

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
-Plastische Operationen

Analyse der Angiogenese einer autologen PRF-Membran in vitro

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin

der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vorgelegt von

Julia Elena Todt  
aus Mainz

Mainz,  
26.08.2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. Ulrich Förstermann

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

17.06.2024

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURDISKUSSION</b> .....	<b>3</b>
5.1	DIE PRF-MEMBRAN .....	3
5.1.1	<i>Geschichte</i> .....	3
5.1.2	<i>Herstellung</i> .....	3
5.1.3	<i>Eigenschaften</i> .....	4
5.2	PRP .....	5
5.2.1	<i>Geschichte</i> .....	5
5.2.2	<i>Herstellung</i> .....	5
5.2.3	<i>Eigenschaften</i> .....	6
5.3	RELEVANTE BLUTBESTANDTEILE/ROLLE DER ZELLEN .....	7
5.3.1	<i>Thrombozyten</i> .....	7
5.3.2	<i>Leukozyten</i> .....	8
5.3.3	<i>Thrombin und Fibrin</i> .....	9
5.3.4	<i>Makrophagen</i> .....	9
5.4	WACHSTUMSFAKTOREN.....	10
5.4.1	<i>VEGF und Angiogenese</i> .....	10
5.5	DAS EIKAMM-MODELL .....	10
5.6	EINSATZ DER MEMBRANEN/AUTOLOGEN BLUTKONZENTRATE IN DER MEDIZIN .....	11
5.6.1	<i>Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie/Zahnärztliche Chirurgie</i> .....	11
5.6.2	<i>Andere</i> .....	13
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
6.1	MATERIALIEN UND GERÄTE .....	14
6.1.1	<i>Brutmaschine</i> .....	14
6.1.2	<i>Zentrifugen</i> .....	14
6.1.3	<i>Herstellung der Membranen</i> .....	14
6.1.4	<i>VHX Digital Microscope Multi Scan von Keyence</i> .....	14
6.1.5	<i>Microplate Reader ELISA von Molcular Devices BNR: 06493</i> .....	14

6.1.6	<i>ELISA Materialien für Human VEGF</i> .....	14
6.1.7	<i>Blutentnahme</i> .....	15
6.1.8	<i>Membranen</i> .....	15
6.2	<b>METHODEN</b> .....	15
6.2.1	<i>Eikamm-Modell</i> .....	15
6.2.2	<i>Auszählung Kapillaren und Verzweigungspunkte</i> .....	16
6.2.3	<i>PRF-Herstellung</i> .....	18
6.2.3.1	<i>Herstellung des PRF in Bildern</i> .....	19
6.2.4	<i>PRP-Herstellung</i> .....	20
6.2.5	<i>PFP-Herstellung</i> .....	21
6.2.6	<i>ELISA-Proben</i> .....	21
6.2.7	<i>ELISA zur quantitativen Bestimmung von Wachstumsfaktoren</i> .....	22
6.2.8	<i>Auszählung der Proben im Fremdlabor</i> .....	23
6.2.9	<i>Statistische Auswertung</i> .....	23
<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>24</b>
7.1	<b>AUSZÄHLUNG KAPILLAREN UND VERZWEIGUNGSPUNKTE</b> .....	24
7.1.1	<i>PRF</i> .....	24
7.1.2	<i>PRP</i> .....	25
7.1.3	<i>PFP</i> .....	26
7.1.4	<i>Kollagenmembran</i> .....	27
7.2	<b>ELISA ERGEBNISSE VEGF</b> .....	27
7.3	<b>ZYTOMETRIE DER PROBEN</b> .....	28
<b>8</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>38</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>40</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

ADP .....	<i>Adenosindiphosphat</i>
A-PRF .....	<i>advanced-platelet-rich fibrin</i>
CaCl <sub>2</sub> .....	<i>Calciumchlorid</i>
CAM .....	<i>Chorio-allantoic Membrane</i>
DMEM .....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA .....	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GBR .....	<i>Guided Bone Regeneration</i>
ISQ .....	<i>Implantat Stabilitäts-Quotient</i>
K .....	<i>Kapillaren</i>
KM .....	<i>Kollagenmembran</i>
L-PRF .....	<i>Leucocyte-platelet-rich fibrin</i>
L-PRP .....	<i>leucocyte- and platelet-rich plasma</i>
LSCC .....	<i>Low Speed Centrifugation Concept</i>
PDGF .....	<i>platelet derived growth factor</i>
PPP .....	<i>platelet-poor plasma</i>
P-PRP .....	<i>pure-platelet-rich plasma</i>
PRF .....	<i>platelet-rich fibrin</i>
PRGF .....	<i>plasma-rich in growth factors</i>
PRP .....	<i>platelet-rich plasma</i>
RPM .....	<i>rounds per minute</i>
TGF- $\beta$ .....	<i>transforming growth factor beta</i>
TSP-1 .....	<i>Thrombospondin-1</i>
VEGF .....	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VP .....	<i>Verzweigungspunkte</i>

## **2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 5: Ergebnisse VEGF des ELISA-Tests für PRF und PRP .....	28
Tabelle 6: Ergebnisse der Zytometrie für EDTA-Blut, PRF, PRP und PF .....	29

### 3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PRF .....	3
Abbildung 2: Klassifikation der Thrombozytenkonzentrate nach Dohan Ehrenfest (15).....	6
Abbildung 3: Das Eikamm-Modell, aus der eigenen Versuchsreihe, hier bestückt mit PRF und PFP .....	10
Abbildung 4: Eikamm-Modell, aus eigener Versuchsreihe mit Beschriftung.....	16
Abbildung 5: Übersicht Eikamm Rastermikroskop, 1: Hühnerembryo, 2: PRF-Matrix, 3: Einsprossung Kapillaren.....	17
Abbildung 6: Auszählung der Kapillaren mit Hilfe des Programms Fiji .....	18
Abbildung 7: Entnahme des PRF-Clot mit einer Pinzette.....	19
Abbildung 8: Probandenblut im PRF-Röhrchen nach Zentrifugation .....	19
Abbildung 9: Abtrennen der Erythrozytenschicht mit einer stumpfen Schere .....	19
Abbildung 10: PRF-Kit.....	19
Abbildung 11: PRF-Clots in Presse vor Pressvorgang.....	20
Abbildung 12: fertig gepresste PRF-Clots = PRF-Membranen .....	20
Abbildung 13: Gewebekulturplatte mit DMEM und PRF-Matrix .....	22
Abbildung 14: Boxplot für PRF, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich.....	24
Abbildung 15: Boxplot für PRP, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich .....	25
Abbildung 16: Boxplot für PFP, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich.....	26
Abbildung 17: Boxplot für Kollagenmembran, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich .....	27
Abbildung 18: Blockdiagramm für die Zusammenfassung der Abgabe von VEGF einer PRP-Membran nach 24,48 und 72h .....	28
Abbildung 19: Blockdiagramm für die Zusammenfassung der Abgabe von VEGF einer PRF-Membran nach 24, 48 und 72h .....	28
Abbildung 20: Eikamm mit vermehrter Einsprossung von Kapillaren durch PRF, Roter Pfeil markiert Stelle der Auszählung .....	30
Abbildung 21: Eikamm mit weniger Einsprossung von Kapillaren durch PFP, Roter Pfeil markiert Stelle der Auszählung .....	31

Abbildung 22: Langsame Freisetzung von TGFbeta-1 (a), VEGF (b), PDGF-AB (c) und TSP-1 (d) von der PRF-Matrix während 7 Tagen (27) .....	33
Abbildung 23: Thrombozytenanzahl im Vergleich .....	34
Abbildung 24: Leukozyten und dessen Typen im Vergleich .....	35

## 4 Einleitung

Die Weichgewebs- und Knochenregeneration hat in den letzten Jahrzehnten in der Oralchirurgie und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie an Bedeutung gewonnen und ist durch viele neue Hilfsmittel besser steuerbar.

Sowohl Patienten als auch Behandler werden anspruchsvoller und wünschen sich eine schnelle und schmerzarme Behandlung sowie Heilungsphase. Auch komplexe Patientenfälle wie Tumor- und Unfallpatienten oder Patienten mit dem Risiko einer Medikamenten-assoziierten Kiefernekrose können hiervon profitieren. Bisphosphonate oder antiresorptive Medikamente sind Medikamente, die häufig zur Behandlung von Osteoporose oder bei Tumorpatienten eingesetzt werden. Solche beeinflussen den Knochenstoffwechsel und haben einen negativen Effekt auf den Kieferknochen und die orale Schleimhaut und können häufig Kiefernekrosen auslösen (1). Außerdem betrifft es Patienten, die durch eine langbestehende prothetische Nichtversorgung eine Atrophie – eine Reduktion in Breite und Höhe des Kieferknochens – vorweisen.

Um all diese Patientengruppen suffizient behandeln zu können, müssen immer neue Verfahren und Ansätze, neue Materialien und Methoden entwickelt und erforscht werden, um die oben genannte Problematik der komplexen Patientenfälle zu verringern bzw. ein optimales Ergebnis zu erreichen.

Eine Vielzahl an Methoden sind bereits gut erforscht und optimierte Materialien stehen im klinischen Alltag zur Verfügung. Es besteht inzwischen eine große Breite an Knochenersatzmaterialien, die für Knochenaufbauten in der Implantologie, sowohl horizontal als auch vertikal, eingesetzt werden können. Hier wird zwischen autologen (vom gleichen Individuum), allogenen (anderes Individuum, gleiche Spezies), xenogenen (andere Spezies, meist von Pferd oder Schwein) und alloplastischen (synthetischen) Materialien unterschieden (2). Zusätzlich existieren Membranen und Titanmeshs, welche die Knochenaufbauten schützend abdecken oder in ihrer Konstruktion stützen. Neben Eigenknochen können zum Zweck der Abdeckung von Knochen- oder Weichgewebsdefekten auch Bindegewebs- oder Weichgewebstransplantate der Patienten verwendet werden (3).

In der weiteren Entwicklung entsprechender Methoden spielt das Eigenblut der Patienten bei der Regeneration von Weichgewebe nach oralchirurgischen Eingriffen eine immer größere Rolle. Konzentrate aus Eigenblut, auch autologe Thrombozytenkonzentrate genannt, wurden für den chirurgischen Gebrauch aus der regenerativen Medizin entwickelt. Diese sorgen für die lokale Ausschüttung von Thrombozyten und deren Wachstumsfaktoren in ein chirurgisches Feld oder eine Wunde, um Wundheilung und Geweberegeneration zu stimulieren (4). Autologe Konzentrate können heutzutage in zwei Generationen eingeteilt werden. Zu der ersten Generation gehören das *platelet-rich plasma* (PRP) und das *plasma-rich in growth factors*

(PRGF). Jedoch sind nicht nur die Herstellungsprozesse dieser Konzentrate aufwendig, zusätzlich müssen sie mehrere Zentrifugationsprozesse durchlaufen. Darüber hinaus müssen externe Antikoagulantien hinzugegeben werden. 2001 entwickelte Dr. Joseph Choukroun eine zweite Generation der Thrombozytenkonzentrate, das sogenannte *platelet-rich fibrin* (PRF). PRF ist zu 100% autolog und bedarf keiner weiteren Zugabe anderer Materialien oder Antikoagulantien, erfordert nur einen einzigen Zentrifugationsprozess und kann in unterschiedlichen Konsistenzen hergestellt werden (5).

Ziel der unterschiedlichen Herstellungsprozesse ist es, eine möglichst hohe Konzentration an Thrombozyten zu erhalten. Die Thrombozyten (im Englischen: *platelets*) spielen eine wesentliche Rolle bei der Blutgerinnung und schütten wichtige Wachstumsfaktoren wie z.B: *vascular endothelial growth factor* (VEGF) aus, der die Angiogenese fördert(6).

Ziel dieser Arbeit war es, das angiogenetische Potenzial zweier autologer Thrombozytenkonzentrate (PRF und PRP) mit *platelet-free plasma* (PFP) zu vergleichen, um den potenziellen Zusammenhang zwischen Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration und dem Ausmaß der Angiogenese zu demonstrieren. Bei PFP handelt es sich um eine eigene Präparationstechnik, bei der ein Blutkonzentrat entsteht, das im Vergleich zu PRF und PRP äußerst niedrige Thrombozyten- und Leukozytenkonzentrationen aufweist.

## 5 Literaturdiskussion

### 5.1 Die PRF-Membran

#### 5.1.1 Geschichte

PRF wurde erstmals 2001 von Choukroun et al. für den Gebrauch in der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie beschrieben (7). Es gehört zu der zweiten Generation der Blutkonzentrate (5) und hat den Vorteil, dass es im Vergleich zu den Blutkonzentraten der ersten Generation, leichter herzustellen ist und keine chemischen Zusätze benötigt (7). Die Vorgehensweise gibt vor, das Blut in Glasröhrchen bei 2.700 RPM (*rounds per minute*, also Umdrehungszahl pro Minute) für 12 min mit einer relativen Zentrifugalkraft (RCF = *relative centrifugal force*) von 708 G zu zentrifugieren (8).

#### 5.1.2 Herstellung

Grundsätzlich wird bei der Herstellung des PRF noch dem Grundschema von Choukroun gefolgt. Zuerst erfolgt die Blutentnahme am Patienten. Das entnommene Blut wird umgehend bei ca. 2700 RPM für 10-12 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation teilt sich das Blut in drei klar erkennbare Schichten. Oben setzt sich das flüssige azelluläre Plasma (PPP = *platelet-poor plasma*) ab, in der Mitte findet sich das PRF und im unteren Bereich finden sich Erythrozyten (2).

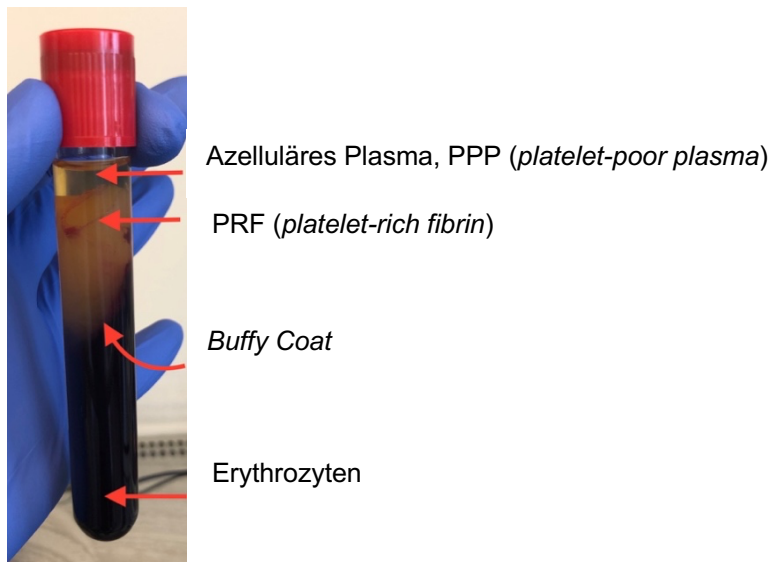


Abbildung 1: PRF

Inzwischen können drei PRF-Membranen unterschieden werden, die auf Basis unterschiedlich angewandter Zentrifugalkraft entwickelt bzw. modifiziert wurden (9). Durch eine systematische Studienserie wurde herausgefunden, dass die Zentrifugalkraft Auswirkungen auf die Ansammlung der regenerativen Zellen in der Fibrinmatrix hat (10). Entsprechend wurde ein *low speed centrifugation concept* (LSCC) eingeführt, um die Bioaktivität der PRF-Membran zu

optimieren (5, 10). Dies beinhaltet drei Protokolle mit einer hohen, einer mittleren und einer niedrigen relativen Zentrifugalkraft.

Das Protokoll mit einer hohen RCF (710 xg), auch L-PRF (*leucocyte platelet rich fibrin*) genannt, basierend auf Choukrouns ursprünglichem Protokoll, wird bei ca. 2400 RPM für 8 min zentrifugiert. Das A-PRF (*advanced PRF*), das mit einer mittleren RCF (208 xg) für 8 min zentrifugiert wird, wird nach weiteren Modifikationen heute als A-PRF+ bezeichnet. Zusätzlich lässt sich ein flüssiges PRF herstellen, das dem Protokoll mit einer niedrigen RCF (60 xg) folgt. Dafür werden Plastikröhrchen benötigt, da das Blut auf dieser Oberfläche nicht so schnell koaguliert wie auf einer Glasoberfläche, die für das solide PRF verwendet wird (9). Die Weiterverarbeitung der PRF-Matrix, ob flüssig oder solide, kann auf unterschiedliche Arten vorgenommen werden. Die feste PRF-Matrix wird mit einer Pinzette entnommen und vorsichtig mit einer stumpfen Schere von der unteren Phase getrennt und anschließend entweder zu einer flachen Membran oder vertikal zu einem sogenannten PRF-Plug gepresst (5). Die flüssige PRF-Matrix wird dagegen mittels einer Spritze abgenommen und kann so zu weiteren Biomaterialien wie Kollagenmembranen oder Knochenersatzmaterialien hinzugegeben werden (5). Somit werden diese biologisiert und die patienteneigenen regenerativen Zellen können die Eingliederung der Membranen oder Ersatzmaterialien, die mit dem flüssigen PRF benetzt oder vermischt wurden, unterstützen und die Knochen- und Weichgewebsregeneration fördern (9).

### 5.1.3 Eigenschaften

Eine der wichtigsten Eigenschaften von PRF, weswegen es heute so erfolgreich verwendet wird, ist die kurze und unkomplizierte Herstellung. Das Blut kann während der Behandlung direkt am Patienten entnommen und unmittelbar ohne jegliche Zugabe von Antikoagulantien zentrifugiert werden (11).

Eine zweite wichtige Eigenschaft des PRF liegt in dessen Aufbau. Man findet inzwischen sehr detaillierte Beschreibungen des genauen Aufbaus bzw. der genauen Struktur des PRF. Grundsätzlich wird es in drei Schichten unterteilt: ein unterer, roter Thrombus, der mit der angrenzenden Erythrozytenschicht in Kontakt steht, eine obere, azelluläre, liquide Fibrinschicht und ein Netzwerk aus gelblich-braunen Säulen, entsprechend der Ansammlung von Thrombozyten, auch *Buffy Coat* genannt (11). Wenn man diese Schichten genauer betrachtet, zum Beispiel mit Hilfe eines Lichtmikroskops oder Rasterelektronenmikroskops, wird die dreidimensionale Architektur des PRF deutlich (12). Laut Dohan et al. sammeln sich insbesondere Thrombozyten und Leukozyten in größeren Mengen innerhalb der ersten Millimeter der Membran oberhalb der Erythrozytenschicht an (12). Dieser sogenannte *Buffy Coat* dient als bioaktives Konstrukt, das die lokale Umgebung für die Differenzierung und

Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen stimuliert. Es fungiert als Knoten für Immunregulation mit zusätzlicher Entzündungskontrolle (13).

Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass die Fibrinmatrix eine tetramolekulare Struktur aufweist, die man als biologisch abbaubares Gerüst bezeichnen kann (7). Dieses Gerüst weist eine signifikante Prozentzahl an gleichseitigen Verbindungen auf, die durch eine niedrige Thrombinkonzentration entstehen. Durch diese Verbindungen bzw. Kreuzungen ist die Fibrinmatrix fein und flexibel und kann das Auffangen von Zytokinen und die Zellmigration optimal unterstützen (14). So bleiben die Zytokine so lange in situ, bis sie stimuliert werden, um dann den Wiederaufbau verletzter Regionen einzuleiten (11).

Neben den sehr wichtigen Thrombozyten und Leukozyten finden sich ebenso die Subgruppen der Leukozyten, Wachstumsfaktoren so wie der für diese Arbeit wichtige Wachstumsfaktor VEGF sowie Plasmaproteine (6).

## 5.2 PRP

### 5.2.1 Geschichte

PRP (*platelet rich plasma*), der Vorgänger von PRF, wurde erstmals 1970 entwickelt und gewann in den 80er Jahren an Bekanntheit (6). Es gehört zu der ersten Generation von Thrombozytenkonzentraten (6). Ursprünglich wurde PRP als Transfusion verwendet, um schwere Hämorrhagien bei Thrombozytopenien zu verhindern (15). Diese Transfusionen enthielten standartmäßig  $0,5 \times 10^{11}$  Thrombozyten (15). Später wurde PRP sowohl in der Orthopädie, Dermatologie, als auch in der kosmetischen und plastischen Chirurgie als Gel oder als Fibrinkleber für die Behandlung von chronischen Haut- und Weichgewebswunden verwendet (16). Erst zu einem späteren Zeitpunkt, 1997, bahnten Whitman et al. (17) den Weg für die erstmalige Nutzung der Thrombozyten-Gele in der Oralchirurgie (7). Die Herstellungsmethoden haben sich seither kontinuierlich und vielfältig weiterentwickelt, sodass es bis heute keine festgelegte, standardisierte Technik gibt (18).

Eine andere Art des PRP, auch PRGF (*plasma or preparation rich in growth factors*) genannt, wurde erstmals 1999 von Anitua entwickelt (19). Dieses unterscheidet sich hauptsächlich von dem hier verwendeten PRP darin, dass der bereits beschriebene *Buffy Coat* bei dieser Präparation nicht mit pipettiert wird, um die Aufnahme von Leukozyten zu verhindern (4). Auf diese Herstellungsmethode wird im Weiteren nicht genauer eingegangen, da diese Art der Präparation im Versuchsaufbau nicht verwendet wurde.

### 5.2.2 Herstellung

Auch die Herstellung des PRP weist einige Unterschiede im Vergleich zum PRF-Verfahren auf.

Das P-PRP (*pure platelet-rich plasma*) wird durch ein automatisiertes Protokoll in einem

Zelltrenner hergestellt. Das modifizierte PRP, Anituas PRGF von 1999, richtete sich nach einem manuellen Protokoll. Per Augenmaß wurde versucht, den *Buffy Coat* nicht mit zu pipettieren. Diese Herstellungsart wurde durch das BioTechnology Institute, Vitoria Spain, kommerzialisiert. Die dritte Vorgehensweise, nach der sich auch das Protokoll in dieser Arbeit richtet, ist das des L-PRP (*leucocyte- and platelet-rich plasma*). Diese Herstellungsart wurde mehrfach modifiziert (nach Curasan, nach Friadent-Schütze, nach Regen und Plateltex) und sieht vor, dass der *Buffy Coat* mit pipettiert wird und somit auch vermehrt Leukozyten vorzufinden sind (15).

Der erste Schritt ist jedoch bei allen manuellen Herstellungsarten identisch. Gesammeltes Blut wird in zwei Schritten zentrifugiert. Im ersten Spin trennen sich die Erythrozyten vom Plasma und dazwischen bildet sich wie auch bei der PRF-Herstellung der *Buffy Coat*. Das überschüssige Plasma wird entweder samt *Buffy Coat* oder ohne pipettiert. Anschließend erfolgt eine zweite Zentrifugation dieses Plasmas. Hier werden die anderen verbliebenen Blutbestandteile nochmals herausgetrennt, um PRP zu erhalten (6). Im Anschluss wird dann wahlweise ein bovines Thrombin als Koagulanz, Calciumchlorid oder auch eine Kombination hinzugegeben (15), um eine Gerinnung für ein solides PRP zu erreichen.

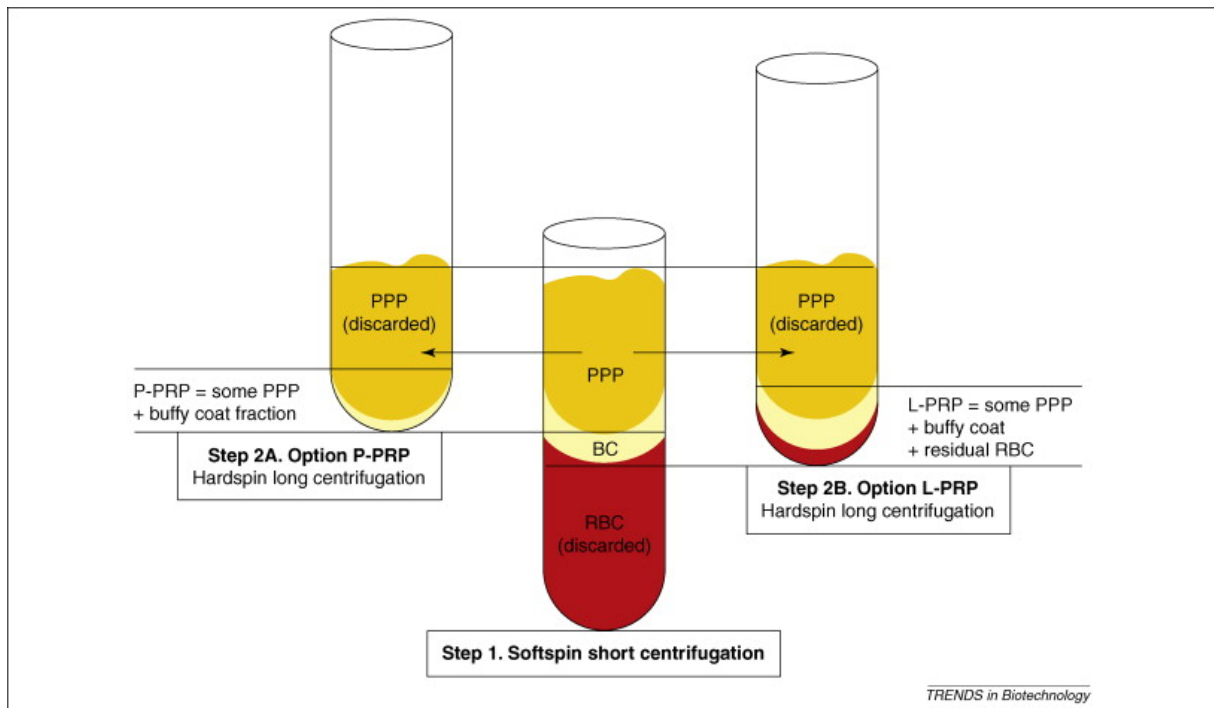


Abbildung 2: Klassifikation der Thrombozytenkonzentrate nach Dohan Ehrenfest (15)

### 5.2.3 Eigenschaften

Im Folgenden wird nicht auf die Eigenschaften jeder einzelnen Art von PRP eingegangen, sondern PRP im Allgemeinen beschrieben.

Das Ziel bei der Verwendung von PRP ist die Wirkung der Thrombozyten zu verstärken. Lacci et al. definieren PRP als ein Teil des Plasmas, das eine Thrombozytenkonzentration über der Norm besitzt (16). Durch die Zugabe von Thrombin oder auch  $\text{CaCl}_2$  (Calciumchlorid) wird nicht nur die Thrombozytenaktivierung, sondern auch die Fibrinpolymerisation ausgelöst (15). Dadurch bildet sich ein Fibrinnetz, in welches sich Blutplättchen einlagern können. Durch die hinzugefügten Koagulantien erfolgt die Fibrinpolymerisation jedoch sehr schnell und es bildet sich im Vergleich zu PRF nur ein schwaches Fibrinnetz (13). Dies ist zudem dünn und unkondensiert, weshalb es als Platzhalter weniger gut geeignet ist (13). Gianni et al. haben ebenfalls beschrieben, dass bei der PRP-Präparation bilaterale Konjunktionen mit einer hohen Thrombinkonzentration gebildet werden, die eine Verdickung der Fibrinpolymere induzieren. Dieser Prozess führt zur Bildung eines starren aber dünnen Netzwerkes, das den Einschluss von Zytokinen und die Zellmigration benachteiligen (20). Auch Dohan et al. beschreiben das aktivierte PRP als ein Fibrinkleber, der fragil und instabil ist (4).

Trotzdem erweist sich PRP als sehr brauchbar. Lacci et al. konnten aufzeigen, dass PRP einen hohen Gehalt an Thrombozyten aufweist und ebenso eine Vielzahl von Gerinnungs- und Wachstumsfaktoren (16). PRP enthält eine 6-8-mal höhere Konzentration an Wachstumsfaktoren als normales Vollblut (6). Zudem dämpft PRP die Freisetzung von Zytokinen und limitiert Entzündungen, indem es mit Makrophagen interagiert und so Geweberegeneration verbessert, neues Wachstum von Kapillaren begünstigt und die Epithelialisierung von chronischen Wunden beschleunigt (16).

PRP besitzt auch einen kleinen Anteil an Leukozyten, dieser fällt jedoch im Vergleich zu PRF geringer aus. Dadurch setzt PRP vergleichsweise weniger Wachstumsfaktoren frei (21).

Im Versuch von Kobayashi et al. konnte im ELISA-Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*) für PRP auch VEGF und PDGF nachgewiesen werden. Der PDGF-Gehalt war in PRP sogar höher als in PRF (22).

In der Vergangenheit wurde im Konsens lange die Elimination von Leukozyten, ohne wissenschaftliche Beweise, empfohlen. Jedoch wurde in aktuellen Studien die Schlüsselrolle der Leukozyten in PRP nachgewiesen. Sie wirken antiinfektiös, immunregulierend und aktivieren bzw. schütten ebenfalls Wachstumsfaktoren aus (15).

### 5.3 Relevante Blutbestandteile/Rolle der Zellen

#### 5.3.1 Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind zusammen mit den plasmatischen Gerinnungsfaktoren elementarer Bestandteil der Hämostase, also der Blutgerinnung. Im menschlichen Blut finden sich bei einem gesunden Erwachsenen 150.000-400.000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$ . Im normalen inaktivierten Zustand zeigen sie eine bikonvexe Form.

Sobald Thrombozyten aktiviert werden, bilden sich Pseudopodien, bewegliche Ausstülpungen der Zellmembran, aus (23).

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung aus Megakaryozyten im Knochenmark. Deshalb besitzen sie keinen eigenen Zellkern. Ihre Lebensdauer beträgt in der Regel 5-12 Tage, danach werden sie großteils in der Milz abgebaut. Ihr Zytoplasma enthält wichtige Speicher-Granula, die ihre Inhalte nach der Plättchenaktivierung ausschütten. Diese Speichergranula bestehen aus  $\alpha$ -Granula, Lysosomen und elektronendichten Granula. Außerdem finden sich Mitochondrien und Filamente in den Plättchen (23-25).

Die  $\alpha$ -Granula speichern wichtige Moleküle der Blutgerinnung. Neben dem Von-Willebrand-Faktor, Faktor V und Faktor VIII, Fibronectin und  $\alpha_2$ -Antiplasmin, wird auch das für unsere Membranen wichtige Fibrinogen (Faktor I) und diverse Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor), VEGF und TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) gespeichert (20). Die elektronendichten Granula enthalten ADP (Adenosindiphosphat), Calcium und Serotonin. Die Lysosomen bestehen hauptsächlich aus sauren Hydrolasen (23, 24).

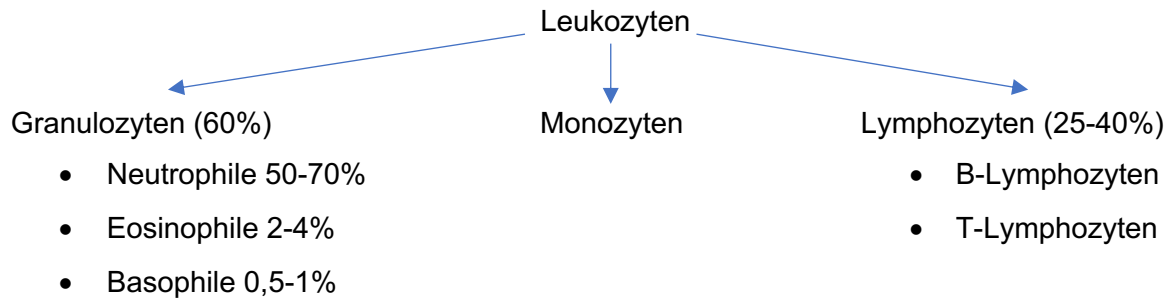
### 5.3.2 Leukozyten

Leukozyten, auch bekannt als weiße Blutkörperchen, sind kernhaltige Zellen. Der Normwert für Leukozyten beträgt bei einem gesunden Erwachsenen ca. 4.000-10.000 Leukozyten pro  $\mu$ l Blut (23).

Leukozyten sind keine einheitlichen Zellen. Man teilt sie in drei große Gruppe ein: Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Die Granulozyten lassen sich nochmals in Neutrophile, Basophile und Eosinophile einteilen. Die Neutrophilen sind die wichtigsten Zellen der unspezifischen Abwehrreaktion. Die Basophilen spielen eine wichtige Rolle bei einer allergischen Reaktion und die Eosinophilen spielen beispielsweise bei einem Parasitenbefall die Schlüsselrolle (24, 25).

Monozyten wandern aus dem Blut in das umliegende Gewebe ein und reifen zu Histiozyten bzw. Makrophagen heran. Sie sind hauptsächlich für die Phagozytose von Krankheitserregern oder Fremdstoffen und dessen Zerstörung verantwortlich.

Die Lymphozyten lassen sich in B- und T-Lymphozyten einteilen und lösen spezifische Immunreaktionen aus (23).



### 5.3.3 Thrombin und Fibrin

Thrombin (Faktor IIa), eine Peptidase, wird aus dem inaktiven Proenzym Prothrombin (Faktor II) durch den Prothrombinaktivator-Komplex abgespalten. Dieser Komplex besteht aus Faktor Xa, Va, Calcium und Phospholipiden (23).

Thrombin ist ein sehr starker Agonist der Thrombozyten und aktiviert diese bereits in einer sehr niedrigen Konzentration. Wichtiger jedoch ist die Aufgabe des Thrombin, während der Hämostase Fibrinogen in Fibrin zu spalten (26). Dadurch entsteht aus dem bis dahin noch flüssigem Zustand des Blutes eine gelartige Substanz (23).

Fibrin ist ein Molekül, das eine Vielzahl von Zellinteraktionen ermöglicht. Innerhalb der Fibrin-Matrix können Zellen proliferieren, sich organisieren und können so ihre Funktionen an verletzen oder entzündeten Stellen ausüben. Fibrin bietet eine Matrix für die Migration von Fibroblasten und Endothelzellen. Diese sind am Prozess der Angiogenese beteiligt und sind mitverantwortlich für die Wundheilung (7).

### 5.3.4 Makrophagen

Wie in Kapitel 5.3.2 bereits erwähnt, differenzieren sich Makrophagen aus Monozyten. Makrophagen haben jedoch nicht nur die Aufgabe der Phagozytose. Makrophagen werden auch als Schlüsselzellen gesehen, die während der Wundheilung Wachstumsfaktoren sekretieren, insbesondere TGF- $\beta$ , PDGF und VEGF (6). Makrophagen, gemeinsam mit neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, spielen somit eine Hauptrolle während der Wundheilung (23).

Zusätzlich sekretieren Makrophagen pro- und antiinflammatorische Zytokine, die die Initiation und Aufrechterhaltung sowie die Regulation einer Entzündungsreaktion begünstigen. Außerdem können sie durch die Sekretion von Chemokinen weitere Abwehrzellen wie neutrophile Granulozyten anlocken (25).

In Kombination mit der Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind sie somit imstande, die Geweberegeneration zu fördern, Angiogenese zu begünstigen und Infektionen zu verhindern (6).

## 5.4 Wachstumsfaktoren

### 5.4.1 VEGF und Angiogenese

VEGF (*vascular-endothelial growth factor*) ist ein hochspezifisches Mitogen (= die Zellteilung anregendes Protein) für unsere vaskulären Endothelzellen. Es kann sowohl von aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet werden, als auch von Makrophagen während der Wundheilung (6).

Es ist der Wachstumsfaktor, der die höchste Auswirkung auf die Angiogenese von Gewebe und maßgebende Effekte für den Umbau von Gewebe hat. Als Angiogenese bezeichnet man die Neubildung oder Neusprossung aus bereits existierenden Gefäßen.

Miron et al. konnten demonstrieren, dass die Einarbeitung von VEGF in biologische Knochenersatzmaterialien eine vermehrte Knochenneubildung als Folge hat (6). Auch die Versuche von Dohan et al., an die der Versuchsaufbau aus Kapitel 6.2.6 ähnelt, konnten aufzeigen, dass durch die hohe Abgabe von VEGF in PRF eine schnellere Wundheilung durch Angiogenese erreicht werden kann (27).

Auch Kobayashi et al. haben in ihrer Gegenüberstellung von PRP und PRF durch einen ELISA-Test und andere Versuche zeigen können, dass VEGF vermehrt in PRF zu finden ist und einen positiven Effekt auf die Angiogenese hat (22).

## 5.5 Das Eikamm-Modell

Das Eikamm-Modell, in der Fachsprache *chorio-allantoic membrane* (CAM) genannt, ist ein relativ einfaches, schnelles und günstiges Verfahren, um ex vivo-Experimente durchzuführen. Ein embryonaler Harnsack (*allantoic*) bildet sich ca. am dritten Tag der Inkubation. Dieser Harnsack vergrößert sich zwischen Tag 4 und 10 immens. Die mesodermalen Schichten verschmelzen und formen die CAM und bilden ein extrem gut vaskularisiertes Netzwerk aus (28).



Abbildung 3: Das Eikamm-Modell, aus der eigenen Versuchsreihe, hier bestückt mit PRF und PFF

Auch Kobayashi et al. nutzten die CAM für ihre Versuche mit PRF. Die verwendete Methodik beschrieben in Kapitel 6.2.1. ist an die Methodik von Kobayashi et al. angelehnt. Befruchtete Hühnereier werden in einen Inkubator bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % gelegt. An Tag 11 wird ein ca. 16 mm großes Loch eröffnet und unterschiedliche Membranen in einer Größe von 5x5 mm werden auf die Kamm gelegt. Anschließend wird erneut für 3 Tage inkubiert. An Tag 0 und an Tag 3 wurde die CAM fotografiert und die Kapillaren mit einem später beschriebenen Verfahren ausgezählt (22).

Ein zusätzlich großer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass in den meisten Ländern der Hühnerembryo bis zum 17. Entwicklungstag nicht als lebendes Tier gilt. Das liegt mitunter daran, dass die CAM nicht innerviert wird und die Experimente beendet werden, bevor sich eine Schmerzrezeption im Gehirn entwickelt. Somit benötigt man keine Erlaubnis für Tierversuche (28).

Jedoch sollte man berücksichtigen, dass die CAM sehr sensitiv und empfindlich ist und extrem sensibel auf Veränderungen der äußeren Faktoren reagiert (28).

### 5.6 Einsatz der Membranen/autologen Blutkonzentrate in der Medizin

#### 5.6.1 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie/Zahnärztliche Chirurgie

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, nimmt die Bedeutung von PRF in der praktischen Medizin stetig zu. In der zahnärztlichen Chirurgie gehört es in den meisten Praxen bereits zum Standard.

In der Literatur sind zahlreiche klinische Studien, Fallberichte oder Reviews zu finden, die den Einsatz von PRF im klinischen Alltag rechtfertigen und dessen Vorteile hervorheben.

Tatullo et al. haben in ihrem Forschungsbericht PRF in Kombination mit alloplastischem Knochenersatzmaterial bei externen Sinuslifts verwendet. Nach 106 Tagen wurde der Knochen des jeweiligen Operationsgebietes histologisch untersucht. Der Lamellenknochen zeigte sich mit einem aufgelockerten Stroma, was reich vaskularisiert erschien (29). Castro et al. heben in ihrem Systematic Review die guten biologischen Beschaffenheiten des PRF, die niedrigen Kosten und die leichte Handhabung hervor (13).

Auch in der Parodontologie wird PRF immer häufiger erfolgreich verwendet. So zeigt der Fallbericht von Chang et al., dass PRF auch als alleiniges Material zum Auffüllen von parodontalen Defekten positive Auswirkungen hat. Es konnte eine Reduktion der Taschentiefen und eine Zunahme des klinischen Attachments nach 3 und 6 Monaten postoperativ gemessen werden. Des Weiteren konnten positive radiologischen Veränderungen beobachtet werden (30). Ebenso konnten Anuroopa et al. mit ihrem Fallbericht bei gingivalen Rezessionen mit Knochendefekten zeigen, dass sich die Taschentiefen und der klinische Attachmentverlust signifikant reduzierten und es ebenfalls radiologisch zu einem

Knochenzuwachs kam. Außerdem lag eine reifere und verdickte keratinisierte Gingiva vor. Zusätzlich berichteten die Patienten über weniger postoperative Schmerzen und Schwellung (31). Auch in der klinischen Studie von Joseph et al. wurden horizontale Knochendefekte mit PRF behandelt. Die 45 teilnehmenden Patienten wurden in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe wurde lediglich mit einem PRF-Gel, die zweite mit PRF-Gel und einer PRF-Matrix und die dritte ohne PRF und nur mit einer klassischen, offenen Parodontitis-Therapie behandelt. In allen Gruppen zeigte sich eine Reduktion der Taschentiefen und eine Zunahme des klinischen Attachements. Jedoch ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen eins und zwei zu Gruppe drei feststellen. Lediglich hinsichtlich der gingivalen Rezessionen und der röntgenologischen Befunde konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden (32).

Patienten, die Bisphosphonate oder andere Medikamente erhalten, die den Knochenstoffwechsel stören, scheinen ebenfalls von der Verwendung des PRF zu profitieren. Es gibt eine Reihe von Studien und Fallberichten, die dies unterstützen.

Zum Beispiel kann PRF zur Unterstützung der Wundheilung nach Zahnextraktionen bei Bisphosphonat-Patienten eingesetzt werden, wie in der Studie von Asaka et al. demonstriert wurde. Hier wurden 102 Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe wurde PRF in die Alveole eingebracht. Die andere Gruppe erhielt einen normalen Wundverschluss. 29 von 73 Patienten zeigten eine komplette Epithelialisierung der Extraktionsalveole nach einem Monat. Die Prävalenz einer verspäteten Heilung war in der Kontrollgruppe signifikant höher (33). Auch wenn bereits eine Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose vorliegt, kann PRF den Wundheilungsprozess unterstützen. Dies zeigen sowohl Tsai et al. als auch Soydan et al. in ihren Fallberichten. Hier wurde PRF sowohl in die Alveole eingebracht als auch als Wundverschluss genutzt. Es konnte beobachtet werden, dass nach 10-14 Tagen ein kompletter Wundverschluss vorlag. Es wurden keine Dehiszenzen oder Entzündungen beobachtet (1, 34). Tsai et al. konnten sogar nach 10 Monaten röntgenologisch auf Panoramaschichtaufnahmen neue Knochenformationen und fehlenden nekrotischen Knochen nachweisen (34).

Weisheitszahnosteotomien gehören vor allem in der Oralchirurgie und der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie zum klinischen Alltag. Auch hier kann PRF ganz einfach in das Operationsgebiet eingebracht werden. Eshghpour et al. haben in ihrer Doppelblindstudie in einer Gruppe Patienten PRF in die Extraktionsgebiete unterer dritter Molaren eingebracht. Eine zweite Gruppe wurde ohne PRF behandelt. Es konnte beobachtet werden, dass das Auftreten einer Alveolitis sicca in der PRF-Gruppe signifikant niedriger war, als in der non-PRF-Gruppe (35).

Auch nach einer einfachen Zahnextraktion kann PRF genutzt werden, um zum Beispiel eine *guided bone regeneration* (GBR) bei bukkalen Knochendefekten zu unterstützen. Dabei

konnte eine verbreiterte keratinisierte Gingiva, eine Verbesserung des Knochenlevels und spätere erfolgreiche Implantationen beobachtet werden (36).

Zuletzt sollte noch der Einsatz von PRF in der Implantologie erwähnt werden. Hier scheint PRF positive Auswirkungen auf die Implantatstabilität zu haben. Oncu et al. haben in ihrem Versuch 20 gesunden Patienten jeweils mindestens zwei Implantate gesetzt. Bei einer Implantation wurde PRF in die Implantatbohrung eingebracht und zusätzlich wurde flüssiges PRF zur Benetzung der Implantatoberfläche genutzt. Der Implantat Stabilitäts-Quotient (ISQ) wurde sowohl nach einer Woche und nach einem Monat gemessen. Die ISQ-Werte der Implantate, die mit PRF behandelt wurden, wiesen signifikant höhere Werte auf, als die in der Kontrollgruppe ohne PRF (37).

### 5.6.2 Andere

Auch in der Humanmedizin werden autologe Blutkonzentrate eingesetzt.

So haben Zumstein et al. PRF zur Unterstützung der Wundheilung bei chronischen Rotatorenmanschetterissen der Schulter eingebracht. PRF wurde hier zwischen Sehne und Knochen gelegt. Nach 6 und 12 Wochen konnte man eine durchschnittlich höhere Vaskularisierung in der PRF-Gruppe nachweisen (38).

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Materialien und Geräte

#### 6.1.1 Brutmaschine

- Eier
- Brutmaschine 3333 von Janeschitz GmbH
- Destilliertes Wasser
- Fusselfreies Papier, VWR, Light-Duty Tissue Wipers 4,5 x 8,3 in.
- Inkubator von Heraeus Instruments, Typ BB 16
- Leukosilk, Tesafilm
- Kanüle, Braun, Sterican  $\varnothing$  0,50 x 40 mm, 25 G x 1½" (PZN 2058009)
- Spritze 10 ml, BD Discardit™ II, Luer Tip (6%)
- Schere
- Parafilm „M“, Bemis PM-996

#### 6.1.2 Zentrifugen

- Große Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Heraeus Megafuge 16
- Kleine Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Fresco 21
- PRF-Zentrifuge von Mectron Duo Quattro©

#### 6.1.3 Herstellung der Membranen

- PRF-Prep-Box mit Pinzette, Schere und Metallschale
- A-PRF, Plain Vacuum tubes 10 ml, by Choukroun, steril
- Mischröhrchen, 15 ml
- Einmal-Pipetten
- Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG
- Clotting-Zusätze: CaCl<sub>2</sub>, 1 M in 0,9% NaCl, Batroxobin
- Vortexschüttler, Fisher Scientific, IKA® MS 3 basic

#### 6.1.4 VHX Digital Microscope Multi Scan von Keyence

#### 6.1.5 Microplate Reader ELISA von Molecular Devices BNR: 06493

#### 6.1.6 ELISA Materialien für Human VEGF

- Reagent Diluent 2  
1:10 mit Aqua dest. verdünnt  
Verwendete Konzentration: 60 ml = 54 ml Aqua dest. + 6 ml Reagent Diluent
- PBS
- Wash Buffer

PBS + 0,05 % Tween 20

Verwendete Konzentration: 500 ml PBS + 250  $\mu$ l Tween 20

- Capture Antibody  
60  $\mu$ g in 500  $\mu$ l PBS  
Verwendete Konzentration: 1  $\mu$ g/ml
- Detection Antibody  
6,0  $\mu$ g in 1000  $\mu$ l Reagent Diluent  
Verwendete Konzentration: 100 ng/ml
- Standard  
60 ng in 500  $\mu$ l Reagent Diluent
- Streptavidin-HRP  
1:200 mit Reagent Diluent  
10 ml Reagent Diluent + 50  $\mu$ l Streptavidin
- Substrat Solution  
5 ml Color Reagent A + 5 ml Color Reagent B
- STOP Solution  
Schwefelsäure 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 ml unverdünnt

### 6.1.7 Blutentnahme

- A-PRF, Plain Vacuum tubes 10 ml, by Choukroun, steril
- Butterfly-Nadel
- S-Monovette® Sarstedt, 3 ml 66 x 11 mm, Citrat 3,13
- Monovettenhalter
- Stauschlauch
- Hautdesinfektion

### 6.1.8 Membranen

- Kollagenmembran Pericardium Jason®, Straumann
- PRF-Membran (s. Methoden)
- PRP-Membran (s. Methoden)
- PFP-Membran (s. Methoden)

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Eikamm-Modell

Nach drei- bis viertägiger Inkubation im Brutkasten, wurden die Hühnereier für das Bestücken der Membranen präpariert. Dies geschah in der Regel am 3. Tag.

Zuerst wurden zwei Streifen Leukosilk längs über das Ei und ein kleines Stück Tesafilm unter einen markierten Punkt geklebt. Dieser Punkt markiert den abgerundeten Pol des Eis. Das Ablieben der Eier sollte das vermehrte Brechen und Einreißen der Eierschale verhindern, ebenso das Verschmutzen der Eikamm mit Bröseln der Schale. Anschließend wurde mit der Kanüle senkrecht von oben durch den markierten Punkt die Eierschale punktiert. Langsam wurden nun circa 8 ml von dem Eiweiß abgezogen. Danach wurde die Einstichstelle mit einem Stück Tesafilm überklebt, um zusätzliches Auslaufen des Eiweißes zu verhindern. Außerdem sollte weiteres Eindringen von Bakterien so ebenfalls minimiert werden. Mit einer spitzen Schere wurde ein ovales Loch innerhalb des Leukosilkstreifens geschnitten und der Schalendeckel wurde entfernt. Bei diesem Schritt kann kontrolliert werden, ob das Ei erfolgreich befruchtet wurde und einen intakten Embryo enthält. Eier, die kein lebenden Embryo aufwiesen, wurden verworfen. Zuletzt wurde das Loch mit einem Parafilmstreifen abgedeckt, das Ei nummeriert und wieder zurück in den Brutkasten gelegt.

Am darauffolgenden Tag, also meist am 4. Tag, wurden die Eier mit den Membranen bestückt. In diesem Versuch wurden immer PRP, PFP oder Kollagen gegen PRF aufgetragen. Zu diesem Zeitpunkt war der Embryo schon deutlich zu erkennen, die meisten Organe waren ausgebildet und gut zu erkennen. Das Gehirn und die großen Augen stachen am meisten hervor.

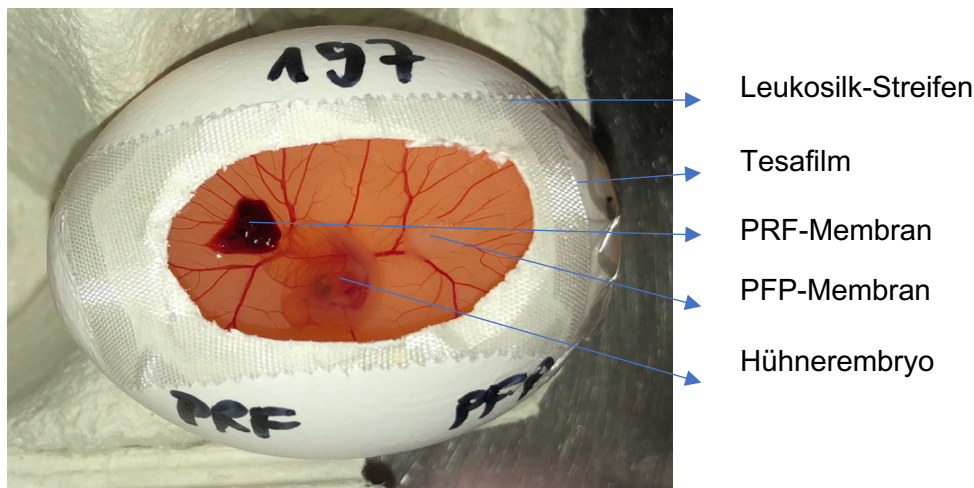


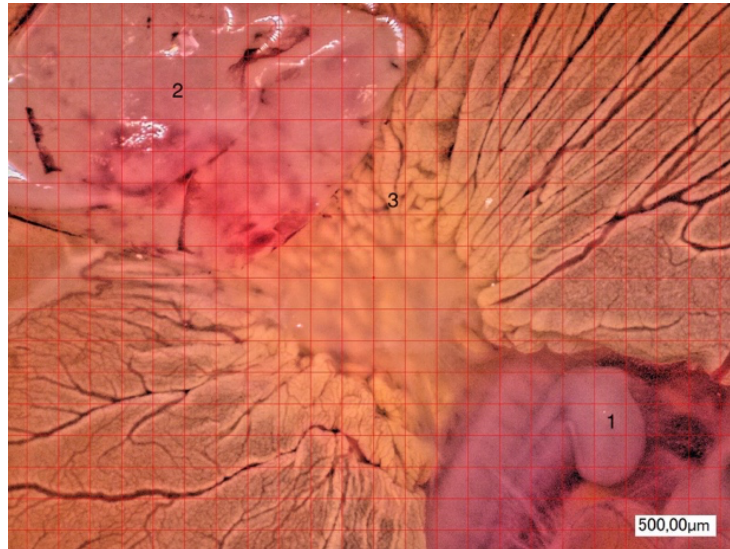
Abbildung 4: Eikamm-Modell, aus eigener Versuchsreihe mit Beschriftung

Nach 24 Stunden wurden die Eier unter einem Raster-Mikroskop fotografiert und ausgewertet.

### 6.2.2 Auszählung Kapillaren und Verzweigungspunkte

Das Eröffnungsloch des Eis musste zunächst erneut mit einer Schere vergrößert werden, um eine optimale Sicht auf die Eikamm zu gewährleisten. Das Ei wurde unter das Rastermikroskop gelegt. Zuerst erfolgte eine Übersichtsaufnahme der ganzen Kamm (siehe Abbildung 5) mit den zwei Membranen. Diese wurden anschließend vorsichtig entfernt und

verworfen. Die Stelle der Eikamm, auf der die Membranen gelegen haben, wurden nun einzeln mit einer Vergrößerung von 500  $\mu\text{m}$  fotografiert. Die Bilder wurden gespeichert und auf einen Computer übertragen.



*Abbildung 5: Übersicht Eikamm Rastermikroskop, 1: Hühnerembryo, 2: PRF-Matrix, 3: Einsprossung Kapillaren*

Mit dem Programm Fiji erfolgte die Auswertung. Hier wurde das gewünschte Foto, das mit dem Rastermikroskop aufgenommen wurde in das Programm eingefügt. Mit Hilfe dieses Programms wurde jede Kapillare oder jeder Verzweigungspunkt innerhalb eines Rasters mit einem Punkt markiert und gleichzeitig gezählt. Es wurden immer nur die Kapillaren und Verzweigungspunkte innerhalb eines Rasters ( $1 \text{ mm}^2$ ) pro Foto gezählt.

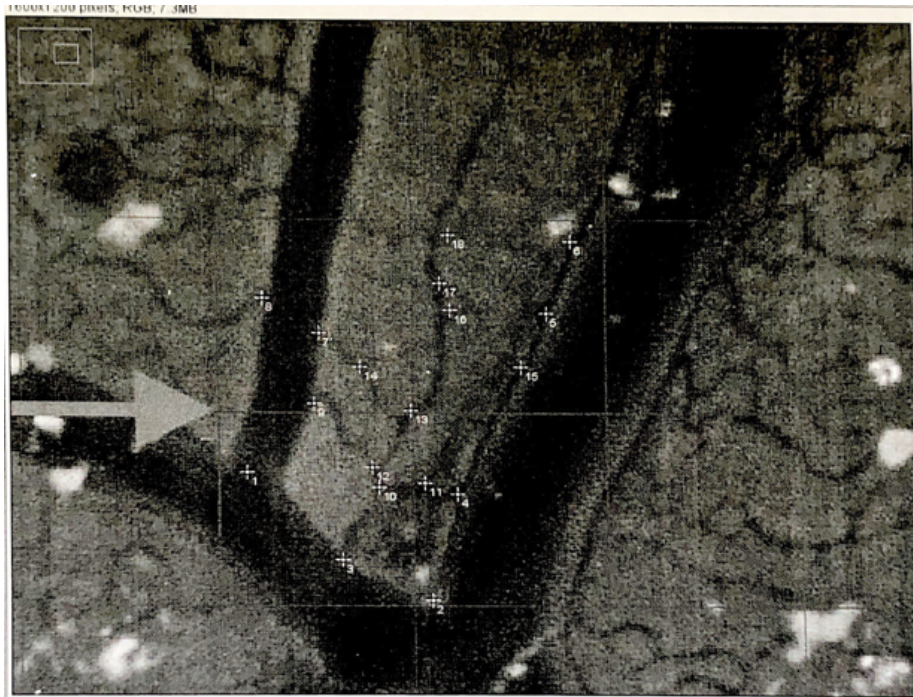


Abbildung 6: Auszählung der Kapillaren mit Hilfe des Programms Fiji

### 6.2.3 PRF-Herstellung

Die Herstellung der PRF-Membran (*platelet-rich fibrin*), erfolgt klassisch über die Methode von Choukroun (8). Zuerst erfolgte die Blutentnahme mithilfe eines Stauschlauches und einer Butterfly nach Hautdesinfektion. In der Regel wurde hier versucht die V. mediana cubiti zu verwenden, die sich in der Armbeuge befindet (5). Das Blut wurde in dem dafür vorgesehenen A-PRF-Röhrchen gesammelt. Auf eine vollständige Füllung der Röhrchen mit 10 ml Blut wurde geachtet. Anschließend wurde die Nadel entfernt, gemäß Richtlinien sicher im Spritzenabwurf verworfen und die Punktionsstelle komprimiert.

Es wurden ca. 4-6 Röhrchen für eine Versuchsreihe verwendet. Um die Unterschiede der PRF-Membranen so gering wie möglich zu halten, wurde immer für alle Versuche nur das Blut eines Probanden abgenommen.

Die Röhrchen des A-PRF beinhalten keine Zusätze, weshalb die Zentrifugation des Blutes schnellstmöglich erfolgen sollte. Die Zentrifugation erfolgte in diesem Fall in der Zentrifuge von Mectron für 8 min bei 13x100 RPM. Hier sollten die Röhrchen in der Zentrifuge immer gegenüber angeordnet sein, um ein Ungleichgewicht zu verhindern (5). Anschließend wurde die geclottete Fibrinmatrix mithilfe des PRF-Kits aus dem Röhrchen entfernt, die untere rote Phase wurde mit einer Schere abgetrennt, und die Matrix mithilfe des Kits horizontal zu einer „Membran“ gepresst, die in der Regel 3,5 x 1 cm groß war. Die Membran wurde nun in kleine 0,5 x 0,5 cm große Quadrate geschnitten und auf die Eikamm oder in eine Gewebekulturplatte für die Vorbereitung des ELISA-Tests platziert.

6.2.3.1 Herstellung des PRF in Bildern

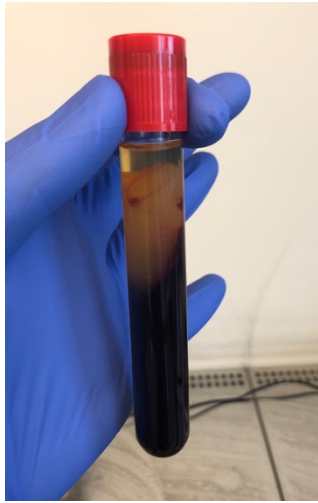


Abbildung 8: Probandenblut im PRF-Röhrchen nach Zentrifugation



Abbildung 7: Entnahme des PRF-Clot mit einer Pinzette

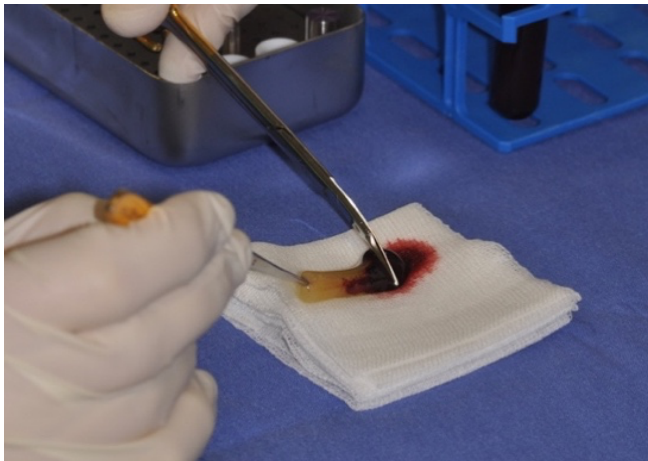


Abbildung 9: Abtrennen der Erythrozytenschicht mit einer stumpfen Schere



Abbildung 10: PRF-Kit

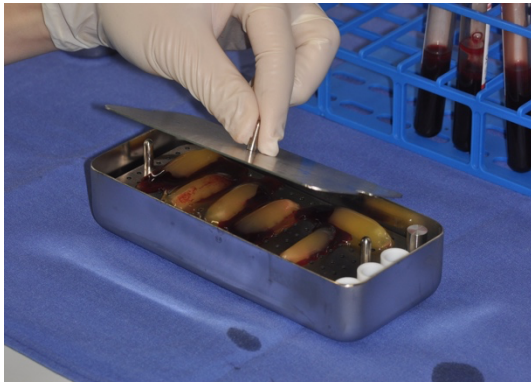


Abbildung 12: PRF-Clots in Presse vor Pressvorgang

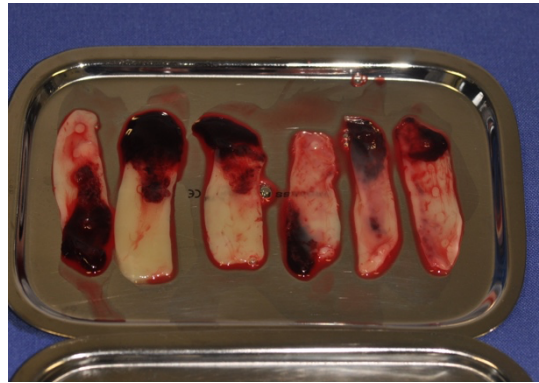


Abbildung 11: fertig gepresste PRF-Clots = PRF-Membranen

### 6.2.4 PRP-Herstellung

Für die Herstellung der PRP-Membran musste zuerst flüssiges PRP hergestellt werden. Hier wurde venöses Blut, ebenfalls idealerweise aus der V. mediana cubiti, mit einem Antikoagulans entnommen, um die Aktivierung und Degranulation des Blutes zu verhindern (14). Dieses wurde anschließend langsam bei 200 G für 10 min zentrifugiert, mit einer sanften Bremse von zwei, damit sich die Schichten, die entstanden sind, nicht verwirbeln. Nach der ersten Zentrifugation entstanden drei sichtbare Schichten. Oben eine Schicht azellulären Plasmas, das auch PPP (*platelet-poor plasma*) genannt wird und die untere Schicht mit Erythrozyten. Dazwischen bildete sich der bereits oben erwähnte *Buffy Coat*, der hauptsächlich Thrombozyten enthält (15). Mit einer dünnen Einmalpipette wurde die obere Schicht PPP und der *Buffy Coat* entnommen, wobei es unvermeidbar ist, auch einige wenige Erythrozyten aus der untersten Schicht zu entnehmen, da es sehr schnell zu Verwirbelungen kommt. Jedoch gibt es bis jetzt keine bessere Methode, den *Buffy Coat* mitzunehmen (14). Im nächsten Schritt wurden die abgenommenen Schichten in einem neuen Röhrchen ohne Antikoagulans erneut zentrifugiert. Diesmal bei 2000 G für 10 min mit einer schnellen Bremse von neun. Hier bildeten sich in der Regel erneut drei Schichten. Oben wieder das PPP, wieder ein *Buffy Coat* und ganz unten ein Rest der mitgenommenen Erythrozyten (15). Als nächsten Schritt wurden die zwei oberen Schichten PPP und *Buffy Coat* erneut mit einer Pipette entnommen und in einem dritten Röhrchen gesammelt. Dies zeigte unser flüssiges PRP (*platelet-rich plasma*).

Um das flüssige PRP nun in eine Membran umzuwandeln, benötigte es eine Zugabe von einem Antikoagulans. In diesem Fall wurde eine selbst hergestellte  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Calciumchlorid) gewählt ( $\text{CaCl}_2$ , 1M in 0,9% NaCl) (39). Die Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:40 zu dem PRP dazugegeben und anschließend für 30 s auf dem Vortexschüttler bei einer hohen Stufe aktiviert. Für die weitere Aktivierung des Antikoagulans

wurde die Lösung des PRP plus CaCl<sub>2</sub>-Lösung noch ca. 30 min in einem Wasserbad von 37 °C gestellt.

Nach 30 min entstand eine gelartige Konsistenz, die sich mit einer Pinzette entnehmen ließ. Die gelartige Membran wurde mit Hilfe des PRF-Kits ebenfalls horizontal gepresst und in kleine 0,5 x 0,5 cm große Quadrate geschnitten. Diese wurden jetzt gegen die PRF-Membran auch auf die Eikamm gelegt.

### 6.2.5 PFP-Herstellung

Als dritte Membran wurde die PFP-Membran, auch *platelet-free plasma*, hergestellt. Der Ablauf erfolgte analog zu der PRP-Membran. Jedoch wurde dem gesammelten PRP kein Antikoagulans hinzugefügt, sondern es wurde in kleine 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen abgefüllt (jeweils 1 ml/Röhrchen). Diese wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge erneut bei 2402 RPM (ca. 30 000 G) für mindestens 10 min zentrifugiert. Nach 10 min entstanden wieder zwei Schichten, die nur zu erkennen waren, wenn das Röhrchen gegen das Licht gehalten wurde. Am unteren Boden des Röhrchens war dann ein kleiner rötlich-brauner Punkt zu erkennen, der die restlichen Erythrozyten und Thrombozyten enthielt. In der oberen Schicht hatte sich ein thrombozytenfreies Plasma gebildet, PFP. Dieses wurde pipettiert und in einem neuen großen Röhrchen gesammelt. Hier wurde nun ein starkes Antikoagulans, Batroxobin, ein Schlangengift, hinzugefügt, was ebenfalls mit Hilfe des Wasserbades aktiviert wurde. Pro ml wurden hier 1,25 µl Batroxobin hinzugefügt. Nach ca. 20 min entstand wieder eine gelartige Konsistenz, die genau wie PRP und PRF zu einer Membran gepresst werden konnte. Da versucht wurde den Vergleich mit PRF zu beobachten, wurde auch die fertige PFP-Membran gegen die PRF-Membran auf die Eikamm gelegt und nicht gegen die PRP-Membran.

### 6.2.6 ELISA-Proben

Die Herstellung der Membranen erfolgte wie oben beschrieben. Nun wurde in einer Gewebekulturplatte mit 12 Well (3 x 4) in jedes Well 2 ml Medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gegeben. Anschließend wurden in jedes Well eine 0,5 x 0,5 cm große Membran gelegt. Die Proben wurden in einen Brutschrank bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 65 % gegeben. Es wurden jeweils zum Zeitpunkt 0 h, nach 24 h und nach 48 h 500 µl Medium entnommen und in 1 ml große Eppendorf-Röhrchen abgefüllt. Falls der ELISA-Test nicht direkt im Anschluss stattfand, wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

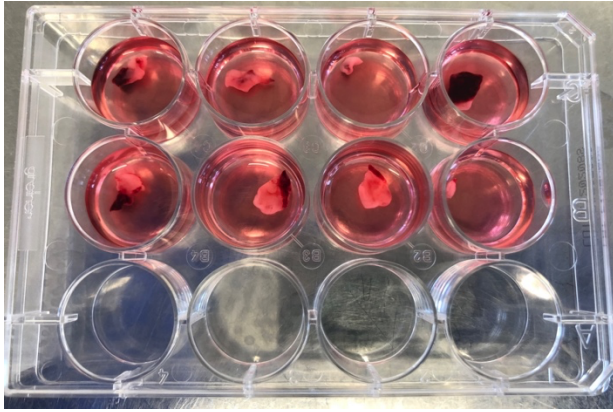


Abbildung 13: Gewebekulturplatte mit DMEM und PRF-Matrix

### 6.2.7 ELISA zur quantitativen Bestimmung von Wachstumsfaktoren

Für die ELISA wurden die im vorher beschriebenen Verfahren hergestellten Zellkulturüberstände der Membranen verwendet.

Zuerst wurde eine 96-Well Platte vorbereitet. Nachdem alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht wurden, wurden 10 ml PBS + 83  $\mu$ l Capture Antibody vermischt. Dann wurden 100  $\mu$ l des verdünnten Capture Antibody in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde beschriftet, versiegelt und über Nacht abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Capture Antibody entfernt und die Platte wurde mit dem Wash buffer gewaschen. Hier wurden in drei Waschvorgängen 400  $\mu$ l Wash buffer verwendet. Durch hartes Ausklopfen auf Papiertüchern wurde alle Restflüssigkeit entfernt. Anschließend wurden 300  $\mu$ l Reagent Diluent aufgetragen, die Platte mit Plate Sealers abgedeckt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Waschvorgang wie oben beschrieben wiederholt. Somit waren die vorbereitenden Schritte abgeschlossen.

Die zu verwendeten Proben wurden zuerst 1:2 verdünnt. Das heißt 200  $\mu$ l Probe + 200  $\mu$ l PBS-FCS-Lösung. Nun wurden die verdünnten Proben in Triplets auf die 96-Well Platte aufgetragen. Dabei wurden 100  $\mu$ l Standard pipettiert. Die Platte wurde erneut abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der oben beschriebene Waschvorgang wiederholt. Nach 2 h wurde 100  $\mu$ l pro Well Detection Antibody aufgetragen und mit einem neuen Plate Sealer abgedeckt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur und der Waschvorgang wurde erneut wiederholt. Nun wurden 100  $\mu$ l Streptavidin HRP pro Well pipettiert und diesmal die abgedeckte Platte nur für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wichtig in diesem Schritt war, dass die Inkubation ohne UV-Einstrahlung an einem abgedunkelten Ort stattfand. Der Waschvorgang wurde erneut wiederholt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Substrat Solution auf jedes Well aufgetragen und bei gleichen Bedingungen wie im vorherigen Schritt für 20 min inkubiert. Hier wird das an den Antikörper-Komplex gebundene Enzym umgesetzt und wird folglich als Farbumschlag

sichtbar. Je nachdem wie viel Wachstumsfaktor sich in der Probe befand, zeigt es sich als intensive Farbe oder als sehr schwache Farbe.

Abschließend wurden 50 µl STOP-Solution hinzugefügt und diese durch leichtes Aufklopfen gut vermischt. Die Stopplösung beendet die enzymatische Reaktion.

Die anschließende Auswertung fand im Microplate Reader statt. Dabei wurden Absorptionswerte bei 450 nm gemessen.

### 6.2.8 Auszählung der Proben im Fremdlabor

Die drei Thrombozytenkonzentrate wurden in ihrem flüssigen Zustand in 2 ml große Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und in das Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz für die Durchflusszytometrie abgegeben.

Somit wurde für jedes Konzentrat ein kleines Blutbild plus die differenzierten Leukozyten (also neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) bestimmt. Hier werden Zellen auf Grund ihrer Größe mithilfe von Laserstrahlung bestimmt. Die Zellen fließen schnell hintereinander mit einer hohen Geschwindigkeit durch eine Messkammer, die einen Laserstrahl beinhaltet. Jede Zelle streut das Licht auf Grund ihrer Größe und Granularität in verschiedene Richtungen (40).

### 6.2.9 Statistische Auswertung

Aufgrund der Fallzahl und des methodischen Aufbaus dieser Arbeit wurde eine rein deskriptive Beschreibung der Ergebnisse mittels Mittelwerte durchgeführt.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Auszählung Kapillaren und Verzweigungspunkte

Um die Angiogenese nachzuweisen, wurden Kapillaren (K) und Verzweigungspunkte (VP) mit Hilfe des Fiji-Programms nachgezählt. Hierfür wurden die Bilder des Mikroskops in das Programm eingefügt. Anschließend wurde jeweils ein Raster von 1 mm<sup>2</sup> mit den meisten Kapillaren ausgewählt und mit Zählpunkten markiert. Der Mittelwert für die Anzahl der Kapillaren lag bei  $47,02564103 \pm 11$  und der Mittelwert für die Anzahl der Verzweigungspunkte bei  $45,74358974 \pm 12,8$ . In den folgenden Graphiken sind die Verzweigungspunkte und die Kapillaren jeweils für PRF, PRP, PFP und KM nebeneinander dargestellt.

#### 7.1.1 PRF

Der Mittelwert für die Anzahl der Kapillaren lag bei  $47,02564103 \pm 11$  und der Mittelwert für die Anzahl der Verzweigungspunkte bei  $45,74358974 \pm 12,8$ .

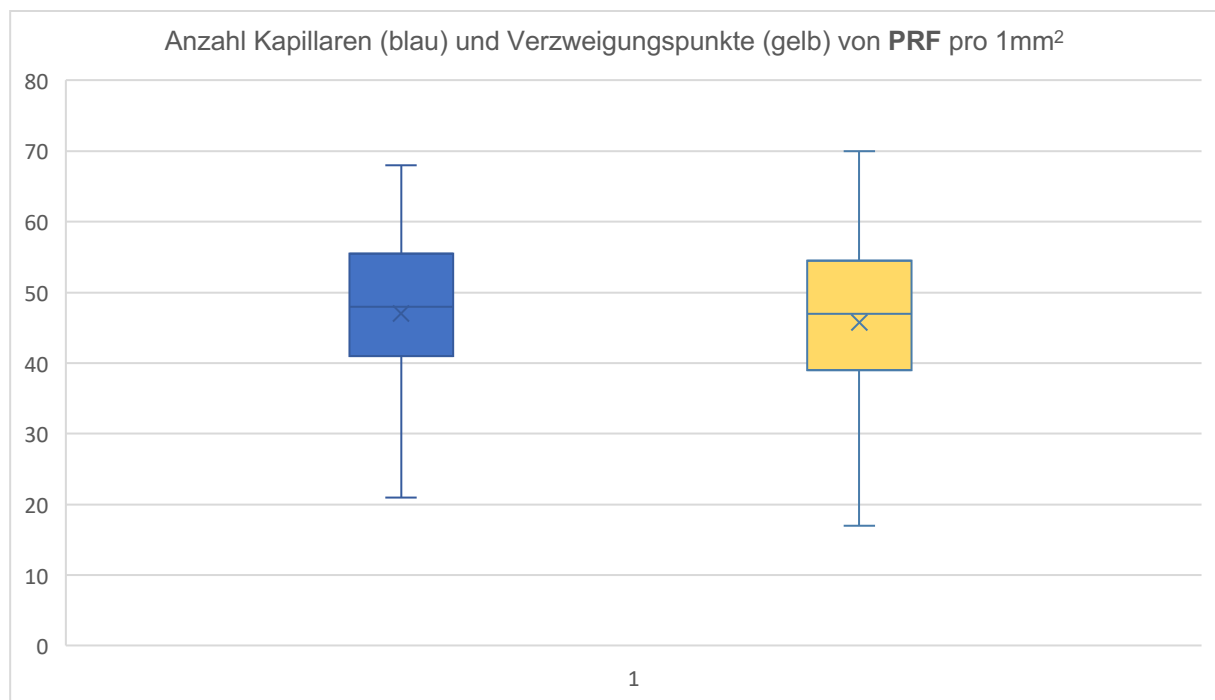


Abbildung 14: Boxplot für PRF, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich

7.1.2 PRP

Der Mittelwert für die Anzahl der Kapillaren lag bei  $30,88571429 \pm 4,4$  und der Mittelwert für die Anzahl der Verzweigungspunkte bei  $28 \pm 5,2$ .

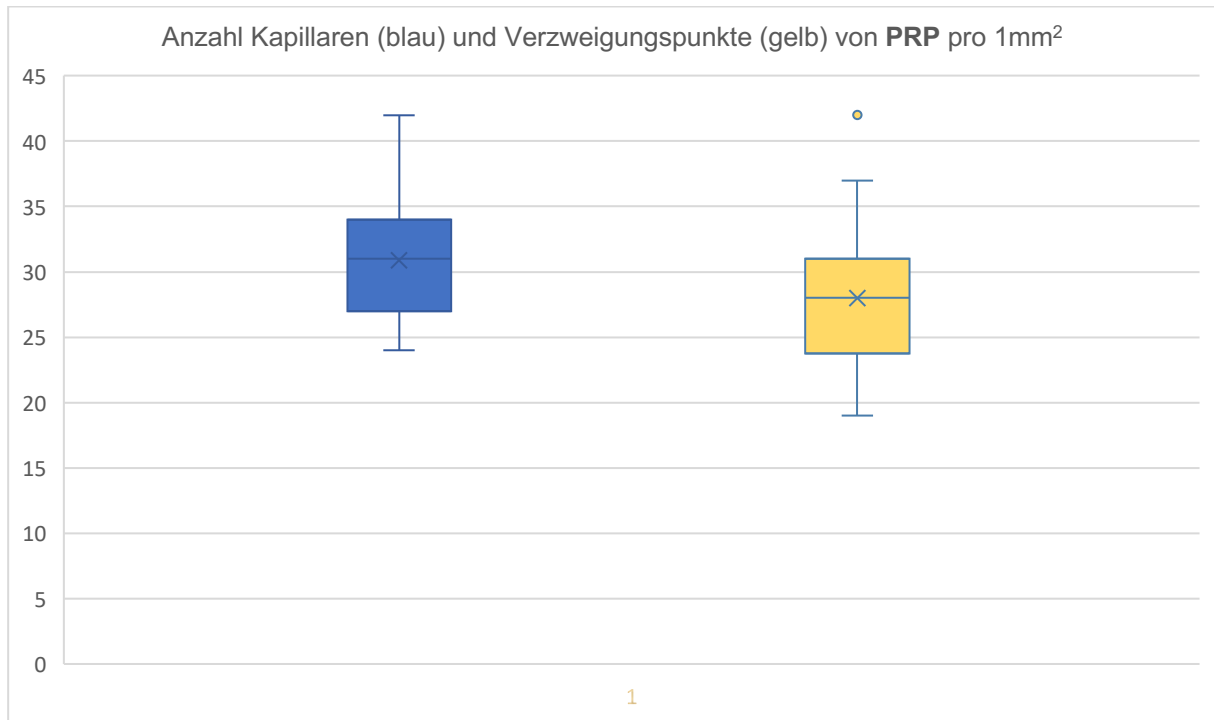


Abbildung 15: Boxplot für PRP, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich

7.1.3 PFP

Der Mittelwert für die Anzahl der Kapillaren lag bei  $22,42857143 \pm 4$  und der Mittelwert für die Anzahl der Verzweigungspunkte bei  $20,53571429 \pm 4,5$ .

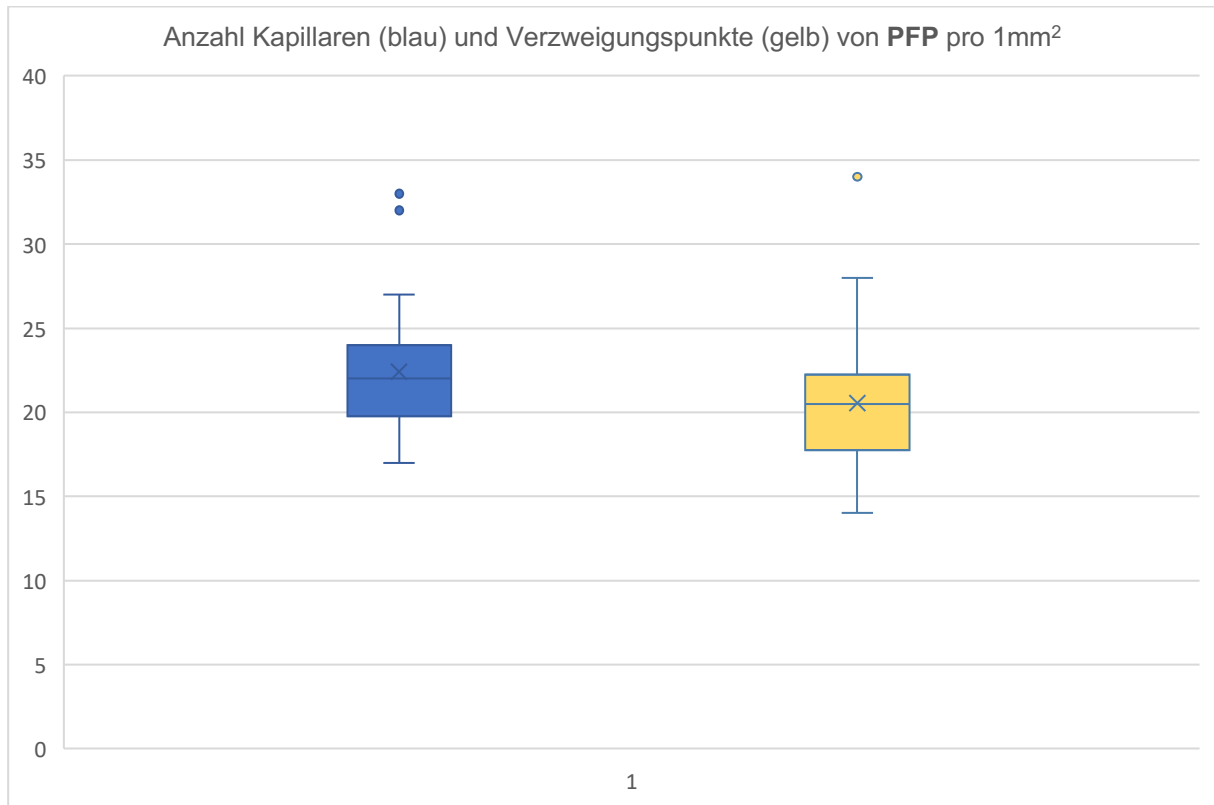


Abbildung 16: Boxplot für PFP, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich

#### 7.1.4 Kollagenmembran

Der Mittelwert für die Anzahl der Kapillaren lag bei  $10,36842105 \pm 3,6$  und der Mittelwert für die Anzahl der Verzweigungspunkte bei  $14,10526316 \pm 6,5$ .

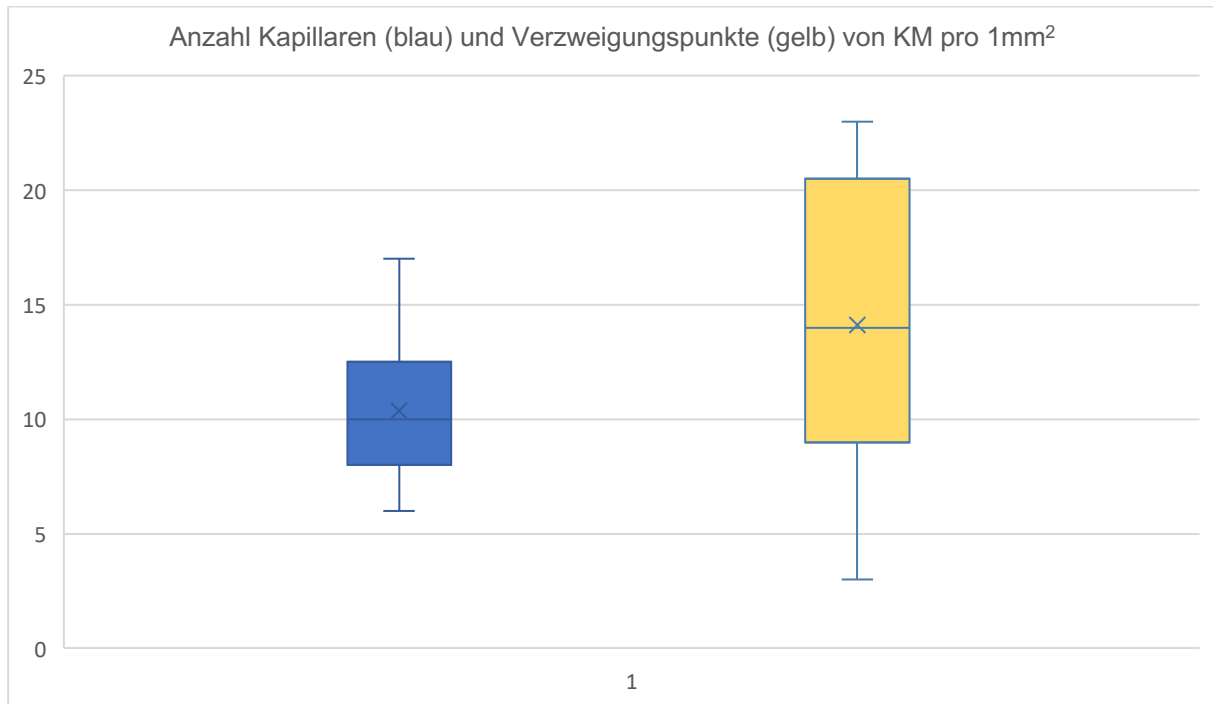


Abbildung 17: Boxplot für Kollagenmembran, Kapillaren und Verzweigungspunkte im Vergleich

#### 7.2 ELISA Ergebnisse VEGF

Der ELISA-Test wurde für den Wachstumsfaktor VEGF durchgeführt. Die Proben wurden wie bereits in Material und Methoden erklärt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 24, 48 und 72h) eingefroren und dann ausgewertet.

Viele bzw. die meisten der Ergebnisse des ELISA-Tests waren ungültig bzw. nicht auslesbar, daher liegt nur eine kleine Anzahl an Ergebnissen vor (angegeben in pg/ml). Die Daten von PFP waren nicht auswertbar, da voraussichtlich zu geringe VEGF-Werte vorlagen.

Wenn man die wenigen vorliegenden Werte jedoch miteinander vergleicht, ist zu erkennen, dass bei 24 und 72 h die Mittelwerte für PRF höher liegen, als die von PRP. Lediglich nach 48h ist der Mittelwert von PRP höher.

## Ergebnisse

PRF			PRP		
24h	48h	72h	24h	48h	72h
119,865	159,755	172,408	24,614	32,402	19,996
53,096	64,102	81,989	22,934	22,934	68,832
1391,675	1213,125	1167,087	1586,778	2343,600	1298,875
2542,244	216,109	1543,234			426,449
987,801		281,571			
2267,686					
108,804					
<b>936,896</b>	<b>413,273</b>	<b>649,258</b>	<b>547,552</b>	<b>799,645</b>	<b>453,538</b>

Tabelle 1: Ergebnisse VEGF des ELISA-Tests für PRF und PRP

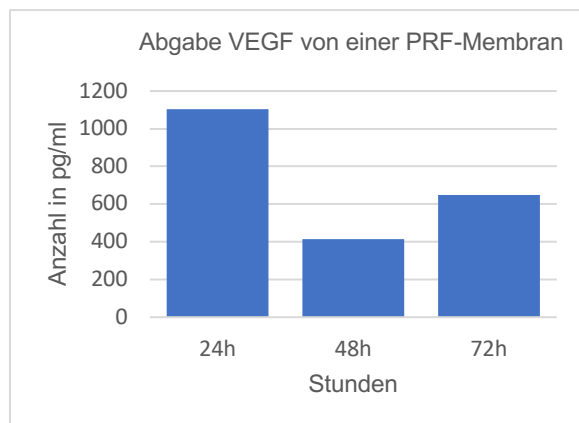


Abbildung 19: Blockdiagramm für die Zusammenfassung der Abgabe von VEGF einer PRF-Membran nach 24, 48 und 72h

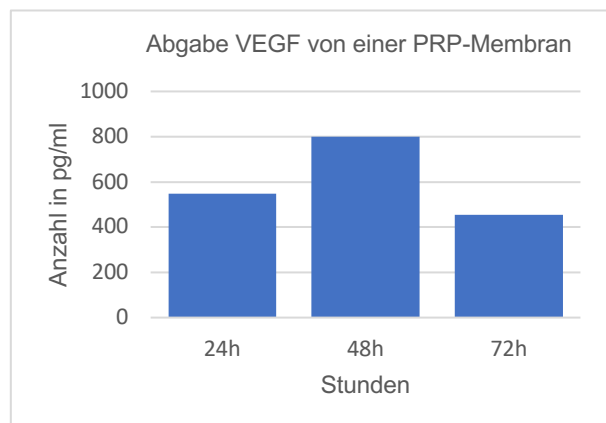


Abbildung 18: Blockdiagramm für die Zusammenfassung der Abgabe von VEGF einer PRP-Membran nach 24, 48 und 72h

### 7.3 Zytometrie der Proben

PRF, PRP und PFP wurden jeweils in ihrer flüssigen, nicht koagulierten Form in 2 ml Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz in einen Durchflusszytometer gegeben. Damit wurde für die Proben ein kleines Blutbild erstellt. Zusätzlich wurden noch die differenzierten Zellen der Leukozyten bestimmt. Als Referenz wurde das EDTA-Blut der Probandin ebenfalls mitbestimmt.

## Ergebnisse

	<b>EDTA-Blut</b>	<b>PRF</b>	<b>PRP</b>	<b>PPF</b>
<b>Erythrozyten</b>	4.250.000	50.000	3.000	0
<b>Thrombozyten</b>	247.000	356.000	321.000	3.000
<b>Leukozyten</b>	6.180	680	10	0
<b>Neutrophile</b>	3.250	130	10	0
<b>Lymphozyten</b>	2.340	450	10	0
<b>Monozyten</b>	300	90	0	0

*Tabelle 2: Ergebnisse der Zytometrie für EDTA-Blut, PRF, PRP und PF*

## 8 Diskussion

Unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage war das Ziel der Versuchsreihe, die unterschiedlichen Präparationstechniken miteinander zu vergleichen und zu zeigen, welche Membran die besten Ergebnisse hinsichtlich Angiogenese liefert und woran dies auf zellulärer Ebene zu erklären ist.

Nach Auswertung der Untersuchungsreihen zeigte PRF Hinweise auf eine erhöhte Angiogenese im Vergleich zu PRP und PFP. Das Ausmaß der Angiogenese war in den Versuchsreihen mit PFP am geringsten. Die Konzentrationen an Thrombozyten und Leukozyten war in der Zytometrie für PRF am höchsten.

Vergleicht man den Aufwand der drei Techniken miteinander, so zeigte sich, dass das Protokoll zur Herstellung von PRF deutlich einfacher und schneller war.

Die Auszählung der Kapillaren und Verzweigungspunkte im Eikamm-Modell zeigte signifikante Unterschiede. PRF lag mit einem Mittelwert bei der Kapillarenanzahl von  $47,03 \pm 11$  und der Anzahl der Verzweigungspunkte von  $45,74 \pm 12,8$  über den Werten von PRP ( $30,89 \pm 4,4$  und  $28 \pm 5,2$ ) und PFP ( $22,43 \pm 4$  und  $20,55 \pm 4,5$ ). Dies verdeutlicht, dass die PRF-Membran durch ihre gute Bioaktivität die höchste Gefäßneubildung und -reifung, also Angiogenese, im Vergleich zu den anderen Membranen induzieren konnte.

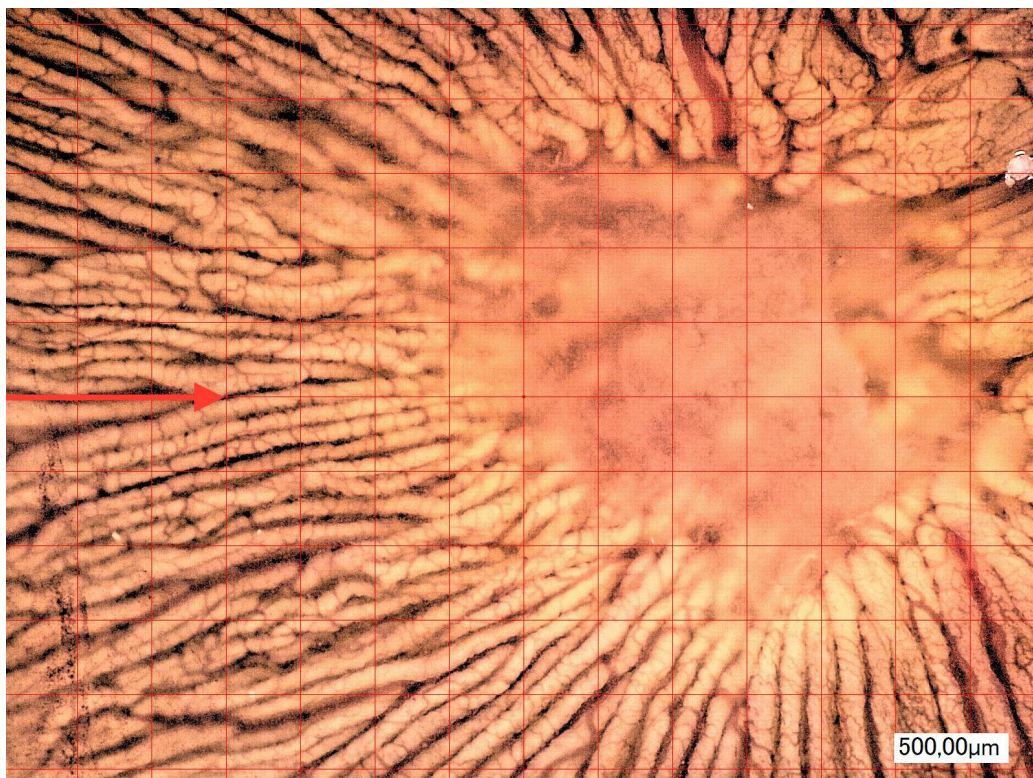


Abbildung 20: Eikamm mit vermehrter Einsprossung von Kapillaren durch PRF, Roter Pfeil markiert Stelle der Auszählung

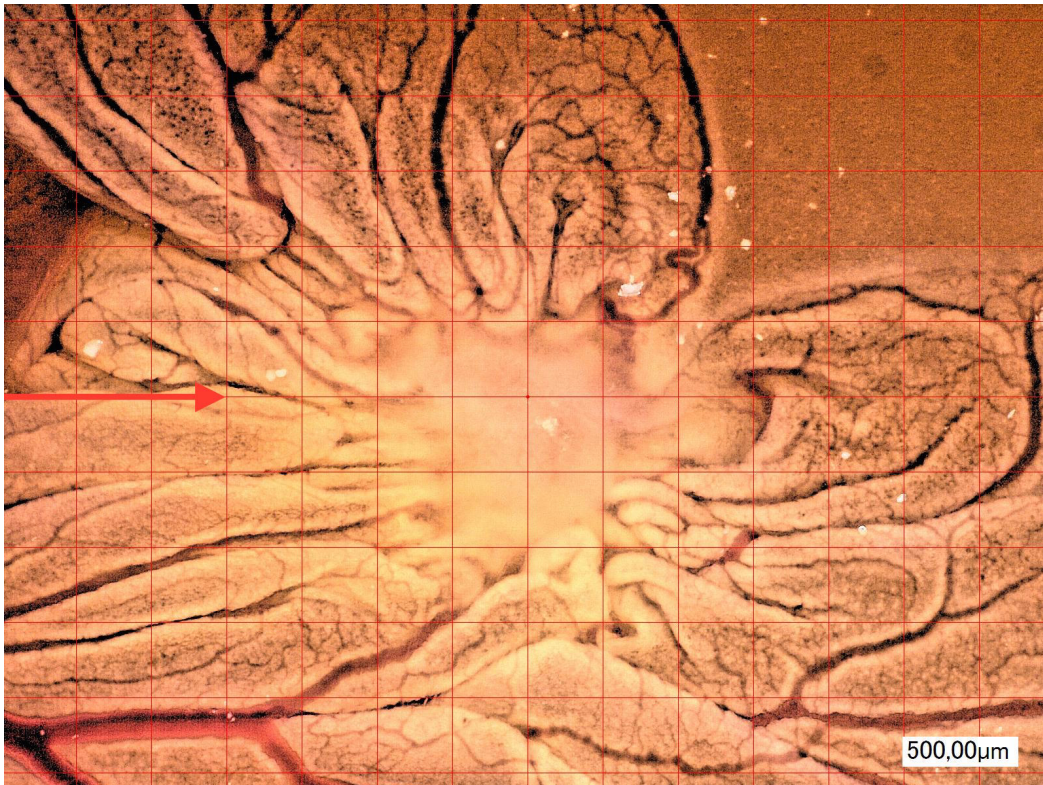


Abbildung 21: Eikamm mit weniger Einsprossung von Kapillaren durch PFP, Roter Pfeil markiert Stelle der Auszählung

Kobayashi et al. haben ebenfalls PRF mit anderen autologen Blutkonzentraten verglichen, um das Potenzial der Angiogenese herauszuarbeiten. Es wurden drei unterschiedliche Konzentrate miteinander verglichen: PRF, PRP und PPP (*platelet-poor plasma*). Mit Hilfe von einem ELISA-Test, Scratch Assay und CAM-Assay wurden die einzelnen Eigenschaften hinsichtlich Angiogenese herausgearbeitet. Im ELISA-Test waren VEGF und PDGF-BB in PRP und PRF höher konzentriert als im PPP. Im Scratch Assay zeigte sich PRF am effektivsten bezüglich der Wundheilung. Und auch im CAM-Assay, das dem in dieser Arbeit beschriebenen Eikamm-Modell gleicht, zeigte sich PRF am effektivsten für Neovaskularisation. Mit diesen Versuchen konnten Kobayashi et al nachweisen, dass PRF und andere autologe Blutkonzentrate angiogene Faktoren enthalten. Zusätzlich dienen sie als Gerüstmaterial und als Reservoir für Wachstumsfaktoren, die die Wundheilung unterstützen (22).

Miron et al. haben in ihrem Review von 2016 alle verfügbaren Studien und verfügbare Literatur hinsichtlich PRF und Weichgewebsregeneration, Wundheilung und Augmentation berücksichtigt. Sechs von sieben Studien (85,6%) haben den positiven Effekt von PRF in vitro auf das Verhalten von Weichgewebe nachgewiesen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass PRF für vermehrte Zellproliferation verantwortlich war, dass PRF die mitogene Aktivität von Endothelzellen, die relevant für Angiogenese sind, erhöht und dass PRF wichtige Wachstumsfaktoren freisetzt (6).

Auch in den in vivo Studien konnte der positive Effekt von PRF nachgewiesen werden. In allen 11 berücksichtigten Studien konnte gezeigt werden, dass PRF Weichgewebsheilung unterstützt, in dem es Angiogenese in den Defekten fördert (6).

Zusätzlich wurden 31 klinische Studien analysiert. Hier konnten 27 von 31 Studien einen vorteilhaften Nutzen für den Gebrauch von PRF beim Menschen bezüglich Wundheilung, Weichgewebsregeneration und Angiogenese zeigen (6). Miron et al. kamen zu dem Schluss, dass PRF sowohl in der Medizin als auch der Zahnmedizin, positive Effekte auf den Wundheilungsprozess nach regenerativer Therapie hat (6).

Tatullo et al. zeigen ebenfalls in ihrer Studie, dass PRF Angiogenese fördert. Hier wurden 72 Sinuslifts an 60 Patienten durchgeführt, die eine Knochenhöhe von weniger als 5mm im Oberkieferseitenzahnbereich aufwiesen. Als Aufbaumaterial wurde hier ein xenogenes Knochenersatzmaterial (BioOss, Firma Geistlich) zusammen mit einer gepressten PRF-Membran verwendet. Die Operationsstellen wurden zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten wiedereröffnet, um eine Probe aus dem Knochen zu entnehmen. In alle Proben konnte histologisch ein lockeres und reich vaskularisiertes Stroma nachgewiesen werden. Jedoch muss hier erwähnt werden, dass es keine Kontrollgruppe gab, um einen Vergleich der Knochenproben durchführen zu können (29).

Yoon et al. führten eine in vivo-Studie an Hasen durch, in der kraniale Knochendefekte in der einen Gruppe mit PRF und bovinem Knochenersatzmaterial durchgeführt wurden und in der anderen Gruppe ohne PRF. Es sollte der Einfluss von PRF auf Angiogenese und Osteogenese in einer *Guided Bone Regeneration* (GBR) untersucht werden. Es wurden Proben nach 1, 2 und 4 Wochen entnommen. Diese Proben wurden dann unter einem Lichtmikroskop histologisch untersucht. Durch eine Immunhistochemie wurde die Freisetzung von VEGF bestimmt. Das Ausmaß der Freisetzung von VEGF durch PRF war zu allen Zeitpunkten höher, als in den Kontrollgruppen, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (41).

Ziel der zweiten Versuchsreihe war es, durch einen ELISA-Test herauszufinden, ob VEGF von den einzelnen Membranen in dessen Umgebung freigesetzt wird und ob sich die Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten ändert.

Die Ergebnisse dieser Testreihe lassen keine fundierte Aussage zu. Die ermittelten Werte des ELISA-Tests waren gering und wiesen ausgeprägte Schwankungen auf (siehe Tabelle in Kapitel 7.2). Häufig konnte durch den Microplate-Reader kein Wert bestimmt werden. Somit wurden diese Ergebnisse nicht interpretiert.

Folgende Faktoren könnten die Versuchsreihe negativ beeinflusst haben: Zum einen waren die PRP und PFP-Membranen nicht so stabil in ihrem Gerüst wie die PRF-Membran. Gerade PFP löste sich häufig bereits nach 7h auf und war nicht mehr zu erkennen. Auch PRP war oft nicht mehr als stabiles Gerüst zu sehen. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die Proben lediglich bei -20 °C aufbewahrt, nicht wie bei Dohan et al. bei -80 °C. Außerdem ist die Aufbereitung

der Proben bzw. die diversen Arbeitsschritte des ELISA-Tests sehr aufwendig und fehleranfällig. Darüber hinaus war die Anzahl der durchgeführten ELISA-Tests zu gering. Dohan et al. haben in ihrer Studie von 2009 einen ähnlichen Versuch durchgeführt, um nachzuweisen, dass PRF aus seinem festen Fibringerüst bestimmte Wachstumsfaktoren ausschüttet. PRF wurde nach Choukrouns Protokoll hergestellt und horizontal zu Membranen gepresst. Anschließend wurde PRF dem DMEM zugesetzt. Die Membran wurde immer nach bestimmten Zeiten erneut in DMEM gegeben und das verbliebene DMEM wurde bei -80 °C eingefroren, bevor der ELISA-Test durchgeführt wurde. Proben wurden jeweils nach 1, 4, 24 (1 Tag), 72 (3 Tage), 120 (5 Tage) und 168 Stunden (7 Tage) gesammelt. Ein ELISA-Test wurde dann für die Wachstumsfaktoren TGFβ-1, PDGF-AB, VEGF und Thrombospondin-1 (TSP-1) durchgeführt. Die Autoren konnten zeigen, dass signifikante Mengen zu jedem der Zeitpunkte, auch noch nach 7 Tagen, für die Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden konnten. VEGF zeigte eine sehr hohe Freisetzung in den ersten 4 Stunden, flachte dann ab, stieg dann aber stetig bis Tag 7 an (27). Auch die anderen Wachstumsfaktoren und TSP-1 sind in folgender Abbildung (Abbildung 3) mit ihren Freisetzungskurven dargestellt.

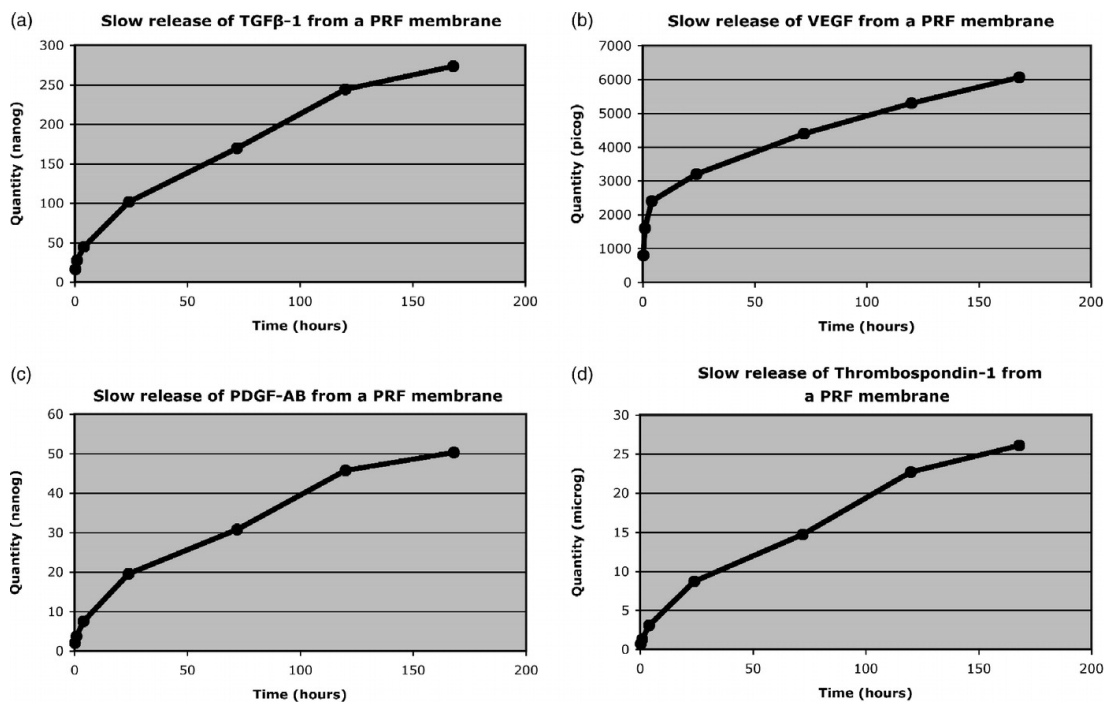


Abbildung 22: Langsame Freisetzung von TGFbeta-1 (a), VEGF (b), PDGF-AB (c) und TSP-1 (d) von der PRF-Matrix während 7 Tagen (27)

Auch Choukroun et al. haben in ihrer Studie von 2018 in einer anderen Versuchsordnung VEGF in Proben von PRF durch einen ELISA-Test nachgewiesen. PRF wurde mit drei unterschiedlichen Zentrifugationsprotokollen hergestellt. Protokoll I mit 2400rpm, Protokoll II mit 1200rpm und Protokoll III mit nur 600rpm. Anschließend wurde das flüssige PRF in DMEM gegeben und durch eine Inkubation bei 37°C eine Gerinnung ausgelöst. Proben wurden nach

1 und 24h entnommen. VEGF war in allen Proben nachweisbar. Nach 24h jedoch deutlich höher als nach 1h. Zusätzlich waren die Ergebnisse in den Proben der langsamen Zentrifugation (Protokoll III) deutlich größer, als in den Proben mit der hohen Zentrifugationskraft (10).

Wie weiter oben beschrieben, haben Kobayashi et al. auch einen ELISA-Test mit unterschiedlichen Thrombozytenkonzentraten durchgeführt, um VEGF nachzuweisen. Auch hier konnte evaluiert werden, dass in den PRF-Proben die Abgabe von VEGF im Vergleich zu PRP und PPP am höchsten war (22).

Um noch besser nachvollziehen zu können, warum PRF die besten Ergebnisse hinsichtlich Angiogenese liefert, ist es sinnvoll die Thrombozytenkonzentrate auf zellulärer Ebene zu betrachten. In unserer Versuchsreihe haben wir drei verschiedene Konzentrate, die unterschiedliche Zentrifugationsprozesse durchlaufen und denen somit unterschiedlich viele Zellen bzw. Blutbestandteile entzogen wurden, untersucht. Wie bereits ausgeführt, durchläuft PRF nur einen Zentrifugationsprozess. Um PRP zu gewinnen, müssen 2 Prozesse durchgeführt werden und PFP benötigt sogar 3. So werden bei jeder Zentrifugation mehr Blutbestandteile separiert.

Durch die Zellauszählung der einzelnen Konzentrate, konnte gezeigt werden, dass PRF und PRP die größte Menge an Thrombozyten enthalten und PFP die geringste (siehe Abbildung 28). Leukozyten konnten in deutlich höherer Zahl im PRF nachgewiesen werden als in PRP. In PFP fanden sich keine Leukozyten (siehe Abbildung 29).

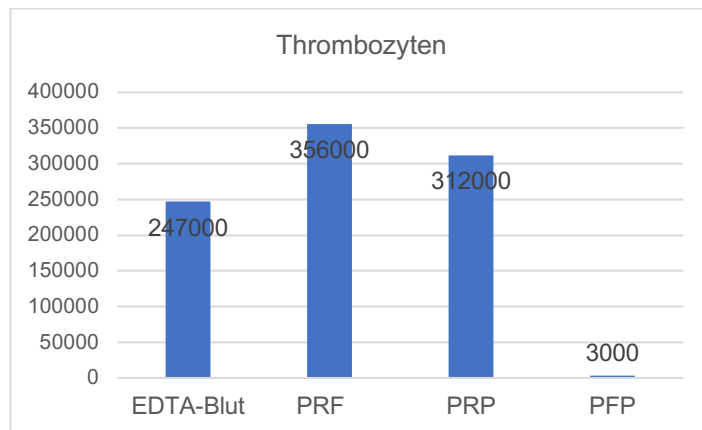


Abbildung 23: Thrombozytenanzahl im Vergleich

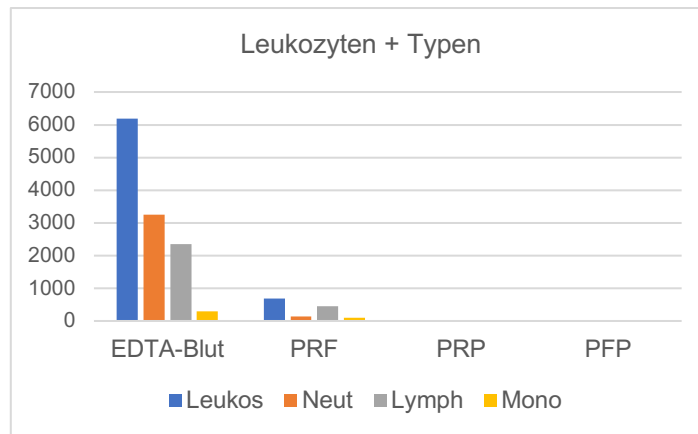


Abbildung 24: Leukozyten und dessen Typen im Vergleich

Sowohl Thrombozyten als auch Leukozyten enthalten bzw. sezernieren den Wachstumsfaktor VEGF (20). Dohan et al. kommen zu dem Schluss, dass Leukozyten nicht nur VEGF sezernieren, sondern, dass zusätzliches VEGF in aktivierten Leukozyten produziert werden kann (27).

Somit ist zu erklären, warum Thrombozytenkonzentrate, die einen hohen Anteil an Thrombozyten und Leukozyten enthalten, so wie PRF, die besten Ergebnisse hinsichtlich Angiogenese liefern.

Dohan et al. konnten in ihrer Studie, in der sie den PRF-Clot im Rasterelektronenmikroskop untersuchten, einen hohen Gehalt an Thrombozyten und Leukozyten nachweisen. PRF wurde nach dem Protokoll von Choukroun, also mit einer Zentrifugation bei 3000RPM für 10min, hergestellt. Danach wurde PRF im Lichtmikroskop und im Rasterelektronenmikroskop analysiert. Sie beschrieben, dass sich bis zu 97% der Thrombozyten und bis zu 50% der Leukozyten im PRF-Clot befinden. Gleichzeitig wies der Clot eine spezifische dreidimensionale Struktur auf. Sie wiesen einen hohen Gehalt an Thrombozyten und Fibrin in den ersten Millimetern oberhalb der Erythrozytenschicht (Buffy Coat) nach (12).

Auch David et al. fassen in ihrem Review die positiven Eigenschaften von Leukozyten- und Thrombozyten-reichen Konzentraten zusammen. Sie erwähnen eine Studie, in der L-PRP und P-PRP hinsichtlich einiger Wachstumsfaktoren verglichen wurden. Hier zeigte L-PRP höhere Mittelwerte als P-PRP (21).

Unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage bezüglich der Thrombozytenkonzentrate der ersten und zweiten Generationen sowie gestützt durch die durchgeführte Versuchsreihe in dieser Studie ergibt sich, dass die Thrombozytenkonzentrate der ersten Generation weniger Verwendung im klinischen Alltag finden. Die Herstellungsschritte im Vergleich zu PRF sind komplexer und zeitaufwendiger. Zudem sind zusätzliche Stoffe erforderlich, um die Thrombozytenaggregation zu aktivieren. Die Herstellung von PRF dagegen ist einfach, relativ kostengünstig, schnell, minimalinvasiv und kann ohne Zugabe externer Stoffe, zu 100%

autolog, direkt verwendet werden. Die klinischen Anwendungsmöglichkeiten von PRF nehmen stetig zu, und es häufen sich positive und aussagekräftige Studienergebnisse. In der Vergangenheit gab es Kritik hinsichtlich der uneinheitlichen Klassifizierung der verschiedenen Herstellungsprotokolle. Jedoch wurde inzwischen durch zahlreiche Versuche und Studienserien ein relativ strenges und vielfältiges Protokoll entwickelt (5, 9, 10).

Dennoch erfordert es eine kritische Betrachtung von PRF. In dieser Versuchsreihe wurde darauf geachtet, dass ausschließlich das Blut einer einzelnen Probandin für jeden Versuch verwendet wurde. Dies ermöglichte eine Konstanz in der Beschaffenheit des jeweiligen Thrombozytenkonzentrates. Es ist jedoch unerlässlich, in Patientenstudien das Blut des jeweiligen Patienten zu verwenden. Jeder Patient und jede Patientin weist jedoch ein individuelles Blutbild auf. Daher kann es bei der Herstellung der PRF-Membran zu unterschiedlichen Konzentrationen der Blutbestandteile, insbesondere von Thrombozyten und Leukozyten, kommen.

Darüber hinaus steht bislang keine automatisierte Herstellungsmethode für PRF zur Verfügung. Die Abtrennung der Erythrozytenschicht erfolgt visuell, was gegebenenfalls zu einem Verlust des wertvollen Thrombozyten- und Leukozytenreichen *Buffy-Coats* führen kann. Zudem sind, wie bereits erwähnt, je weiter man sich von dieser Schicht entfernt, nur noch vereinzelt Thrombozyten und Leukozyten vorhanden (12). Dennoch werden auch diese Anteile der Membranen für Experimente und Studien verwendet. Oftmals werden die Membranen in kleinere Stücke geschnitten, wie auch in dieser Versuchsreihe. Wenn in bestimmten Abschnitten der Membran weniger Thrombozyten und Leukozyten vorhanden sind (12), ist anzunehmen, dass dort auch weniger Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Dies bedeutet, dass die Ergebnisse bezüglich der Freisetzung der Wachstumsfaktoren trotz Verwendung derselben Membran unterschiedlich ausfallen können.

Nicht alle vorliegenden Studien liefern überzeugende klinische Ergebnisse bezüglich PRF. Yoon et al. wollten bei kranialen Defekten in Kaninchen Angiogenese und Osteogenese mit xenogenem Knochen in Kombination mit PRF nachweisen. Zwar zeigten sich höhere Werte für VEGF in der PRF-Gruppe, aber im Vergleich zu der Kontrollgruppe waren diese nicht statistisch signifikant höher. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass PRF die Markzellen des Knochens vermehren könnte, jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Knochenregeneration hat (41).

In einem Review zum Thema Socket Preservation (Erhalt des Zahnfachs) gelangten die Autoren ebenfalls zu dem Schluss, dass PRF die Wirkung auf die Regeneration des Weichgewebes fördert und postoperative Beschwerden reduziert. Hinsichtlich der Knochenregeneration, insbesondere in der späten Phase der Heilung im Zahnfach, konnten keine eindeutigen wissenschaftlichen Belege erbracht werden (42).

Auch in Bezug auf die Parodontologie existieren Studien, die keine eindeutigen Beweise dafür liefern können, dass PRF stets zu konsistent guten Ergebnissen führt. In einer Untersuchung wurden parodontale Knochendefekte entweder mit PRF allein oder mit autologem Knochenersatz behandelt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der PRF-Gruppe und der Gruppe mit autologem Knochenersatz festgestellt werden. Beide Behandlungsgruppen zeigten vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Taschentiefen, des klinischen Attachmentverlustes und der radiologischen Messungen (43).

## 9 Zusammenfassung

### Ziel der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, das angiogenetische Potenzial zweier autologer Thrombozytenkonzentrate (PRF und PRP) mit *platelet-free plasma* (PFP) zu vergleichen, um den potenziellen Zusammenhang zwischen Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration und dem Ausmaß der Angiogenese zu demonstrieren.

### Material und Methoden

In einer klinischen Studie wurde in einem in-Vitro-Versuch anhand eines Eikamm-Modells die Angiogenese der verschiedenen Konzentrate beobachtet. Dies wurde durch Auszählen der Kapillaren und Verzweigungspunkte mithilfe eines Rastermikroskops durchgeführt. Außerdem wurde anhand eines ELISA-Tests die Abgabe des Wachstumsfaktors VEGF von einer PRF-, PRP- und PFP-Membran gemessen. Zusätzlich wurde die Konzentration von Leukozyten und Thrombozyten des jeweiligen Konzentrates mithilfe eines Durchfluss-Zytometers bestimmt.

### Ergebnisse

Die Mittelwerte der Anzahl der Kapillaren und Verzweigungspunkte lagen für PRF bei  $47,03 \pm 11$  und  $45,74 \pm 12,8$ , für PRP bei  $30,89 \pm 4,4$  und  $28 \pm 5,2$ , für PFP bei  $22,43 \pm 4$  und  $20,54 \pm 4,5$  und für die Kollagenmembran bei  $10,37 \pm 3,6$  und  $14,11 \pm 6,5$ .

Die Mittelwerte des ELISA-Tests lagen nach 24h für PRF bei 936,896 pg/ml und für PRP bei 547,552 pg/ml. Nach 48h für PRF bei 413,273 pg/ml und für PRP bei 799,645 pg/ml. Nach 72h lagen der Mittelwert für PRF bei 649,258 pg/ml und für PRP bei 453,538 pg/ml. Die Werte für PFP waren nicht zu bestimmen.

Die Thrombozytenzahlen (pro  $\mu\text{l}$  Blut) gemessen mithilfe der Durchflusszytometrie lagen für PRF bei 356.000, für PRP bei 321.000 und für PFP bei 3000. Die Leukozytenanzahl war bei PRF am höchsten (680) und PRP (10) und PFP (0) wiesen kaum bis keine Leukozyten auf.

### Conclusio

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PRF überlegene Resultate gegenüber PRP und PFP hinsichtlich der Angiogenese aufweist. Zusätzlich stellt PRF im Vergleich zu PRP eine einfache und kostengünstige Technik dar und bietet einen benutzerfreundlichen Präparationsprozess für den klinischen Alltag.



## 10 Literaturverzeichnis

1. Soydan SS, Uckan S. Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a platelet-rich fibrin membrane: technical report. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;72(2):322-6.
2. Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo A, Scacco S, Inchingolo A, et al. Trial with Platelet-Rich Fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010;14(12):1075-84.
3. Greven B. Autologe Weichgewebstransplantate. *Der Freie Zahnarzt*. 2016;60(9):76-86.
4. M Dohan Ehrenfest D, 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.
5. Ghanaati S, Al-Maawi S. Autologes „platelet-rich fibrin“ zur Unterstützung von Hart- und Weichgewebsheilung. *wissen kompakt*. 2020;14(2):77-87.
6. 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 Eng Part B Rev*. 2017;23(1):83-99.
7. Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V, et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(5):7922.
8. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e56-60.
9. Al-Maawi S, Ghanaati S, Sie W. Regeneratives Potenzial von Blutkonzentraten. 2021.
10. 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*. 2018;44(1):87-95.
11. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e45-50.
12. 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. *J Periodontol*. 2010;81(4):546-55.
13. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(1):67-82.
14. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e37-44.
15. 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 Biotechnol*. 2009;27(3):158-67.

16. Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *The Yale journal of biology and medicine*. 2010;83(1):1.
17. 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*. 1997;55(11):1294-9.
18. Ferneini EM, Beauvais D, Castiglione C, Ferneini MV. Platelet-Rich Plasma in Androgenic Alopecia: Indications, Technique, and Potential Benefits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017;75(4):788-95.
19. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *International journal of Oral and maxillofacial Implants*. 1999;14(4):529-35.
20. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, et al. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(6):927-30.
21. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria. *Journal of Oral Implantology*. 2014;40(4):511-21.
22. Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *International journal of implant dentistry*. 2015;1(1):31.
23. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*: Springer ; 2010.
24. Horn F. *Biochemie des Menschen*: Thieme; 2009.
25. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme; 2006.
26. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circulation Journal*. 2010:1003020631-.
27. 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*. 2009;27(1):63-9.
28. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*. 2016;141:70-7.
29. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, et al. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci*. 2012;9(10):872-80.
30. Chang Y-C, Wu K-C, Zhao J-H. Clinical application of platelet-rich fibrin as the sole grafting material in periodontal intrabony defects. *Journal of Dental Sciences*. 2011;6(3):181-8.
31. Anuroopa P, Padmavathi Patil VKR. Role and efficacy of L-PRFmatrix in the regeneration of periodontal defect: a new perspective. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2014;8(12):ZD03.
32. Joseph VR, Sam G, Amol NV. Clinical evaluation of autologous platelet rich fibrin in horizontal alveolar bony defects. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(11):ZC43-7.

- 
33. Asaka T, Ohga N, Yamazaki Y, Sato J, Satoh C, Kitagawa Y. Platelet-rich fibrin may reduce the risk of delayed recovery in tooth-extracted patients undergoing oral bisphosphonate therapy: a trial study. *Clinical oral investigations*. 2017;21(7):2165-72.
  34. Tsai LL, Huang YF, Chang YC. Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with platelet-rich fibrin. *J Formos Med Assoc*. 2016;115(7):585-6.
  35. Eshghpour M, Dastmalchi P, Nekooei AH, Nejat A. Effect of platelet-rich fibrin on frequency of alveolar osteitis following mandibular third molar surgery: a double-blinded randomized clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(8):1463-7.
  36. Barone A, Ricci M, Romanos GE, Tonelli P, Alfonsi F, Covani U. Buccal bone deficiency in fresh extraction sockets: a prospective single cohort study. *Clinical oral implants research*. 2015;26(7):823-30.
  37. Oncu E, Alaaddinoglu EE. The effect of platelet-rich fibrin on implant stability. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(3):578-82.
  38. Zumstein MA, Rumian A, Lesbats V, Schaer M, Boileau P. Increased vascularization during early healing after biologic augmentation in repair of chronic rotator cuff tears using autologous leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF): a prospective randomized controlled pilot trial. *Journal of shoulder and elbow surgery*. 2014;23(1):3-12.
  39. Barthels M. Gerinnungsdiagnostik. *Hämostaseologie*. 2008;28(05):320-34.
  40. Renz H, Gierten B. Durchflusszytometrie. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019:735-.
  41. Yoon J-S, Lee S-H, Yoon H-J. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2014;42(7):1071-7.
  42. Moraschini V, Barboza ES. Effect of autologous platelet concentrates for alveolar socket preservation: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(5):632-41.
  43. Mathur A, Bains VK, Gupta V, Jhingran R, Singh GP. Evaluation of intrabony defects treated with platelet-rich fibrin or autogenous bone graft: A comparative analysis. *Eur J Dent*. 2015;9(1):100-8.