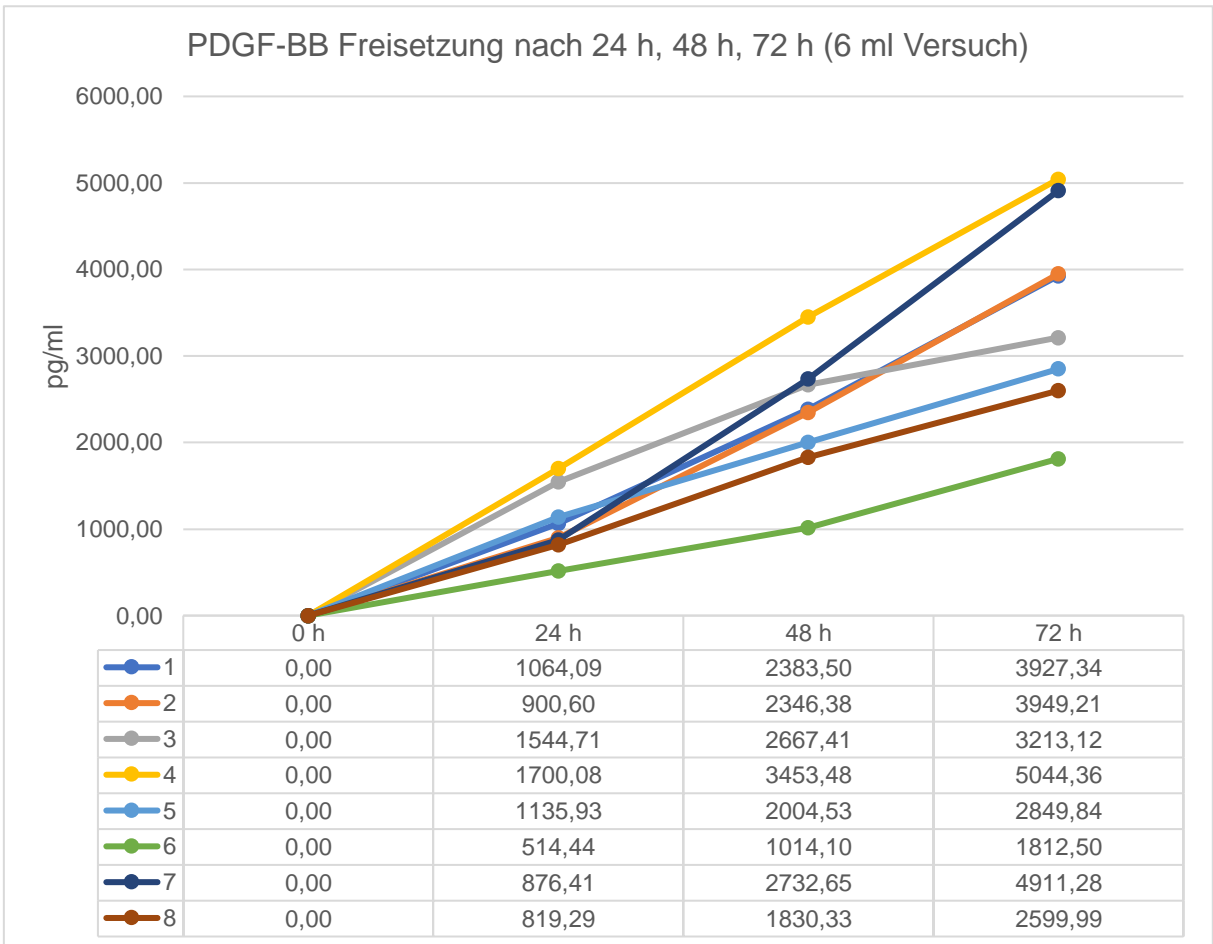


Abb. 23: Einzelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen PDGF-BB Konzentrationen (pg/ml) für jeden Probanden.

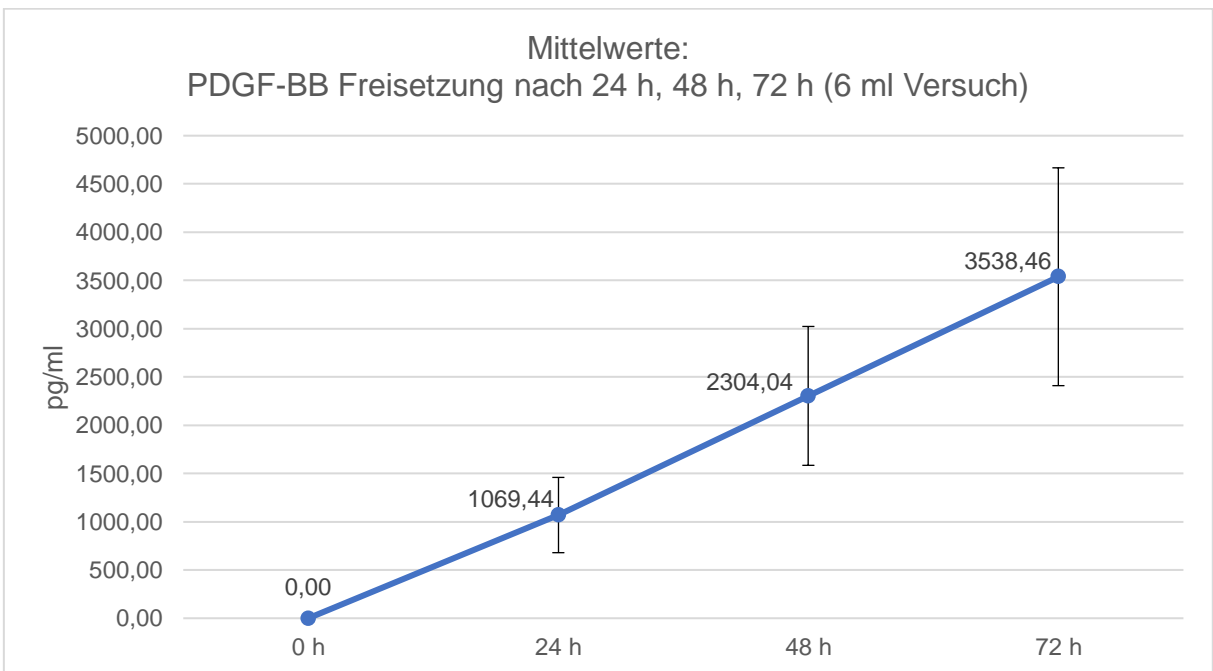


Abb. 24: Mittelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen PDGF-BB Konzentrationen (pg/ml) mit Standardabweichungen.

$M \pm SD$ (pg/ml): 24 h (1069,44 \pm 389,95), 48 h (2304,04 \pm 719,43), 72 h (3538,46 \pm 1128,34).

4.3.2 VEGF Freisetzung (6 ml Versuch)

Über den Verlauf der Messung nach 24 h ($M = 56,66$ pg/ml) und nach 48 h ($M = 91,01$ pg/ml) ist mit Ausnahme von Proband 5 bei allen anderen inkubierten Membranen eine Zunahme der VEGF Konzentrationen (Zunahme v. $M = 34,35$ pg/ml) messbar, die vor allem bei Proband 7 mit einer deutlichen Verdreifachung heraussticht.

Einheitlich bei allen Probanden ist erstaunlicherweise in den verbliebenen 2 ml zwischen 48 h ($M = 91,01$ pg/ml) und 72 h ($M = 57,77$ pg/ml) eine Abnahme der VEGF Konzentration (Abnahme v. $M = 33,24$ pg/ml) messbar.

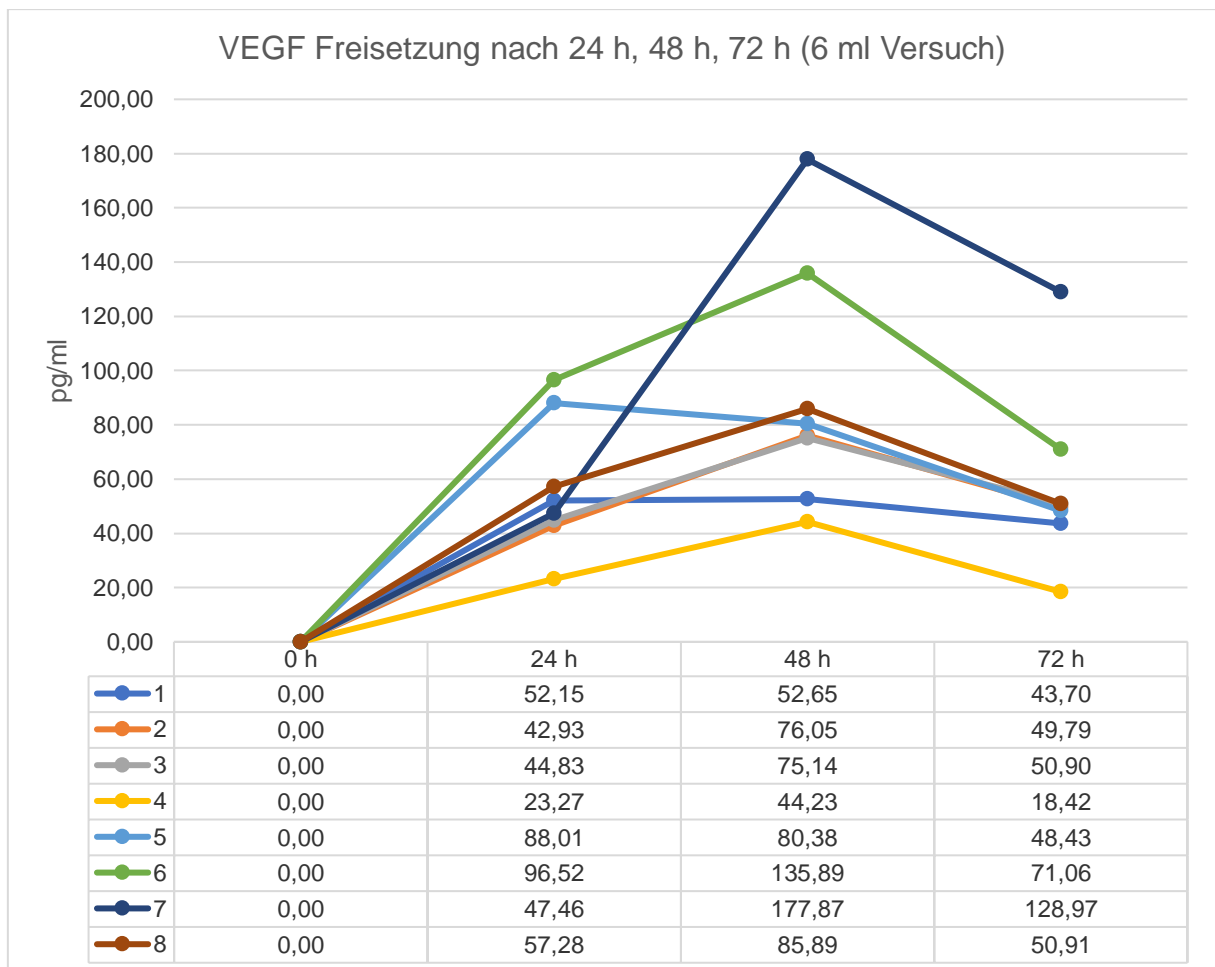


Abb. 25: Einzelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen VEGF Konzentrationen (pg/ml) für jeden Probanden.

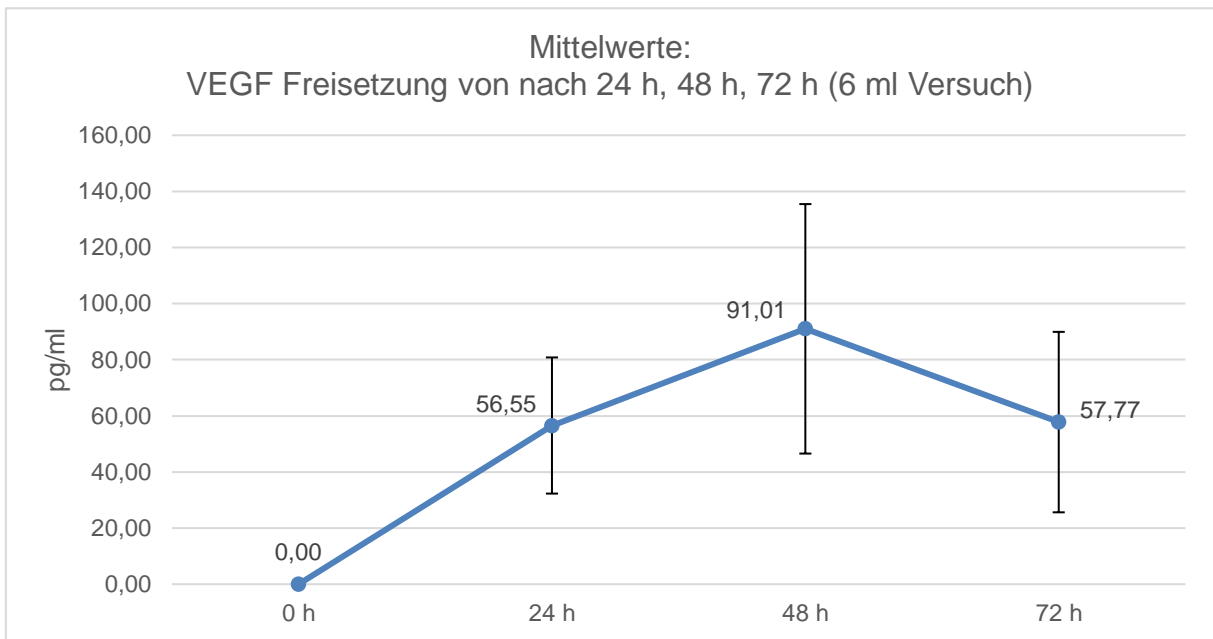


Abb. 26: Mittelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen VEGF Konzentrationen (pg/ml) mit Standardabweichungen.

$M \pm SD$ (pg/ml): 24 h (56,55 \pm 24,26), 48 h (91,01 \pm 44,46), 72 h (57,77 \pm 32,16).

4.3.3 GDF-15 Freisetzung (6 ml Versuch)

Der Verlauf der gemessenen GDF-15 Konzentrationen ist über alle Probanden hinweg ähnlich. Während nach den ersten 24 h in den anfänglichen 6 ml eine verhältnismäßig hohe Konzentration ($M = 14,1$ pg/ml) messbar ist, steigt die Konzentration während der darauffolgenden 24 h in den 4 ml Medium nur gering an ($M = 16,56$ pg/ml). Dem gegenüber zeigt sich zwischen 48 h und 72 h in den restlichen 2 ml bei allen Probanden ein erneuter Konzentrationsanstieg, der vor allem bei Probanden 4 und 6 heraussticht ($M = 25,87$ pg/ml).

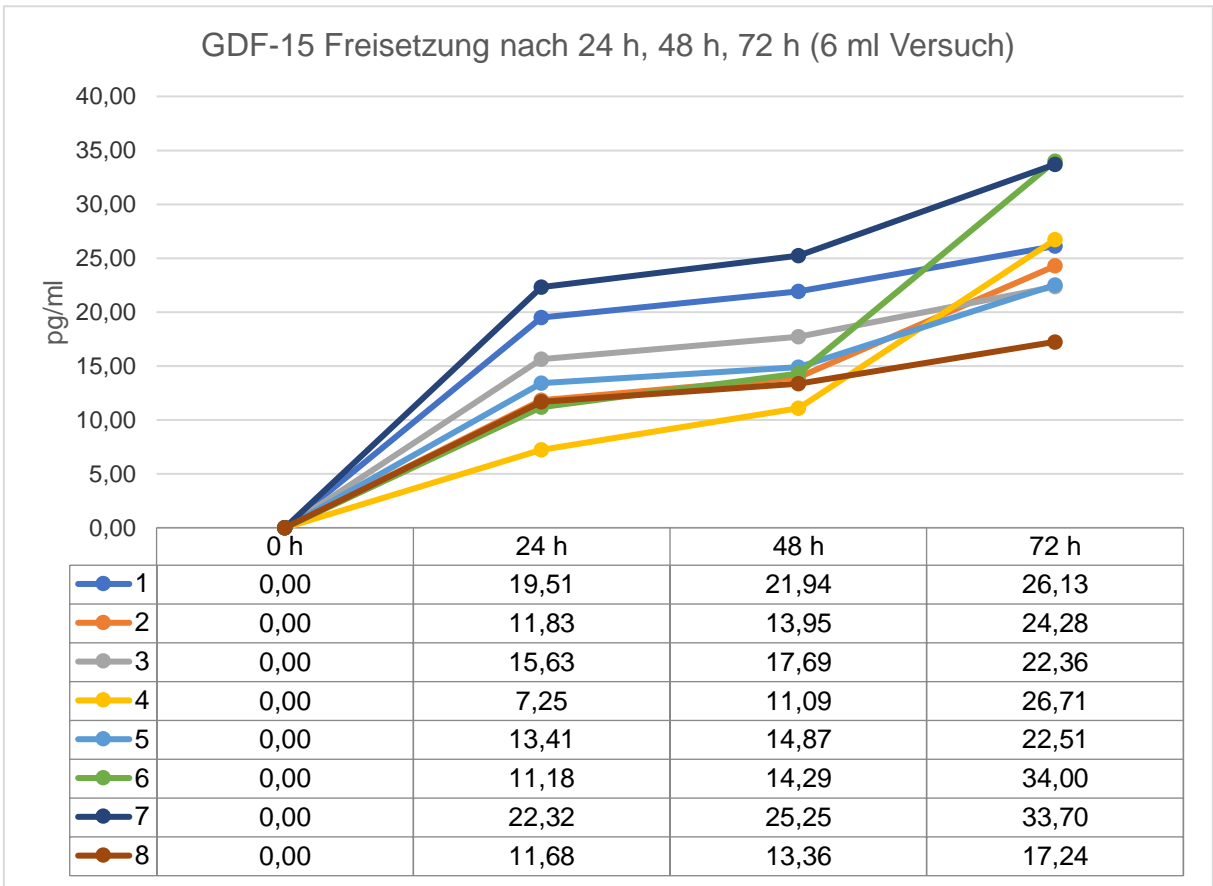


Abb. 27: Einzelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen GDF-15 Konzentrationen (pg/ml) für jeden Probanden.

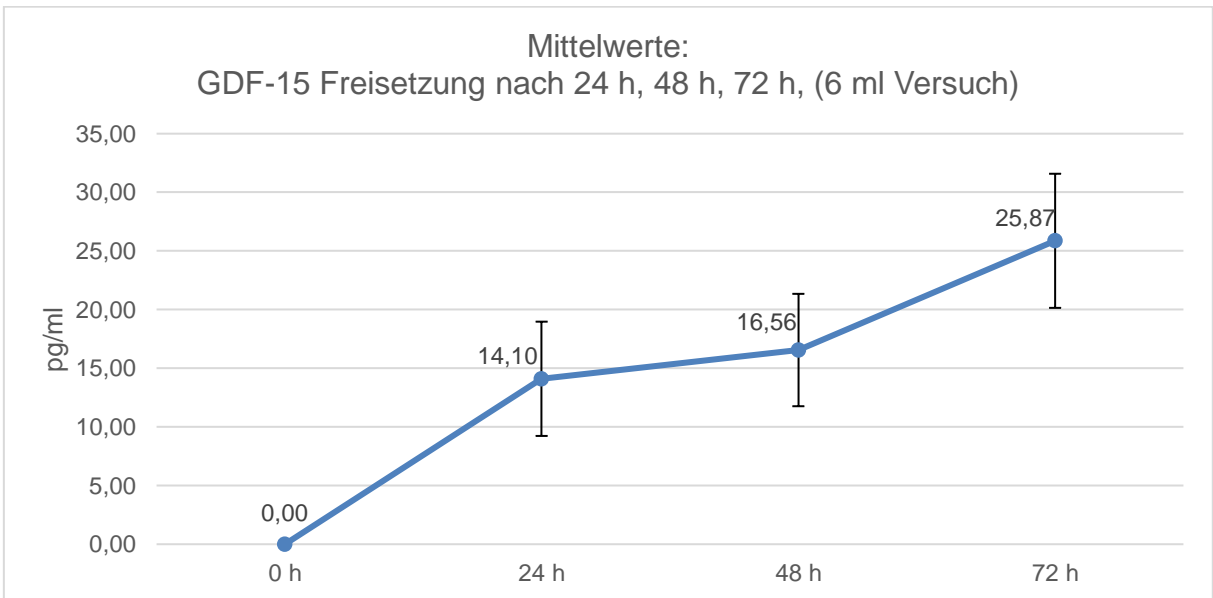


Abb. 28: Mittelwerte der über drei Messzeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) gemessenen GDF-15 Konzentrationen (pg/ml) mit Standardabweichungen.

$M \pm SD$ (pg/ml): 24 h ($14,10 \pm 4,87$), 48 h ($16,56 \pm 4,79$), 72 h ($25,87 \pm 5,72$).

5. Diskussion

5.1 Wachstumsfaktoren in A-PRF+ Exsudat, i-PRF und Serum

Ziel der ersten Versuchsreihe war die Untersuchung dreier unterschiedlicher Blutderivate auf deren Gehalt an Wachstumsfaktoren unmittelbar nach deren Gewinnung. Gegenübergestellt wurden das bei der Herstellung von A-PRF+ Membranen als Nebenprodukt anfallende **A-PRF+ Exsudat**, das temporär flüssige, injizierbare **i-PRF** und **Serum**, das dem natürlichen Vollblut am nächsten kommt. Untersucht wurden die gewonnenen Proben auf deren Konzentration an PDGF-BB, VEGF und GDF-15.

Auffällig ist, dass ausgerechnet von den standardmäßig in Thrombozytenkonzentraten nachgewiesenen Wachstumsfaktoren PDGF-BB und VEGF im neu entwickelten i-PRF die deutlich geringsten Konzentrationen vorlagen. Verglichen mit i-PRF konnte im Serum ein Drittel mehr VEGF nachgewiesen werden. Im Exsudat lag ca. die doppelte Menge vor. Noch deutlicher fiel der Unterschied bei PDGF-BB aus. Hiervon konnte im Exsudat die fünffache und im Serum sogar die zehnfache Menge gemessen werden. Nur von dem im Feld der Blutblättchenkonzentrate bisher unerforschten GDF-15 lag im i-PRF durchschnittlich die höchste Konzentration vor. Eine annähernd gleiche Menge wurde jedoch ebenfalls im Exsudat und unwesentlich weniger im Serum nachgewiesen.

Betrachtet man die drei untersuchten Blutprodukte lediglich als Flüssigkeiten zur Befeuchtung von Membranen, Knochenersatzmaterialien und der Benetzung von Implantaten, haben sie zweifelsohne eine höhere Bioaktivität als die alternativ verwendete sterile Kochsalzlösung. Weder das A-PRF+ Exsudat noch das i-PRF konnte sich dabei, trotz größerer Ausgangsvolumina bei der Blutentnahme (A-PRF Exsudat: 40 ml, i-PRF: 40 ml, Serum: 7,5 ml), deutlich gegenüber dem Blutserum in Bezug auf den Gehalt der untersuchten Wachstumsfaktoren absetzen. Diskutabel ist demnach, ob sich durch die Verwendung des Exsudates oder i-PRF ein Vorteil ergibt, zumal sich der Operationssitus zwangsläufig in einem blutigen Milieu befindet.

Ein Vorteil des **A-PRF+ Exsudates** besteht zweifelsfrei darin, dass bei geplanter Verwendung von PRF-Membranen ohne Mehraufwand und zusätzliche Traumatisierung eine autologe, nicht gerinnende Flüssigkeit gewonnen wird, die zur Benetzung und Konservierung von autologen Augmentaten und anderer Ersatzmaterialien verwendet

werden kann. Des Weiteren kann sie zur Ausspülung von Alveolen und anderer Defekte genutzt werden. Der Hersteller wirbt außerdem damit, dass das Exsudat reich an Vitronektin und Fibronektin sei, das u. a. die stimulative Wirkung von PDGF-BB verstärken kann. Dies müsste in weiteren Versuchen untersucht werden, wobei davon auszugehen ist, dass die im Exsudat enthaltene Menge an Glykoproteinen der ohnehin frei im Blut vorkommenden Menge entspricht, oder durch den erwünschten Einschluss der Proteine im PRF sogar darunter liegt (77).

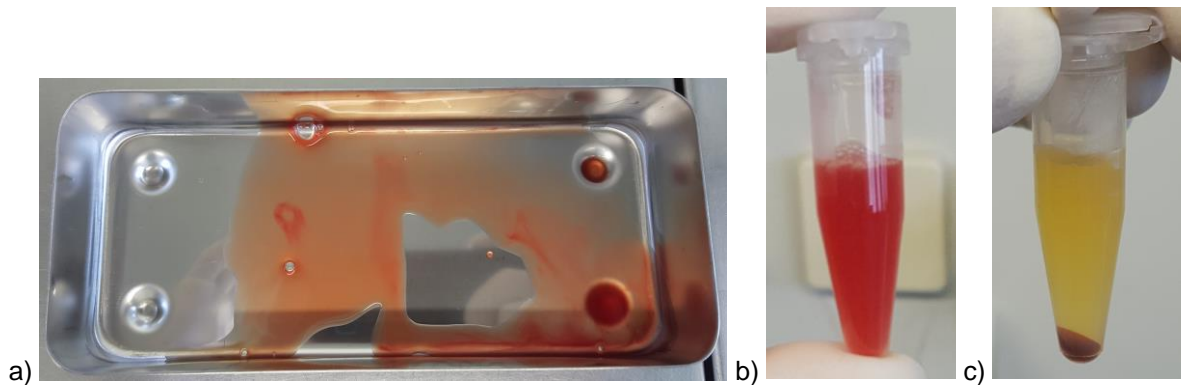
Ausgehend von den in dieser Arbeit nachgewiesenen Faktorenkonzentrationen kann dem A-PRF+ Exsudat jedoch ansonsten kein entscheidender Vorteil gegenüber Blutserum zugeschrieben werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe um *Dohan Ehrenfest und Choukroun* als sie das **S-PRF Exsudat** mit Blutserum auf deren Gehalt an VEGF und PDGF-BB untersuchten. Auch wenn sich deren Gewinnung des Serums (längere Gerinnungszeit) und Exsudates (nicht gepresst sondern passiv ausgetreten) leicht von der Methode in dieser Arbeit unterschied, wurde für PDGF-BB ebenfalls etwa die doppelte Menge im Blutserum gemessen (77). Darüber hinaus konnte auch deutlich mehr VEGF im Serum nachgewiesen werden. Sie sahen dies als Bestätigung der guten Fixierung der Faktoren im PRF-Fibrinnetz (80). Dass in der vorliegenden Arbeit eine höhere VEGF Konzentration im A-PRF+ Exsudat im Vergleich zum Serum gemessen wurde, kann im Umkehrschluss auf eine weniger gute Fixierung von VEGF in A-PRF+ hinweisen.

Bei der kritischen Bewertung der Blutderivate und Versuchsergebnisse muss bedacht werden, dass weder das untersuchte Serum noch das zentrifugierte i-PRF und A-PRF+ Exsudat genau den im klinischen Alltag verwendeten Materialien entspricht. Zum vollständigen Ausschluss von Zellen in den einzufrierenden Proben wurde zum einen kein Vollblut, sondern Blutserum verwendet. Hierzu wird vor der Zentrifugation die vollständige Gerinnung des Blutes abgewartet und anschließend das Koagel mit den zellulären Bestandteilen abgeschieden. Hierbei ist jedoch davon auszugehen, dass auch dieses „normale“ Blutkoagel bereits Wachstumsfaktoren und Glykoproteine eingeschlossen und fixiert hat, wodurch deren Konzentration im Serum reduziert ist und unter der des normalen Vollblutes liegt. Die alternative Verwendung von Blutplasma (gewonnen durch Zentrifugation einer ungerinnbar gemachten Blutprobe) hätte jedoch noch weniger den physiologische Bedingungen entsprochen, da derart unaktiviertes Blut nicht in einer Wunde vorkommt.

Auch das gewonnene A-PRF+ Exsudat und i-PRF wurden zur vollständigen Bereini- gung von Zellen erneut zentrifugiert und damit im Gegensatz zu den im klinischen Ein- satz verwendeten Materialien verändert.

Da bei der ersten Zentrifugation zur A-PRF+ Herstellung bereits ein Großteil der Zellen abgeschieden oder im Fibrinclot eingeschlossen wurden, fiel auf, dass sich bei der zweiten Zentrifugation des A-PRF+ Exsudates nur noch eine schmale rote Zellschicht am Boden abschied, die vermutlich weitgehend frei von Leukozyten und Thrombozy- ten war.



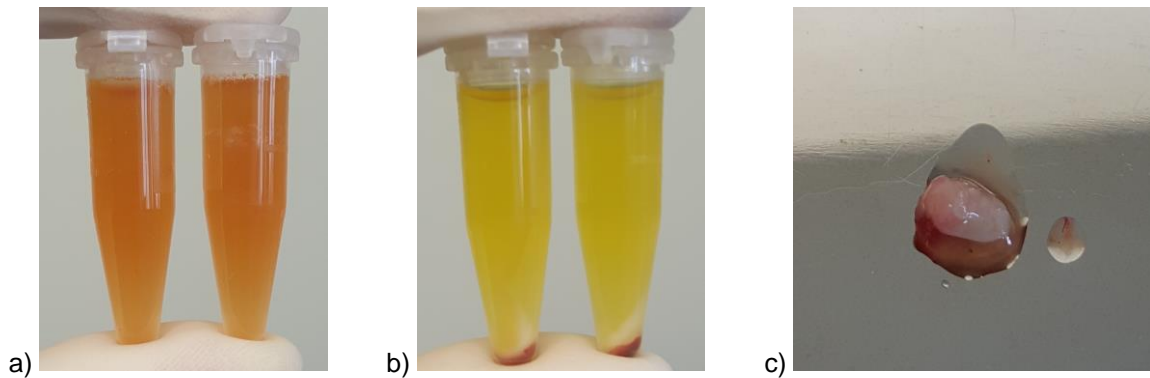
Wdh. Abb. 8: A-PRF+ Exsudat vor und nach erneuter Zentrifugation

a) Das beim Pressen der A-PRF+ Koagel gewonnene Exsudat am Boden der BoX.

b) Gesammeltes A-PRF+ Exsudat eines Probanden in einem Eppendorfgefäß. Es enthält noch Zellen, Zelltrümmer und partikuläre Bestandteile.

b) Gesammeltes A-PRF+ Exsudat eines Probanden in einem Eppendorfgefäß nach erneuter Zentrifu- gation (8 min bei 5,5 g). Die zellulären und partikulären Bestandteile sind am Boden abgeschieden.

Anders verhielt es sich bei dem untersuchten **i-PRF**. Dieses, nach dessen Herstellung noch für ca. 10 Minuten in flüssiger Form vorliegende Produkt, besticht im klinischen Alltag vor allem durch seine nachträgliche durch Thrombozyten und Gerinnungsfakto- ren vermittelte Aushärtung sowie die lokale Konzentrierung jener Thrombozyten und Leukozyten. Diese im „normalen“ i-PRF vorhandenen regenerativen Zellen wurden bei der beschriebenen Versuchsdurchführung nach 15 Minuten und abgeschlossener Ge- rinnung jedoch durch die zweite Zentrifugation abgeschieden. Durch das sich am Bo- den des Eppendorfgefäßes abgesetzte rotweiße Koagel, das makroskopisch einem kleinen PRF-Clot ähnelte, konnte dabei zweifelsfrei eine Anreicherung von Zellen im i-PRF bestätigt werden. Es ist hervorzuheben, dass die in dieser Arbeit gemessene Konzentration an Wachstumsfaktoren lediglich die freigesetzte Menge nach 15 Minu- ten wiedergibt, wobei es naheliegt, dass die im i-PRF enthaltenen und fixierten Zellen zeitlich darüber hinaus vital und biologisch aktiv sind und eine länger andauernde De- potwirkung haben.



Wdh. Abb. 5: i-PRF vor und nach erneuter Zentrifugation

a) Gesammeltes i-PRF eines Probanden in zwei Eppendorfgefäßen nach abgeschlossener Gerinnung. Das i-PRF ist orange und enthält noch zelluläre und partikuläre Bestandteile.

b) Gesammeltes i-PRF eines Probanden in zwei Eppendorfgefäßen nach Durchmischung und erneuter Zentrifugation (8 min bei 5,5 g). Die zellulären und partikulären Bestandteile sind am Boden abgeschieden.

c) Der abgeschiedene, feste, rotweiße Pfropf.

Die mikroskopische und zelluläre Zusammensetzung von i-PRF sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum wurde kürzlich von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht.

Varela et al. konnten beim Vergleich von i-PRF mit peripherem Blut deutlich erhöhte Thrombozyten und Leukozytenzahlen im i-PRF feststellen, wobei entgegen eines normalen Blutbildes mehr Lymphozyten als neutrophile Granulozyten vorlagen (100). Diese erhöhte Affinität der Lymphozyten gegenüber Granulozyten sich in PRF anzureichern wurde bereits mehrfach beschrieben, wobei die Granulozytenanzahl mit zunehmender Drehzahl beim Zentrifugieren abnimmt (8, 78, 101). Bei lichtmikroskopischer und immunhistochemischer Untersuchung stellte sich i-PRF als blättchenreiches Fibrinnetzwerk mit zahlreichen Lymphozyten, Typ1 Kollagen, Osteokalzin und Wachstumsfaktoren dar, dessen dreidimensionales Netzwerk im Gegensatz zu geronnenem Vollblut über mehrere Tage hinweg stabil blieb. Des Weiteren verglichen *Varela et al.* über einen Zeitraum von zehn Tagen die Freisetzung von VEGF und PDGF-AB durch i-PRF und Vollblut. PDGF-AB wurde dabei von beiden Blutderivaten in vergleichbarer Menge freigesetzt, wohingegen **VEGF** in größerer und über die Zeit zunehmender Konzentration bei den „normalen“ Blutproben sezerniert wurde (100).

In einer ähnlichen Versuchsreihe untersuchten *Miron et al.* die Freisetzung von verschiedenen Wachstumsfaktoren durch i-PRF über zehn Tage und verglichen dies mit den durch PRP freigesetzten Mengen. Hierbei fiel auf, dass i-PRF zwar initial nach 15

Minuten Inkubationszeit von fast allen Faktoren weniger als PRP sezernierte, jedoch über den Zeitraum von zehn Tagen insgesamt mehr PDGF-AA, PDGF-AB, EGF und IGF-1 freisetzte. Ausgerechnet bei den in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesenen Faktoren **VEGF** und **PDGF-BB** sowie bei TGF- β 1 verhielt es sich anders und es wurden hiervon deutlich mehr durch PRP freigesetzt. Betrachtet man die für VEGF und PDGF-BB von *Miron et al.* nach 15 Minuten ermittelten Werte, fällt auf, dass diese deutlich unter den in dieser Arbeit nach 15 Minuten ermittelten Konzentrationen liegen. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass in dieser Arbeit das pure i-PRF erneut zentrifugiert und untersucht wurde, wohingegen *Miron et al.* lediglich die in ein Nährmedium freigesetzte Faktorenmenge nachwies. Neben der Freisetzung von Wachstumsfaktoren wurden beide flüssigen Thrombozytenkonzentrate auf deren Effekt gegenüber humanen Gingiva-Fibroblasten untersucht. Neben einer hervorragenden Biokompatibilität beider Präparate konnte dabei bei i-PRF eine deutlich erhöhte Zellmigration und höhere Expression von Typ1 Kollagen durch die Fibroblasten festgestellt werden, wohingegen unter PRP-Einfluss ein starker Anstieg der Anzahl an Fibroblasten zu verzeichnen war (102).

Auf ähnliche Art und Weise wurde kürzlich von *Wang et al.* das Verhalten von Gingiva-Fibroblasten auf Implantatoberflächen aus Titan unter dem Einfluss von i-PRF und PRP untersucht. Entsprechend der Ergebnisse von *Miron et al.* konnten sie unter i-PRF Zusatz eine höhere Zellmigration und Typ1 Kollagen Synthese feststellen sowie vermehrte Genexpression für PDGF, TGF- β , Fibronectin und Kollagen Typ1. Entgegen der Ergebnisse von *Miron et al.* lag darüber hinaus eine höhere Proliferationsrate und Zellzahl bei den i-PRF Proben im Vergleich zu den PRP Proben vor (103).

Dieselbe Arbeitsgruppe um *Wang et al.* verglich außerdem das Verhalten humaner Osteoblasten unter dem Einfluss von i-PRF und PRP. Hier konnte in vitro ebenfalls eine exzellente Biokompatibilität ausgehend von der Viabilität nachgewiesen werden sowie eine gesteigerte Zellmigration, Proliferation und osteogenetische Differenzierung. Auch wenn die Ergebnisse unter Zusatz beider Thrombozytenkonzentrate im Vergleich zur zusatzfreien Kontrollgruppe positiv ausfielen, konnte sich i-PRF gegenüber PRP mit besseren Werten darstellen (104).

Die für i-PRF und PRP teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse machen erneut deutlich, welchen Einfluss das Zentrifugationsprotokoll und verwendete Zusätze auf die zelluläre Zusammensetzung und biologische Aktivität von Thrombozytenkonzentrat haben. *Choukroun und Ghanaati*, auf deren Forschungsergebnissen das neue Protokoll zur Herstellung von A-PRF (und A-PRF+) zurückzuführen ist, analysierten

außerdem den Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf flüssiges PRF (8, 92). Zur Herstellung wurde venöses Vollblut für 8 Minuten in Plastikröhrchen bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten (2400 rpm, 1200 rpm, 600 rpm) zentrifugiert. Demnach entsprach kein Protokoll exakt dem zur Herstellung des offiziell und in dieser Arbeit als i-PRF bezeichneten flüssigen PRF. Dennoch konnten *Choukroun und Ghanaati* den positiven Einfluss einer verringerten Drehzahl aufzeigen. Sowohl die im injizierbaren PRF enthaltene Thrombozyten- als auch Leukozytenzahl nahmen mit abnehmender Drehzahl deutlich zu. Ebenso verhielt es sich mit den nach 1 h und 24 h in Zellmedium freigesetzten Konzentrationen an VEGF und TGF β -1. Die nach einer Stunde und 24 h für VEGF gemessenen Konzentrationen lagen deutlich unter denen von *Miron et al.* für i-PRF (700 rpm, 3 min). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass sich nicht nur die Reduktion der Drehzahl, sondern auch eine reduzierte Zentrifugationsdauer positiv auf die Zusammensetzung von flüssigem PRF auswirkt (92, 102, 105).

In einer anderen aktuellen Studie konnten *Abd El Raouf et al.* den positiven Effekt von i-PRF auf Chondrozyten nachweisen und im Tiermodell eine verbesserte Regeneration bei Knorpelschäden feststellen. Im Vergleich zu PRP und der Kontrollgruppe (ohne Zusatz) reagierten mit i-PRF kultivierte Zellen mit einer wesentlich höheren Proliferationsrate und gesteigerten Genexpression für Kollagen und Aggrecan. Ebenso zeigten tiefe Knorpelverletzungen in den Kniegelenken von Hasen nach vier Wochen sowohl makroskopisch als auch histologisch eine deutlich schnellere und vollständigere Regeneration unter dem Einfluss von i-PRF (106).

Neben den vielversprechenden Ergebnissen im Labor und am Tier liegen außerdem bereits erste klinische Fallberichte zu der Verwendung von i-PRF vor. In Kombination mit A-PRF+ und Knochenersatzmaterial konnte ohne zusätzliche Separationsmembran ein vestibulärer Knochendefekt aufgebaut werden, wodurch eine zweizeitige Implantation in qualitativ hochwertigen Knochen ermöglicht wurde (107).

Des Weiteren wurden Ansätze beschrieben, bei denen es unter Verwendung eines individuell 3D-geplanten Titannetzes gelang, einen großen knöchernen Tumordefekt ohne Eigenknochen, sondern nur unter Verwendung xenogenen, mit A-PRF+ und i-PRF versetzten Knochenersatzmaterials zu rekonstruieren (108). Ebenso erfolgreich konnte nach vorheriger 3D-Planung ein großer knöcherner Parodontaldefekt präoperativ an einem gedruckten Modell mit partikulärem Knochenersatzmaterial aufgefüllt und zusammen mit i-PRF in Idealform gebracht und fixiert werden, um anschließend, ähnlich eines Puzzleteils, in den Defekt eingefügt zu werden (109).

Neben der Verwendung mit Knochenaufbauten lassen vorläufige Erkenntnisse die Vermutung zu, dass in den Kiefergelenksspalt injiziertes i-PRF zur Schmerzreduzierung von temporomandibulärer Dysfunktion führen kann (110). Außerdem wird seine Verwendung aufgrund seiner antibakteriellen und regenerativen Eigenschaften in der Parodontitistherapie diskutiert (111, 112).

Bei der Diskussion der erhobenen Daten muss darauf hingewiesen werden, dass zwar alle Proben in Triplets untersucht wurden, aus deren Werten jeweils der Mittelwert berechnet wurde, der Versuch für jede Probe jedoch nur einmal erfolgte. Aufgrund dieser geringen Datenlage erfolgt eine rein deskriptive Analyse der Werte ohne statistisch signifikante Aussagekraft. Dennoch lassen sich Tendenzen zur Konzentration von Wachstumsfaktoren in den untersuchten Proben ausmachen, die als wichtige Grundlage für weiterführende Forschung in diesem Gebiet dienen.

5.2 Freigesetzte Wachstumsfaktoren durch A-PRF+ Membranen nach 24 h, 48 h, 72 h

5.2.1 2 ml Versuch

Zur Messung der über einen Zeitraum von 72 h durch A-PRF+ Membranen freigesetzten Wachstumsfaktoren wurden zwei unterschiedliche Versuchsmodelle durchgeführt. Beim 2 ml Versuch wurden die Membranen bei 37 °C in 2 ml Nährmedium inkubiert, welches zum Nachweis der Faktoren nach 24 h, 48 h und 72 h abpipettiert und mit 2 ml frischem Medium ersetzt wurde. Dieses Modell entspricht dem üblicherweise bei PRF Membranen verwendeten Versuchsaufbau zur Messung freigesetzter Faktoren und ermöglicht einen guten Vergleich der erhobenen Messwerte, da die Bedingungen innerhalb des Versuchs mit Ausnahme der voranschreitenden Zeit gleichbleiben. Erwähnenswert ist hierbei, dass in verschiedenen Publikationen u. a. unterschiedliche Volumina an Nährmedium verwendet werden und sich die Zeitpunkte der Medienwechsel unterscheiden (90, 91, 94, 95, 113-116). Dieser Einfluss wird in Kapitel 5.4 diskutiert.

Trotz des erneut veränderten Zentrifugationsprotokolls mit Reduktion der Drehzahl und Zentrifugationsdauer gelang es, entgegen der Aussage mancher Autoren, A-PRF+ Membranen herzustellen, die auch noch nach 72h Inkubation in Zellmedium unverändert stabil erschienen und sich nicht auflösten (117).

Von allen drei untersuchten Wachstumsfaktoren konnte mit deutlichem Abstand bei allen Probanden am meisten **PDGF-BB** nachgewiesen werden. Imponiert hat hierbei die konstant freigesetzte Menge über den Messzeitraum. Der bei einem Probanden atypische extreme Anstieg an gemessenem PDGF-BB nach 24 h ist vermutlich Ursache eines Messfehlers oder einer Verunreinigung der Probe.

Da Thrombozyten als Hauptquelle für PDGF dienen, wurde vermutlich der Großteil des Faktors bereits nach Aktivierung der Blutplättchen sezerniert. Im weiteren Verlauf diente das Fibrinnetz als Reservoir, aus dem PDGF-BB über den Messzeitraum langsam in das Zellmedium abgegeben wurde. Die gleichmäßige Freisetzung von PDGF-BB ist mit dessen hoher Affinität an Fibrin zu binden zu erklären (118). Dass für die kontinuierliche PDGF-BB Freisetzung vor allem die schützende Fibrinmatrix verantwortlich ist, lässt die ähnlich konstante Freisetzung beim 6 ml Versuch vermuten, da die sich dort ändernden Bedingungen wie abnehmendes Volumen und „alterndes“ Medium keine Auswirkung zeigten (s. u.).

Neben seiner chemotaktischen Wirkung auf Fibroblasten und Steigerung der Kollagenproduktion stimuliert PDGF-BB außerdem Makrophagen stark dazu, VEGF und TGF- β (zu dem auch GDF-15 zählt) zu synthetisieren und auszuschütten (90, 119). Diese Eigenschaft kann für die im Folgenden beschriebenen Verläufe mit nachträglicher Konzentrationszunahme verantwortlich sein.

Der Großteil (76 %) des nachgewiesenen **VEGF** wurde bereits während der ersten 24 h in das Medium abgegeben, wohingegen bereits nach 48 h einheitlich kaum noch VEGF freigesetzt wurde. Eine vergleichbar starke Depotwirkung wie bei PDGF-BB war demnach für VEGF bei dieser Versuchsdurchführung nicht zu erkennen. Diese schwächere Fixierung von VEGF im A-PRF+ und schnellere Abgabe deckt sich mit den unter 4.1 beschriebenen Ergebnissen, wobei in dem aus A-PRF+ Koageln herausgepressten Exsudat mehr VEGF und weniger PDGF-BB im Vergleich zu Blutserum gemessen wurde. Trotz der in dieser Arbeit gemessenen schnellen Freisetzung während der ersten Stunden hat wahrscheinlich auch eine initial hohe VEGF Konzentration über die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Stimulation der Zellmigration und Proliferation von Endothelzellen und Makrophagen einen positiven Effekt auf die Angiogenese und Wundregeneration (44, 120).

Zu ähnlichen Ergebnissen (während der ersten 72h) kamen auch *El Bagdadi et al.* und *Fujioka-Kobayashi et al.*, die ebenfalls die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch das neue A-PRF+ untersuchten und mit der durch A-PRF und S-PRF verglichen. Auch

wenn sie in ihren Versuchen die Mediumüberstände bereits zu früheren Zeitpunkten wechselten, wurden auch bei ihren Versuchen in den ersten 24 h insgesamt mehr VEGF freigesetzt als in den folgenden zwei Tagen. Beim Vergleich mit deren Werten muss jedoch beachtet werden, dass das PRF nicht in 2 ml, sondern in 5 ml inkubiert wurde und *El Bagdadi et al.* ein anderes Nährmedium (RPMI 1640, Gibco Thermo Fischer Scientific) verwendeten. Darüber hinaus erfolgten bei ihnen die ersten Messungen und damit der Austausch des Kulturmediums bereits vor 24 h (*El Bagdadi et al.*: 6 h, 24 h; *Fujjoka-Kobayashi et al.*: 15 min, 1 h, 8 h, 24 h). Es fällt auf, dass die absoluten Mengen an freigesetztem VEGF zu jedem Zeitpunkt deutlich über den in dieser Arbeit gemessenen Werten lagen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zu den hier beschriebenen Versuchen keine Membranen, sondern ungepresste PRF-Koagel inkubiert wurden (91, 113). Für trocken gepresste S-PRF Membranen wurde diese geringe Faktorenfreisetzung im Vergleich zu S-PRF Koageln bereits beschrieben (121). Von Interesse wäre demnach ein direkter Vergleich von purem A-PRF+ und A-PRF+ Membranen bezüglich ihres biologischen Verhaltens in Abhängigkeit der mechanischen und strukturellen Veränderung durch das Pressen. Sehr interessant ist darüber hinaus das Ergebnis von *El Bagdadi et al.*, die PRF noch für weitere Tage inkubierten und zwischen dem dritten und siebten Tag bei allen PRF Derivaten eine erneute Zunahme der VEGF Sekretion feststellten, die bei A-PRF+ mit Abstand am deutlichsten ausfiel (113). Dieses Phänomen der gesteigerten VEGF Sekretion nach 72 h wurde bereits in älteren Arbeiten für S-PRF (dort als L-PRF bezeichnet) beschrieben und auf den Einschluss vitaler Leukozyten zurückgeführt. Da die freigesetzte Menge an VEGF hierbei jedoch unter der von normalen Vollblutkoageln lag, wurde vermutet, dass bei der Zentrifugation Leukozyten „verloren“ gingen (116). Die Arbeitsgruppe um *El Bagdadi et al.* konnte im direkten Vergleich die Überlegenheit von A-PRF+ gegenüber S-PRF diesbezüglich eindrucksvoll herausstellen, was sie wiederum auf die günstigere Fibrinstruktur und erhöhte Leukozytenzahl als Folge des veränderten Protokolls zurückführten (113).

In Anbetracht dessen, dass A-PRF+ im Vergleich zu S-PRF höhere Mengen an neutrophilen Granulozyten enthält, sind diese Ergebnisse nicht erstaunlich, da vor allem neutrophile Granulozyten viel VEGF produzieren und Schlüsselzellen bei der Angiogenese sind (94, 122, 123). Es ist daher anzunehmen, dass auch in der hier beschriebenen Versuchsreihe bei längerer Versuchsdauer ein erneuter Anstieg der VEGF Konzentration messbar gewesen wäre, zumal Leukozyten auch während der Wundheilung

ihre Hauptaktivität erst zeitversetzt zwischen dem dritten und siebten Tag haben (44, 121).

In diesem Zusammenhang ist auch der in dieser Arbeit gemessene und erstmals für PRF beschriebene Verlauf der **GDF-15** Freisetzung von Interesse. Ebenso wie bei VEGF und PDGF-BB wurde auch von diesem Faktor in den ersten 24 h die größte Menge in das Medium abgegeben. Es viel auf, dass im weiteren Verlauf zwar die sezernierte Menge in den folgenden 24 h abnahm, bei fünf der acht Probanden jedoch zwischen dem zweiten und dritten Tag eine erneute Zunahme der GDF-15 Konzentration messbar war. Diese nachträgliche Zunahme kann auf die Aktivität eingeschlossener vitaler Makrophagen zurückgeführt werden, die im Blut als Hauptquelle für GDF-15 bekannt sind (48, 52). Somit kann dieser Faktor als Indikator für die Konzentration und Aktivität von Makrophagen dienen und möglicherweise in folgenden Arbeiten zur Unterscheidung und Bewertung unterschiedlicher PRF-Derivate neben den üblicherweise nachgewiesenen Wachstumsfaktoren hinzugezogen werden.

Bereits in mehreren unabhängigen Arbeiten wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen einheitlich größere Gesamtmengen an freigesetzten Wachstumsfaktoren durch A-PRF und A-PRF+ im Vergleich zum ursprünglichen S-PRF nachgewiesen. Auch wenn sich die Arbeiten in Bezug auf diese Kernaussage gleichen, unterschieden sie sich dennoch teilweise im Verlauf der einzelnen Graphen und nachgewiesenen Konzentrationen (91, 113, 115). Wie bereits angemerkt, kann dies auf den Einfluss unterschiedlicher Versuchsbedingungen zurückgeführt werden:

- Art der Kultivierungsbedingungen: Medium, Volumen, Inkubator
- Art des PRF (Herstellungsprotokoll, verwendete Röhrchen, verwendete Zentrifuge)
- Koagel oder Membran (mit Gaze oder PRF-Box gepresst)
- Zeitpunkte der Messungen und Wechsel der Mediumüberstände.

5.2.2 6 ml Versuch

Angesichts der Tatsache, dass es sich bei Blut und Gewebe um dynamische Systeme handelt, bei denen Metabolite und Stoffwechselprodukte abtransportiert werden und stets neue Zellnahrung zur Verfügung steht, bietet der 2 ml Versuch den im A-PRF+ enthaltenen Zellen ähnlich ideale bzw. idealisierte Bedingungen. Je nach Dauer der Inkubation fällt dabei der Einfluss der neu gebildeten, möglicherweise hemmenden oder förderlichen Mediatoren und Stoffe kaum ins Gewicht. Zur Einbeziehung dieser

Einflüsse wurden die Membranen im 6 ml Versuch in 6 ml Nährmedium inkubiert, wovon nach 24 h, 48 h und 72 h jeweils 2 ml abpipettiert wurden, ohne dass dieses fehlende Volumen durch neues Medium ersetzt wurde.

Bei der Auswertung dieser Versuchsreihe fiel jedoch auf, dass sie zur Analyse einer kontinuierlichen Faktorenfreisetzung weniger geeignet ist. Stark limitiert ist die Aussage dieser Versuchsreihe dadurch, dass sich von Tag zu Tag und Messung zu Messung mehrere Bedingungen gleichzeitig ändern. So nimmt neben der voranschreitenden Zeit und der damit einhergehenden Alterung der Membranen und des Mediums außerdem die Gesamtmenge des Mediums, in dem die Membranen inkubiert sind, ab. Die pro Milliliter gemessenen Konzentrationsveränderungen (nach 24 h: Konzentration auf einem Gesamtvolumen von 6 ml, nach 48 h: Konzentration auf einem Gesamtvolumen von 4 ml, nach 72h: Konzentration auf einem Gesamtvolumen von 2 ml) sind deshalb kaum vergleichbar und können daher nur Tendenzen angeben. Nichtsdestotrotz können im Vergleich zum 2 ml Versuch interessante Schlüsse gezogen werden. So kann zum einen die absolut freigesetzte Menge der untersuchten Faktoren in Abhängigkeit der Mediummenge (2 ml oder 6 ml) nach den ersten 24 h verglichen werden. Zum anderen kann die in 2 ml freigesetzte Menge zwischen 48 h und 72 h in Abhängigkeit zur Frische des Mediums analysiert werden und Anstöße für weitere Versuche geben.

Im Verlauf von 72 h ist für **PDGF-BB** trotz abnehmender Volumina eine ähnlich konstante Konzentrationszunahme im Medium mit annähernd gleichen Mengen pro Milliliter wie beim 2 ml Versuch messbar gewesen. Dies ist insofern erstaunlich, da die Membranen zu Beginn in der dreifachen Menge Kulturmedium inkubiert waren und somit insgesamt eine deutlich größere absolute Menge des Faktors abgegeben wurde (absolute Menge nach 24 h: 2 ml Versuch: $M = 3026,9$ pg; 6 ml Versuch: $M = 6416,64$ pg). Diese an das Umgebungsvolumen angepasste Freisetzung ist erneut ein Hinweis dafür, dass nach PRF Herstellung bereits ein Großteil des Faktors im Fibrinnetz fixiert vorliegt und bedarfsgerecht sezerniert wird. Bestätigt wird dies durch die zwischen 48 h und 72 h ins verbliebene Restmedium (2 ml) freigesetzte Menge an PDGF-BB. Trotz des älteren und mit Metaboliten und Zytokinen angereicherten Mediums konnten beim 6 ml Versuch ($M = 2468,84$ pg) vergleichbare Mengen wie beim 2 ml Versuch ($M = 3652,8$ pg) mit frischem Medium nachgewiesen werden. Die trotz abnehmender Mediumsqualität gleichbleibende Faktorenfreisetzung kann als Hinweis für die schützende

Wirkung der PRF Membran für manche eingeschlossene Wachstumsfaktoren vor proteolytischem Abbau dienen (124).

Wie beim 2 ml Versuch wurde auch beim 6 ml Versuch in den ersten 24 h die größte Menge **VEGF** in das Medium abgegeben. Vergleicht man dabei die absoluten Mengen miteinander, fällt überraschend auf, dass in das geringere Mediumvolumen des 2 ml Versuchs deutlich mehr VEGF ($M = 520,74$ pg) im Vergleich zum 6 ml Versuch ($M = 339,3$ pg) freigesetzt wurde und somit das Freisetzungsverhalten der Membranen dem äußeren Einfluss der Mediummenge unterlag. Möglicherweise lagen in den ersten 24 h beim 2 ml Versuch, induziert durch die geringere Mediummenge, schlechtere Bedingungen vor. Dies könnte die im PRF enthaltenen Zellen zu einer vermehrten VEGF Freisetzung induziert haben, zumal beispielsweise Hypoxie als auslösender Reiz für die VEGF Freisetzung durch Thrombozyten und Makrophagen bekannt ist (44).

Beim 2 ml Versuch wurde festgestellt, dass nach zwei Tagen kaum noch VEGF sezerniert wird. Erstaunlicherweise konnte beim 6 ml Versuch in den verbliebenen 2 ml Medium zwischen 48 h und 72 h jedoch keine gleichbleibende, sondern eine deutlich abnehmende VEGF Konzentration gemessen werden. Der Faktor wurde folglich abgebaut oder so strukturell verändert, dass er nicht mehr mittels des ELISA detektiert wurde. Es ist bekannt, dass die Lebensdauer von Wachstumsfaktoren zwischen wenigen Stunden und wenigen Tagen schwankt, bis sie proteolytisch abgebaut werden (121). VEGF scheint im Gegensatz zu PDGF-BB wesentlich instabiler zu sein und bei zunehmendem Alter oder abnehmender Mediumqualität zu degenerieren. Diese Erkenntnis verdeutlicht den Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die gemessenen Faktorenmengen. Gerade bei Messungen der VEGF Freisetzung über mehrere Tage wie beispielsweise bei den Arbeiten von *El Bagdadi et al.* und *Fujioka-Kobayashi et al.* sollte demnach trotzdem ein engmaschiger Austausch der Mediumüberstände erfolgen.

Der Verlauf der **GDF-15** Freisetzung im 6 ml Versuch gleicht dem des 2 ml Versuchs. In den ersten 24 h wurde mit Abstand die größte Menge des Faktors freigesetzt, wobei sich die absoluten Mengen unabhängig vom unterschiedlichen Mediumvolumen annähernd glichen. So wurde beim 6 ml Versuch in den ersten 24 h in die 6 ml Medium mit $M = 84,61$ pg insgesamt nur unwesentlich mehr GDF-15 abgegeben, verglichen mit den im 2 ml Medium des 2 ml Versuch nachgewiesenen $M = 73,3$ pg. Auch in dieser Versuchsreihe hat die Menge an freigesetztem GDF-15 in den folgenden Stunden

zwar abgenommen, jedoch konnte auch hier eine erneut deutlich ansteigende Freisetzung nach 48 h festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, ist die nach zwei Tagen zunehmende Faktorenmenge wahrscheinlich auf die in der Membran lebenden Leukozyten zurückzuführen, die zusätzliches GDF-15 bilden. Das während der Versuchsdurchführung alternde Kulturmedium und die dadurch veränderten Bedingungen haben dabei vermutlich einen negativen Einfluss auf die Viabilität und Aktivität der Leukozyten. Dies führt dazu, dass beim 6 ml Versuch trotz initial größerer Faktorenmenge nach 72 h insgesamt weniger GDF-15 ($M = 113,03$ pg) durch die inkubierten Membranen freigesetzt wurde als beim 2 ml Versuch ($M = 130,26$ pg).

Auch wenn die Messung freigesetzter Wachstumsfaktoren und Zytokine zur Grundlagenforschung bereits seit Jahren in zahlreichen Publikationen zur Untersuchung unterschiedlicher Thrombozytenkonzentrate herangezogen wird, kann dadurch nur ein minimaler Effekt des biologischen Potentials solcher Konzentrate bewertet werden. Des Weiteren unterliegen solche Untersuchungen meist der Prämisse, dass die Effizienz eines Thrombozytenkonzentrats für die Wundheilung mit möglichst hohen Faktorkonzentrationen über eine möglichst lange Zeit einhergeht (90, 94, 95, 115, 116). Die Tatsache, dass es sich bei A-PRF+ um lebendes Gewebe handelt, das, wie in dieser Arbeit beschrieben, mit veränderten Eigenschaften auf veränderte äußere Einflüsse reagiert, verdeutlicht die Notwendigkeit erweiterter komplexerer Untersuchungen. Vor allem die Wirkung von A-PRF+ auf andere Zellen gilt es im Rahmen von in vivo Versuchen sowie in klinischen Studien weiter zu untersuchen.

Wenngleich das nach dem ursprünglichen Protokoll hergestellte S-PRF bereits in zahlreichen Studien analysiert und dessen Wirksamkeit in aktuellen Reviews zusammengefasst wurde, liegen für das neue A-PRF und A-PRF+ bisher nur wenige Publikationen vor.

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, wurde A-PRF jedoch bereits erfolgreich in Kombination mit i-PRF zum Aufbau von Knochendefekten verwendet (107, 108).

Clark et al. verglichen die Knochenqualität und den Knochenabbau nach Zahnextraktion und Socket preservation mit A-PRF+, APRF+ in Kombination mit allogenen Ersatzmaterial (FDBA), bei alleiniger Verwendung des FDBA und einem normalen Blutkoagel. Dabei erzeugte A-PRF+ signifikant mehr lebenden Knochen bei ähnlich geringem Knochenabbau wie FDBA allein. Der Mix aus A-PRF+ und FDBA zeigte die

stabilste, sogar leicht zunehmende Knochenhöhe mit ebenfalls vitalem Knochen, wohingegen bei normalen Blutkoageln der größte Knochenabbau zu verzeichnen war (125).

Kubesch et al. untersuchten in einer Tierstudie die Veränderung von subkutan bei Mäusen implantiertem humanen S-PRF („PRF-high“) und A-PRF („PRF-medium“). Die weitmaschige Fibrinstruktur des A-PRF zeigte nach fünf und nach zehn Tagen eine deutlich höhere Zelldichte, tiefere Zellinvasion und ausgeprägtere sowie dichtere Vasikularisation ausgehend von dem angrenzenden Bindegewebe der Tiere. Des Weiteren zeigte sich beim A-PRF über den Zeitraum von zehn Tagen eine höhere Überlebensrate der eingeschlossenen humanen Zellen, was als Hinweis auf einen protektiven Effekt des porösen Fibrins gewertet wurde. Im Vergleich dazu wirkte das stabilere, engmaschige S-PRF ähnlich einer Separationsmembran bei der „guided tissue regeneration“ und erschwerte das Eindringen von angrenzenden Zellen. Hierdurch stellte die Arbeitsgruppe die Möglichkeit heraus, durch unterschiedliche Herstellungsprotokolle andere PRF Derivate mit indikationsspezifischen Eigenschaften herstellen zu können (10).

Die Applikation von PRF nach der operativen Entfernung von Weisheitszähnen im Unterkiefer wurde bereits mehrfach untersucht und weitestgehend einheitlich positiv mit reduzierten postoperativen Schwellungen, Schmerzen und Entzündungen beschrieben (126, 127). In einer aktuellen klinischen Vergleichsstudie (split-mouth design) zwischen A-PRF und S-PRF (da als L-PRF bezeichnet) führte die Verwendung von A-PRF zu reduzierten postoperativen Schmerzen mit geringerer Einnahme von Schmerzmitteln. In Bezug auf postoperative Schmerzen und Beeinträchtigung der Mundöffnung (Kieferklemme) war jedoch kein deutlicher Unterschied auszumachen (128).

Trotz dieser ersten vielversprechenden Versuchsergebnisse für A-PRF+ und i-PRF besteht nach wie vor Bedarf in der Untersuchung verschiedener, mit unterschiedlichen Methoden hergestellten PRF-Derivate. Als vitale Konstrukte unterscheiden sie sich nicht nur in ihrem molekularen Aufbau und in ihrer zellulären Zusammensetzung, sondern, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, auch in ihrem biologischen Verhalten in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen. Somit scheint es sinnvoller, indikationsspezifisch das geeignete Herstellungsprotokoll und die entsprechende Weiterverarbeitung des PRFs zu wählen, als eine allgemeingültige Form für jeden klinischen Einsatz zu

propagieren. Weiterführende Forschung auf dem Gebiet ist demnach von großem Interesse für die ideale Verwendung verschiedener PRFs im klinischen Alltag.

6. Zusammenfassung

Der Einsatz von Thrombozytenkonzentraten bei dentoalveolären und implantologischen Eingriffen erlebt aktuell eine Renaissance und wird bezüglich ihrer klinischen Wirksamkeit kontrovers diskutiert. Daher war es Ziel dieser Arbeit, erstmalig den Wachstumsfaktorenrelease von i-PRF und A-PRF+ Exsudat im Vergleich zum Blutserum zu untersuchen. Zudem wurde der Wachstumsfaktorenrelease durch A-PRF+ Membranen über den Zeitraum von drei Tagen in unterschiedlichen Zellmedium-Volumina analysiert.

Hierfür erfolgte die Bestimmung der Wachstumsfaktoren PDGF-BB, VEGF und GDF-15 im i-PRF Medium, im A-PRF+ Exsudat, im Blutserum und im Kulturmedium von A-PRF+ Membranen mittels ELISA.

Weder in **i-PRF** (PDGF-BB: $M \pm SD = 804,77 \pm 847,14$ pg/ml; VEGF: $M \pm SD = 60,79 \pm 84,87$ pg/ml; GDF-15: $M \pm SD = 108,59 \pm 19,04$ pg/ml) noch in **A-PRF+ Exsudat** (PDGF-BB: $M \pm SD = 4647,22 \pm 1905,27$ pg/ml; VEGF: $M \pm SD = 113,64 \pm 58,59$ pg/ml; GDF-15: $M \pm SD = 106,81 \pm 19,64$ pg/ml) konnten im Vergleich zu normalem **Blutserum** (PDGF-BB: $M \pm SD = 8475,56 \pm 1997,70$ pg/ml; VEGF: $M \pm SD = 90,80 \pm 63,03$ pg/ml; GDF-15: $M \pm SD = 92,77 \pm 13,95$ pg/ml) deutlich höhere Wachstumsfaktorkonzentrationen gemessen werden. Bei der Untersuchung inkubierter A-PRF+ Membranen zeigte sich, dass das Fibrinnetz von A-PRF+ für PDGF-BB vermutlich als eine Art protektives Reservoir diene und der Faktor in gleichmäßiger Konzentration, angepasst an das Umgebungsvolumen, freigesetzt wurde (2 ml Versuch: 24 h: $M \pm SD = 1513,45 \pm 561,24$ pg/ml; 48 h: $M \pm SD = 2401,41 \pm 2279,12$ pg/ml; 72 h: $M \pm SD = 1826,40 \pm 1417,59$ pg/ml). Eine vergleichbare schützende Depotwirkung und anhaltende Freisetzung konnte für VEGF nicht festgestellt werden (2 ml Versuch: 24 h: $M \pm SD = 260,37 \pm 106,45$ pg/ml; 48 h: $M \pm SD = 73,24 \pm 45,90$ pg/ml; 72 h: $M \pm SD = 8,27 \pm 6,14$ pg/ml). Der in Verbindung mit Thrombozytenkonzentraten bisher unbeschriebene Faktor GDF-15 konnte bei allen Probanden nachgewiesen werden. Seine nachträgliche Freisetzung zwischen dem zweiten und dem dritten Tag wurde auf die Aktivität eingeschlossener Makrophagen zurückgeführt (2 ml Versuch: 24 h: $M \pm SD = 36,65 \pm 8,04$ pg/ml; 48 h: $M \pm SD = 13,62 \pm 3,66$ pg/ml; 72 h: $M \pm SD = 14,85 \pm 7,29$

pg/ml). In zukünftigen Arbeiten kann GDF-15 somit möglicherweise als Indikator zur Beurteilung der Makrophagenaktivität in PRF hinzugezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich A-PRF+ und i-PRF als einfach herzustellende, gut handzuhabende autologe Produkte mit günstigen Materialeigenschaften. Zudem konnte die Freisetzung von Wachstumsfaktoren über den Zeitraum von drei Tagen durch stabile A-PRF+ Membranen nachgewiesen werden. Da es sich bei allen PRF-Derivaten jedoch um hoch komplexe Gewebe handelt, deren biologisches Verhalten durch zahlreiche Faktoren innerhalb als auch außerhalb des Fibrinnetztes beeinflusst wird, sind weiterführende Untersuchungen von größtem Interesse.

7. Literaturverzeichnis

1. Müller-Ladner U, Steffen G. Wundheilung und Wundheilungsstörung. In: Siegenthaler W, Blum H, editors. *Klinische Pathophysiologie*. 9. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. p. 1008f.
2. Piatek S, Tautenhahn J. Physiologie der Wundheilung. In: Lippert H, editor. *Wundatlas*. 3. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 44-9.
3. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004;62(4):484-8.
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585-601.
5. Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*. 2007;16(4):156-65.
6. Hartshorne J, Gluckman H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: Preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF. *INTERNATIONAL DENTISTRY – AFRICAN EDITION*. 2016;6(5.):34 - 48.
7. Hartshorne J, Gluckman H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function. *INTERNATIONAL DENTISTRY – AFRICAN EDITION*. 2016;6(5.):14 - 24.
8. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *The Journal of oral implantology*. 2014;40(6):679-89.
9. Choukroun J. Advanced PRF & i-PRF: Platelet Concentrates or Blood Concentrates? *Journal of Periodontal Medicine & Clinical Practice*. 2014;1(1):3.
10. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, Orlowska A, Booms PF, Sader RA, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets*. 2018:1-12.
11. Piatek S. Wundarten. In: lippert H, editor. *Wundatlas*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 21.
12. Schubert J. Wundlehre. In: Schwenzler N, Ehrenfeld M, editors. *Chirurgische Grundlagen*. 4. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008. p. 174-9.
13. Riede U-N, Walch A, Wiestler O. Regeneration. In: Riede U-N, Werner M, Schaefer H-E, editors. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004. p. 333-6.
14. Piatek S. Grundzüge der Knochenbruchheilung und ihre Störungen. In: Lippert H, editor. *Wundatlas*. 3. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 272ff.
15. Welsch U. Thrombozyten. In: Welsch U, editor. *Lehrbuch Histologie*. München: Elsevier GmbH; 2010. p. 189f.
16. Gawaz M. Das Blutblättchen. In: Gawaz M, editor. *Das Blutblättchen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999. p. 4-29.
17. Coller BS. Historical perspective and future directions in platelet research. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9 Suppl 1:374-95.
18. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(11):1759-66.
19. Jelkmann W. Blut. In: Schmidt R, Lang F, Heckmann M, editors. *Physiologie des Menschen*. 31. ed. Berlin: Springer; 2011. p. 491-6.

20. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews*. 2015;29(3):153-62.
21. Ghasemzadeh M, Kaplan ZS, Alwis I, Schoenwaelder SM, Ashworth KJ, Westein E, et al. The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood*. 2013;121(22):4555-66.
22. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(6):426-37.
23. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*. 2009;23(4):177-89.
24. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(5):585-601.
25. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *American journal of surgery*. 1993;165(6):728-37.
26. Traversa B, Sussman G. The role of growth factors, cytokines and proteases in wound management. *Primary Intention: The Australian Journal of Wound Management*. 2001;9(4):161.
27. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *The American Journal of Surgery*. 1993;166(1):74-81.
28. Sanchez-Gonzalez DJ, Mendez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *International journal of peptides*. 2012;2012:532519.
29. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(4):1207-10.
30. Lang SA, Schlitt HJ, Geissler EK, Stöltzing O. Die Angiogenese in der onkologischen Forschung - Perspektiven für die Chirurgie. In: Krukemeyer MG, Spiegel H-U, editors. *Chirurgische Forschung*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005. p. 291 - 303.
31. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(4):197-204.
32. Bowen-Pope DF, Raines EW. History of Discovery: Platelet-derived Growth Factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(11):2397-401.
33. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*. 2008;22(10):1276-312.
34. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet (London, England)*. 1992;339(8784):23-5.
35. Fang RC, Galiano RD. A review of becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Biologics : targets & therapy*. 2008;2(1):1-12.
36. Kontraindikation für REGRANEX® (Becaplermin) bei Patienten mit malignen Erkrankungen [press release]. Berlin: Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2010.
37. Nevins M, Kao RT, McGuire MK, McClain PK, Hinrichs JE, McAllister BS, et al. Platelet-derived growth factor promotes periodontal regeneration in localized osseous defects: 36-month extension results from a randomized, controlled, double-masked clinical trial. *Journal of periodontology*. 2013;84(4):456-64.

38. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood reviews*. 2013;27(2):77-89.
39. Solchaga LA, Hee CK, Roach S, Snel LB. Safety of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in Augment((R)) Bone Graft. *Journal of tissue engineering*. 2012;3(1):2041731412442668.
40. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;161(2):851-8.
41. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1097-105.
42. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular diversity*. 2006;10(4):515-27.
43. LeCouter J, Lin R, Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nature medicine*. 2002;8(9):913-7.
44. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*. 2009;153(2):347-58.
45. Li X, Tjwa M, Van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, et al. Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(9):1614-20.
46. Dhondt J, Peeraer E, Verheyen A, Nuydens R, Buysschaert I, Poesen K, et al. Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(5):1461-73.
47. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
48. Unsicker K, Spittau B, Kriegelstein K. The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine & growth factor reviews*. 2013;24(4):373-84.
49. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(21):11514-9.
50. Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1354(1):40-4.
51. Lawton LN, Bonaldo MdF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA, et al. Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene*. 1997;203(1):17-26.
52. Bottner M, Suter-Crazzolaro C, Schober A, Unsicker K. Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell and tissue research*. 1999;297(1):103-10.
53. Ünal B, Alan S, Başsorgun Cİ, Karakaş AA, Elpek GÖ, Çiftçioğlu MA. The divergent roles of growth differentiation factor-15 (GDF-15) in benign and malignant skin pathologies. *Archives of Dermatological Research*. 2015;307(7):551-7.
54. Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtmann A, Rossaint J, et al. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nature medicine*. 2011;17(5):581-8.

55. Bonaterra GA, Zugel S, Thogersen J, Walter SA, Haberkorn U, Strelau J, et al. Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *Journal of the American Heart Association*. 2012;1(6):e002550.
56. de Jager SC, Bermudez B, Bot I, Koenen RR, Bot M, Kavelaars A, et al. Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(2):217-25.
57. Hinoi E, Ochi H, Takarada T, Nakatani E, Iezaki T, Nakajima H, et al. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012;27(4):938-49.
58. Westhryn M, Moen SH, Holien T, Mylin AK, Heickendorff L, Olsen OE, et al. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica*. 2015;100(12):e511-e4.
59. Schulte W. Zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung großer Knochendefekte - eine Modifikation der Eigenblutmethode. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*. 1969:854-7.
60. Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion*. 1990;30(8):741-7.
61. Matras H. Fibrin seal: the state of the art. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1985;43(8):605-11.
62. Matras H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1982;40(10):617-22.
63. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1997;55(11):1294-9.
64. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;85(6):638-46.
65. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1999;14(4):529-35.
66. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2014;4(1):3-9.
67. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;101(3):e37-44.
68. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit?? en parodontologie: Le PRF2001. 55-62 p.
69. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*. 2001;10(4):225-8.
70. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2014;7(4):189-97.

71. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
72. Rutkowski JL, Johnson DA, Radio NM, Fennell JW. Platelet rich plasma to facilitate wound healing following tooth extraction. *The Journal of oral implantology*. 2010;36(1):11-23.
73. Rutkowski JL, Fennell JW, Kern JC, Madison DE, Johnson DA. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet-rich plasma. *The Journal of oral implantology*. 2007;33(3):116-21.
74. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1207-30.
75. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1231-56.
76. Dohan Ehrenfest DM, Lemo N, Jimbo R, Sammartino G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): rabbit tricks and traps. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;110(4):413-6; author reply 6-8.
77. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;101(3):e45-50.
78. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of periodontology*. 2010;81(4):546-55.
79. Kaijzel EL, Koolwijk P, van Erck MG, van Hinsbergh VW, de Maat MP. Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix in vitro and in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(9):1975-81.
80. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;101(3):e51-5.
81. Dohan Ehrenfest DM. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: introducing the PRF Box. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;110(3):275-8; author reply 8-80.
82. Hartshorne J, Gluckman H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part III: Clinical indications of PRF in implant dentistry, periodontology, oral surgery and regenerative endodontics. *INTERNATIONAL DENTISTRY – AFRICAN EDITION*. 2016;6.(5.):64- 79.
83. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2017;23(1):83-99.
84. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM, Everts PA, Wiczowski A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1153-62.

85. Pirraco RP, Reis RL, Marques AP. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2013;7(5):392-400.
86. Champagne CM, Takebe J, Offenbacher S, Cooper LF. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone*. 2002;30(1):26-31.
87. Sinder BP, Pettit AR, McCauley LK. Macrophages: Their Emerging Roles in Bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2015;30(12):2140-9.
88. Soltan M, Rohrer MD, Prasad HS. Monocytes: super cells for bone regeneration. *Implant dentistry*. 2012;21(1):13-20.
89. Ghanaati S Md DMDP. Platelet Rich Fibrin: Eine natürliche Quelle für die Geweberegeneration. *zahnärzteblatt rheinland-pfalz*. 2018;03:18 - 21.
90. Eren G, Gurkan A, Atmaca H, Donmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*. 2016;27(5):427-32.
91. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of periodontology*. 2017;88(1):112-21.
92. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society*. 2018;44(1):87-95.
93. Mourao CF, Valiense H, Melo ER, Mourao NB, Maia MD. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*. 2015;42(6):421-3.
94. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 2009;27(1):63-9.
95. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbe G, Del Corso M, Inchingolo F, et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1145-52.
96. Schneider N, Otte N. Das Immunsystem, Wichtige immunologische Methoden. In: Horn F, editor. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 6. Stuttgart Thieme; 2015. p. 647 f.
97. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Erforschung der Proteine und Proteome. In: Berg J, Tymoczko J, Stryer L, editors. *Stryer Biochemie*. 7. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013. p. 89 f.
98. Basha M. Immuno-techniques. *Analytical Techniques in Biochemistry*. New York, NY: Springer US; 2020. p. 77-102.
99. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of natural medicines*. 2018;72(1):32-42.
100. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araujo RF, Jr., Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clinical oral investigations*. 2018.

101. Andrade C, Orrego A, Pinto N. HEMATOLOGIC PROFILE OF FOUR AUTOLOGOUS FIBRINOGEN BASED BINDER OBTAINED WITH DIFFERENTS PROTOCOLS2016.
102. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clinical oral investigations*. 2017;21(8):2619-27.
103. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron R. Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP2017. 331 p.
104. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets*. 2018;29(1):48-55.
105. Al-Maawi S, Wend S, Sader R, Choukroun J, Ghanaati S. The Low-Speed Centrifugation Concept Enhances Cell Numbers And Bioactivity Of Injectable Platelet Rich Fibrin2018.
106. Abd El Raouf M, Wang X, Miusi S, Chai J, Mohamed AbdEl-Aal AB, Nefissa Helmy MM, et al. Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. *Platelets*. 2019;30(2):213-21.
107. Chenchev IL, Ivanova VV, Neychev DZ, Cholakova RB. Application of Platelet-Rich Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin in Combination of Bone Substitute Material for Alveolar Ridge Augmentation - a Case Report. *Folia medica*. 2017;59(3):362-6.
108. Lorenz J, Al-Maawi S, Sader R, Ghanaati S. Individualized Titanium Mesh Combined With Platelet-Rich Fibrin and Deproteinized Bovine Bone: A New Approach for Challenging Augmentation. *The Journal of oral implantology*. 2018;44(5):345-51.
109. Lei L, Yu Y, Ke T, Sun W, Chen L. The Application of Three-Dimensional Printing Model and Platelet-Rich Fibrin Technology in Guided Tissue Regeneration Surgery for Severe Bone Defects. *The Journal of oral implantology*. 2019;45(1):35-43.
110. Albilia Jb Dmd M, Herrera-Vizcaino CD, Weisleder HB, Choukroun JD, Ghanaati S Md DMDP. Liquid platelet-rich fibrin injections as a treatment adjunct for painful temporomandibular joints: preliminary results. *Cranio : the journal of craniomandibular practice*. 2018:1-13.
111. Kour P, Pudukalkatti PS, Vas AM, Das S, Padmanabhan S. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Injectable Platelet-rich Fibrin on the Standard Strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Contemporary clinical dentistry*. 2018;9(Suppl 2):S325-s30.
112. Karde PA, Sethi KS, Mahale SA, Khedkar SU, Patil AG, Joshi CP. Comparative evaluation of platelet count and antimicrobial efficacy of injectable platelet-rich fibrin with other platelet concentrates: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2017;21(2):97-101.
113. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society*. 2017.
114. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International journal of implant dentistry*. 2016;2(1):19.

115. Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical oral investigations*. 2016;20(9):2353-60.
116. Schar MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clinical orthopaedics and related research*. 2015;473(5):1635-43.
117. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jimenez P, Corso MD, Kang BS, 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):171-84.
118. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(3-4):349-59.
119. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of cellular biochemistry*. 1991;45(4):319-26.
120. Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2011;19(6):753-66.
121. Zumstein MA, Berger S, Schober M, Boileau P, Nyffeler RW, Horn M, et al. Leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) for long-term delivery of growth factor in rotator cuff repair: review, preliminary results and future directions. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1196-206.
122. Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2002;62(5):343-50.
123. Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis*. 2003;6(4):283-7.
124. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(3):356-63.
125. Clark D, Rajendran Y, Paydar S, Ho S, Cox D, Ryder M, et al. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology*. 2018;89(4):379-87.
126. Canellas J, Ritto FG, Medeiros PJD. Evaluation of postoperative complications after mandibular third molar surgery with the use of platelet-rich fibrin: a systematic review and meta-analysis. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2017;46(9):1138-46.
127. Hoaglin DR, Lines GK. Prevention of localized osteitis in mandibular third-molar sites using platelet-rich fibrin. *International journal of dentistry*. 2013;2013:875380.
128. Caymaz MG, Uyanik LO. Comparison of the effect of advanced platelet-rich fibrin and leukocyte- and platelet-rich fibrin on outcomes after removal of impacted mandibular third molar: A randomized split-mouth study. *Nigerian journal of clinical practice*. 2019;22(4):546-52.

Lebenslauf