

Diplomarbeit

**Einsatzgebiete und Herstellung von
plättchenreichem Fibrin in der Oralen Chirurgie**

eingereicht von

Katharina Zwitnig

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der Zahnheilkunde

(Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit, Graz

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Dr.med.dent.et scient.med. Michael

Payer

und

Univ.-Ass. Dr.med. Dr.med.dent. Tomislav Ante Zrnc

Graz, 29.06.2020

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 29.6.2020

Katharina Zwitter eh

Danksagungen

Danke Papa, für die wertvollen Ideen und deine ständige Bereitschaft, mich mit allen erdenklichen Möglichkeiten zu unterstützen und zu fördern.

Danke Mama, dass du immer an mich glaubst.

Danke Lisa für jegliche Hilfe, wenn ich abends verzweifelt am Computer saß.

Danke Dino, dass du mir ein das beste Beispiel für Hartnäckigkeit und Entschlossenheit bist.

Danke Oma, dass du Aufgeben nicht zulässt.

Danke Thomi, dass du mir immer wieder weitergeholfen hast und mir gezeigt hast, wie wichtig Geduld und Durchhaltevermögen hier sind.

Danke an Dani und Marie, für die vielen positiven Inputs und Motivationsreden.

Danke Lisa, Lena, Anke und Nina, für die kameradschaftlichen Besprechungen und das gegenseitige Aufbauen.

Danke Hanna, für die unerhört solide Korrektur meiner Beistrichfehler. Bergauf haben wir uns zum Glück noch nie verlaufen.

Danke an alle Mitarbeiter der Ausbildung 5, dafür, dass ihr nicht vergessen habt, wie es ist, wenn man anfängt. Allen voran OA Dornhofer. Sie haben mir viel beigebracht und waren immer da.

Danke an meine beiden Betreuer. An Prof. Payer für die drucklose Unterstützung, die vielen Korrekturen und das gute Zureden. Danke an DDr. Zrnc, dass die Distanz keinen Unterschied gemacht hat und Du immer erreichbar warst.

Danke an Prof. Schlenke und Prof. Jakse für die Unterstützung meines Projektes. Besonderer Dank gilt Angelika Spari. Du hast mir sehr geholfen und das werde ich dir nicht vergessen.

Danke an DI Irene Mischak. Sie sind mir stets eine große Hilfe gewesen.

Danke auch an Prof. Ghanaati und sein Team, besonders Anja.

Bildmaterial teilweise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitter P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon.

Die Stunden, die ihr alle gesessen seid, ob ihr mir gut zugeredet habt, mich kritisiert habt, mir Material zukommen ließt, mir einen Schubs in die richtige Richtung gegeben habt oder mich auf Irrwege aufmerksam gemacht habt. All das hat zu dieser Arbeit maßgeblich beigetragen und war unverzichtbar.

Danke!

Zusammenfassung

Einführung: Das Einbringen von plättchenreichem Fibrin (PRF), gewonnen aus zusatzstofffreien Eigenblut ist eine vielseitig erprobte Methode. Bei dieser risikoarmen, kostengünstigen und einfach herstellbaren Anwendung wird von einem Heilungs-Booster mit deutlicher Schmerzreduktion im Zuge chirurgischer Eingriffe gesprochen. Die fehlende Systematik dazu erlaubt jedoch auf wissenschaftlicher Ebene nur schwer einen Überblick über diese Thematik. In welchen Bereichen ist es konkret sinnvoll einsetzbar? Wie kann eine Herstellung möglicherweise ideal gestaltet werden? Welche Qualitätsmerkmale kann man als Anhaltspunkte heranziehen?

Material und Methoden: Im Zuge einer systematischen Literatursuche wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen relativer Zentrifugalkraft (RCF) und Wachstumsfaktorengehalt nachzuweisen. In Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Transfusionsmedizin und Blutgruppenserologie wurde ein Studienprotokoll erprobt und der Grundstein für eine mögliche erweiterte Untersuchung gelegt. Ein positives Ethikvotum wurde erarbeitet. Die Erprobung des Studienprotokolls hatte ebenso den Zweck, die Umsetzung für den klinischen Alltag zu testen.

Resultate: Die Durchführung des Herstellungsprotokolls (1) mit der vorhandenen Zentrifuge hat vergleichbare Ergebnisse gebracht. Die Literaturanalyse hat Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen RCF und Wachstumsfaktorengehalt in den einzelnen Arbeiten bestätigt, jedoch konnte statistisch keine Korrelation über die Gesamtheit der recherchierten Daten errechnet werden. Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig.

Diskussion: Ursächlich für das Ergebnis der Literaturanalyse wird ein Mangel an standardisierten Protokollen und somit vergleichbaren Daten angenommen. Es besteht Bedarf an weiteren Daten von standardisierten Protokollen. Die klinische Anwendung wirkt der Literatur nach vielversprechend, einfach herzustellen und vielseitig.

Abstract

Introduction: *Application of platelet-rich fibrin (PRF) in oral surgery is known as a proved method for many indications since many years. There are certain advantages of the so-called “healingbooster”, like economical treatment, pain-reduction, easy to create and a lack of risks. It is difficult to overview the topic as there is no special systematology. Where can it be actually used? Maybe there is an ideal method to create PRF. What are possible quality characteristics?*

Material and methods: *Within a systematic analysis, I tried to find a relation between relative centrifugal force and growth factors. In cooperation with the university clinic of transfusion medicine and haemotherapy, a protocol by Choukroun J. and Ghanaati, S. has been tested and the base further studies has been initiated. Ethical approval was been granted from the ethics committee of the medical university Graz. The aim of testing this protocol, was also to prove the feasibility in daily clinical practice.*

Results: *The mentioned protocol for PRF production was reproduceable regarding the amount of measured growth factors. The literature analysis confirmed higher levels of growth factor concentrations for samples treated with lower RCF in numerous articles. However, correlation analysis for all analysed articles did not reach statistical significance. Application spectrum for the use of PRF in oral surgery is manifold.*

Discussion: *In summery PRF is a very innovative, promising, and easy to produce method in oral surgery. The lack of a standardized production protocol results in difficulties when comparing growth factor data. Further studies ideally with a standardised protocol are needed to find the centrifugation setting developing the highest amount of growth factors.*

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung.....	iii
<i>Abstract</i>	iv
Inhaltsverzeichnis.....	v
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	xi
1 Einleitung	1
1.1 Vorläufer des PRF	3
1.1.1 Fibrinkleber.....	3
1.1.2 <i>Platelet-rich Plasma</i>	3
1.1.3 <i>Platelet-rich in growth factors</i>	4
1.1.4 <i>Platelet-rich fibrin</i>	4
1.2 PRF Allgemein:	4
1.2.1 Bestandteile des PRF:.....	6
1.2.2 Grundschrirte zur Herstellung von PRF	13
1.2.3 Material zur Herstellung.....	13
1.2.4 Analyseverfahren von PRF	16
1.3 Formen des PRF	17
1.3.1 Feste Form	17
1.3.2 Flüssige Form	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Theoretischer Teil.....	20
2.1.1 Einschlusskriterien.....	20

2.1.2	Ausschlusskriterien.....	20
2.2	Praktischer Teil	21
2.2.1	Blutabnahme.....	21
2.2.2	Zentrifugation.....	21
2.2.3	Vorbereitung zur Inkubation.....	22
2.2.4	Inkubation und Vorbereitung der ELISA Untersuchung	22
2.2.5	ELISA Untersuchung	23
3	Ergebnisse – Resultate	24
3.1	Theoretischer Teil.....	24
3.1.1	Anwendungsgebiete	24
3.1.2	Auswertung der Literaturanalyse	30
3.2	Praktischer Teil	37
3.2.1	Flüssige Matrix.....	38
3.2.2	Feste Matrix.....	41
4	Diskussion	44
5	Literaturverzeichnis	47
	Anhang -Projektplan.....	55
2	Ziel	59
3	PatientInnen	60
4	Zielgrößen (Endpunkte).....	60
4.1	Hauptzielgrößen.....	60
4.2	Nebenzielparameter.....	61
5	Methodik.....	61
6	Statistik.....	61
6.1	Geplante Auswertung	61
6.2	Fallzahlplanung.....	62

7	Datenschutz	63
8	Nutzen-Risiko Evaluierung	63
9	Referenzen.....	64

Glossar und Abkürzungen

- PRP: *platelet-rich plasma*
- CGF: *concentrated growth factors*
- PRGF: *plasma-rich in growth factors*
- PRF: *platelet-rich fibrin*
- A-PRF: *advanced-platelet-rich fibrin*
- I-PRF: *injectable-platelet-rich fibrin*
- GTR: *guided tissue regeneration*
- PDGF: *platelet derived growth-factor*
- EGF: *epidermal growth factor*
- VEGF: *vascular-endothelial growth factor*
- MMP-9: *Metallomatrixproteinase-9*
- TGF- β : *transforming growth factor β*
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Feste PRF Matrix direkt nach der Zentrifugation, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon	5
Abbildung 5 PRF Röhrchen; Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon	15
Abbildung 6 Festes PRF, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon	18
Abbildung 7 Flüssiges PRF, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon	19
Abbildung 8 Bedecken des Augmentates mit einer PRF Membran, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon	28
Abbildung 9 Mischen von Knochenersatzmaterial und PRF, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon	28
Abbildung 10 Flussdiagramm zum Screening relevanter Arbeiten	33
Abbildung 11 EGF pg/ml Mittelwerte für I-PRF	38
Abbildung 12 VEGF pg/ml Mittelwerte für I-PRF	38
Abbildung 13 TGF- β 1 pg/ml Mittelwerte für I-PRF	39
Abbildung 14 PDGF-BB pg/ml Mittelwerte für I-PRF	39
Abbildung 15 MMP-9 ng/ml Mittelwerte für I-PRF	40
Abbildung 16 EGF pg/ml Mittelwerte für festes PRF	41
Abbildung 17 VEGF pg/ml Mittelwerte für festes PRF	41
Abbildung 18 TGF- β 1 pg/ml Mittelwerte für festes PRF	42

Abbildung 19 PDGF pg/ml Mittelwerte für festes PRF..... 42
Abbildung 20 MMP-9 ng/ml Mittelwerte für festes PRF 43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Gerinnungsfaktoren entworfen nach Stefan Silbernagl Taschenatlas Physiologie. Stuttgart; 2018 (35)	12
---	----

1 Einleitung

Die Zahnheilkunde nimmt in Österreich eine besondere Stellung ein. Dies spiegelt sich auch in der Gesundheitsstatistik 2014 der Statistik Austria wider. Diese machen ZahnärztInnen mit über 4,22 Millionen PatientInnen in Ordinationen und Ambulanzen zum zweithäufigst besuchten Arzt, Ärztin. ZahnärztInnen werden somit nur von AllgemeinmedizinerInnen übertroffen. Daher ist es auch nicht überraschend, dass die Ausgaben für Zahnbehandlungen und Zahnersatz mit 921 Millionen Euro höher als die Kosten für medizinische Rehabilitation, Heilbehelfe und Programme zur Früherkennung und Gesundheitsförderung sind. Nur durch Kosten für Anstaltspflege, Heilmittel und gesundheitsdienstliche Leistungen werden die zahnmedizinischen Ausgaben übertroffen. (2)

Das Interesse an einfach herzustellenden, autologen und kostengünstigen Biomaterialien hat stark zugenommen. Das sogenannte plättchenreiche Fibrin (*platelet-rich fibrin* kurz PRF) stellt einen Überbegriff für verschiedenste plättchenreiche Zentrifugate dar. Es hat in den vergangenen Jahren die Aufmerksamkeit vieler ÄrztInnen und Forscher auf sich gelenkt. Die Anzahl an Publikationen und Anwendungsmöglichkeiten von PRF haben besonders in der Zahnheilkunde stark zugenommen (z.B.: Choukroun et al.).

Die Möglichkeit der Herstellung am Zahnarztstuhl (*chairside*) ist einfach. Die positiven Eigenschaften auf die Wundheilung, die PRF zugeschrieben werden, lassen es zur Anwendung für vielfältigste zahnmedizinische Indikationen geeignet erscheinen. (3) Das körpereigene und zusatzstofffreie Produkt erwies sich bislang als risikoarm und nebenwirkungsfrei für die PatientInnen. Neben dem positiven Einfluss auf Weichgewebe- und Knochenregeneration, soll das thrombozytenreiche Fibrin auch das Risiko postoperativer Infektionen minimieren. (3) Dies ist eventuell auf die hohe Leukozytenkonzentration in PRF zurückzuführen. Weiters stimuliert es die Angiogenese im Operationsgebiet (4).

Eine Empfehlung für ein gängiges standardisiertes praktikables Protokoll zur Herstellung von PRF existiert bislang jedoch noch nicht. Weiters mangelt es an genauen Untersuchungen über altersabhängige und interindividuelle Patientenunterschiede. Diese könnten einen Einfluss auf die Bestandteile von PRF ausüben.

Verschiedene Forschungsgruppen liefern unterschiedliche Zentrifugationsprotokolle. Es wird mit unterschiedlichen Zentrifugen gearbeitet und verschiedene Bezeichnungen werden angegeben. Das lässt bislang keine übersichtliche Systematik zu.

Diese Arbeit soll daher folgende Themen beantworten:

Welche Anwendungsgebiete für PRF gibt es in der Zahnheilkunde?

Nach welchen Kriterien wird PRF hergestellt?

Ist es überhaupt möglich, „das ideale“ Protokoll zu definieren?

Zunächst wollen wir uns aber mit der Frage „was ist PRF genau und woraus besteht es“ beschäftigen.

1.1 Vorläufer des PRF

1.1.1 Fibrinkleber

In den 70er Jahren begann die Entwicklung von *Platelet-derived biomaterials*. Es wurde zunächst Fibrinkleber entwickelt. Ihm wurde eine positive Wirkung auf den Heilungsprozess zugeschrieben.

1.1.2 *Platelet-rich Plasma*

In weiterer Folge entstand *Platelet-rich Plasma* (PRP). Es gilt in gewisser Weise als Vorläufer des *Platelet-rich fibrin* (PRF). Man sprach PRP einen positiven Effekt auf die Knochenheilung zu (5). Erst war PRP flüssig - um zu erreichen, dass die Wachstumsfaktoren länger erhalten blieben, wurde eine gel-Form hergestellt. Dies wurde erreicht indem bovines Thrombin hinzugefügt wurde. (6–8)

Vorteile des autologen PRP:

- 1) PRP unterstützt den natürlichen Heilungsprozess und greift so in die physiologischen Prozesse ein. (9)
- 2) Die Kosten sind im Vergleich zu einer künstlich hergestellten Wachstumsfaktoren-Mischung deutlich geringer. Weiters ist nicht sichergestellt, dass künstlich hergestellte Wachstumsfaktoren denselben Effekt wie jene aus PRP auf das Gewebe haben. (10)
- 3) Es sind keine Geräte zur Herstellung der artifiziellen Wachstumsfaktoren nötig. (11)
- 4) Das Infektionsrisiko ist sehr gering. Weiters ist die Gefahr einer Allergie bei allogenen PRP höher als bei autogenem PRP. (12)

Nachteile des autologen PRP:

- 1) Starke Variabilität des Produktes, da es sehr techniksensitiv ist.
- 2) Dauer der Herstellung.

- 3) Verwendung von bovinem Thrombin könnte Infektionen hervorrufen.
(7,8) Es gibt bereits die Möglichkeit stattdessen autologes Thrombin zu verwenden.

1.1.3 Platelet-rich in growth factors

PRGF (*Plasma rich in growth factors*) wurde als Weiterentwicklung des PRP erfunden. Es wird einmal zentrifugiert, wobei Natriumcitrat als Antikoagulantium und Calciumchlorid als Plättchenaktivator verwendet werden. PRGF hat nur einen moderaten Plättchen Gehalt und enthält keine weißen Blutkörperchen. Pro-inflammatorische Prozesse werden vermieden. Dafür verantwortliche Proteasen und saure Hydrolasen sind schließlich Bestandteile der weißen Blutkörperchen.
(13)

1.1.4 Platelet-rich fibrin

Nun hat sich das PRF (*Platelet-rich fibrin*) entwickelt. Es wird nur einmal zentrifugiert, ist frei von Antikoagulantien und wird nicht fraktioniert. Die Herstellung wird als einfach und schnell dargestellt. (11) Joseph Choukroun publizierte diese neue Art von *platelet-derived biomaterial*. Er stellte ein Blutprodukt frei von Xenofaktoren her und nennt es auch *second generation PRP*.
(14)

1.2 PRF Allgemein:

Plättchenreiches Fibrin entsteht, wenn man venöses Blut in einem Vakuumröhrchen abnimmt und innerhalb kürzester Zeit (weniger als eine Minute) zentrifugiert. Es werden keine Zusatzstoffe beigemischt. Es gibt flüssiges und festes PRF. (15,16) Je nach Einstellung der Zentrifuge werden bei der festen Form grob 3 Fraktionen sichtbar: Am Boden des Röhrchens sammeln sich Erythrozyten, mittig sieht man ein gallertiges gelblich/beiges Gebilde, das PRF und darüber sammelt sich azelluläres Plasma.(14) Da die meisten Zellen am

Erythrozyten nahen Kopf des PRFs ruhen, wird empfohlen die roten Blutkörperchen stumpf von der Restsubstanz abzutrennen. Nun kann PRF zum Beispiel als Membran oder nach Zahnentfernung eventuell auch zum Auffüllen der Extraktionsalveole als eine mögliche Maßnahme zum Gewebeerhalt verwendet werden. (17,18) Weiters kann es auch mit Biomaterialien wie Knochenersatzmaterialien (xenogen, synthetisch sowie allogene (18)) vermischt werden. (3) Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielseitig.



Abbildung 1 Feste PRF Matrix direkt nach der Zentrifugation, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitter P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon

1.2.1 Bestandteile des PRF:

Prinzipiell besteht PRF aus drei Bestandteilen: Zellen, Fibrinogen und Wachstumsfaktoren. Neben den Wachstumsfaktoren und Thrombozyten sind noch Leukozyten Bestandteil des PRF.(19) Es sammelt sich anfangs ganz oben Fibrinogen. Dieses wird durch den Einfluss des Thrombin dann zu einem dreidimensionalen Fibrinnetzwerk. Oberhalb ist letztendlich azelluläres Plasma und unterhalb sind rote Blutkörperchen. (3) Thrombozyten entstehen aus Megakaryozyten und sind kernlose Zellen. (20) Die Matrix des PRF erlaubt es, dass Wachstumsfaktoren langsam über einen längeren Zeitraum (von etwa zehn Tagen) abgegeben werden. (21) Das Fibrin dient als Reservoir für die Wachstumsfaktoren. Neben den Wachstumsfaktoren und Thrombozyten sind noch andere Blutzellen Bestandteil des PRF. (22) Es enthält B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Monozyten, Stammzellen und neutrophile Granulozyten. In der Literatur spricht man von Kopf und Schwanz des PRF-Pfropfes. Hierbei ist der Kopf jener Teil des PRFs der an die roten Blutkörperchen angrenzt, und der Schwanz stellt das andere ins Plasma reichende Ende dar. (23)

1.2.1.1 Zelluläre Bestandteile:

In einem PRF Zentrifugat sind mehrere Zelltypen zu finden. Folgende Zellen werden bei Zählungen in die Bewertung mit einbezogen:

- Thrombozyten
- Leukozyten gesamt
- T-Lymphozyten
- B-Lymphozyten
- Neutrophile
- Granulozyten
- Monozyten (24)

Thrombozyten sind Zellen ohne Zellkern und haben ihren Ursprung in Zellfragmenten der Megakaryozyten. Sobald sie mit Extrazellulärmatrix (durch Gefäßverletzung) in Verbindung kommen heften sie sich daran und werden

dadurch aktiviert. Die im Zytoplasma der Plättchen lokalisierten Speichergranula enthalten Inhaltsstoffe, welche während der nun stattfindenden Hämostase frei werden. Somit werden beim Thrombozyten Fibrinogen-Rezeptoren aktiviert, was zur Plättchenaggregation führt. Zur gleichen Zeit kommt die Gerinnungskaskade in Gang und die Blutung wird gestoppt. Zur Unterstützung der Wundheilung setzen die Thrombozyten nun auch Wachstumsfaktoren frei. Außerdem befinden sich an der Zelloberfläche von Thrombozyten Immun-Rezeptoren, welche Mediatoren des Immunsystems enthalten. Ihnen wird darum auch eine immunisierende und anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben. Die Anzahl an Plättchen ist beim gesunden Patienten ca. 250 000/μL und sind zentrale Faktoren bei Gefäßverletzungen und in weiterer Folge bei der Wundheilung. (25,26)

Der Begriff **Leukozyten** umfasst mehrere Zellarten, welche dem Abwehrsystem angehören. Man spricht hier sowohl von den Granulozyten (neutrophil, basophil und eosinophil), als auch von Monozyten und Lymphozyten (Natürliche Killerzelle, B-Lymphozyt und T-Lymphozyt). Namensgebend für alle Granulozyten sind ihre Granula im Zytoplasma. Je nach Farbe der Granula mit Pappenheim- Färbung unterteilt man eosinophil, basophil und neutrophil. Ist der Kern segmentiert (oder auch „polymorphkernig“), deutet es auf eine abgeschlossene Reife hin. Charakteristisch für Lymphozyten ist ein runder Kern. Für Monozyten spricht die Nierenform des Nucleus. (26)

Lymphozyten befinden sich an sich in den lymphatischen Organen und wandern bei Bedarf in die Blutbahn aus und zum Beispiel an einem lokalen Entzündungsprozess zu arbeiten. Wichtig ist der Begriff der Selbsttoleranz. Rezeptoren der Lymphozyten müssen fremde Antigene erkennen können, ohne dabei körpereigene anzuziehen.

Die **T-Lymphozyten** kann man in T-Helferzellen (CD-4) und zytotoxische T-Zellen (CD-8) unterteilen. Verifiziert werden sie durch die unterschiedlichen CD-Moleküle (*Cluster of Differentiation*) an der Oberfläche der Plasmamembran. T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark und reifen im Thymus. Sie sind im

Stande von anderen Zellen präsentierte Antigene bzw. Plasmaproteine (*Major histocompatibility complex* [MHC]-Moleküle) zu erkennen.

B-Lymphozyten entstehen im Knochenmark und reifen in speziellen Teilen des Knochenmarks. Im Zuge einer Stimulierung durch ein Antigen, wird der B-Lymphozyt folglich zur Plasmazelle. Sie dient zur Herstellung von Immunglobulinen der humoralen Immunantwort.(26)

Neutrophile Granulozyten zählen wie oben erwähnt zur Gruppe der Leukozyten. Sie sind in der Pappenheimfärbung als blass rosa erkennbar. Ihre Funktion finden sie in der Abtötung von pathogenen Keimen wieder. Das geschieht durch Phagozytose oder indem sie Inhaltsstoffe ihrer Granula nach außen freisetzen. Ihre Aktivierung funktioniert durch Bakterienteile oder alarmierende Botenstoffe anderer Zellen. Sie wandern besonders schnell aus der Blutbahn in die Peripherie um ihren Beitrag an Entzündungsvorgängen auszuführen. Der Ausdruck Eiter beschreibt eine größere Anzahl abgestorbener neutrophiler Granulozyten. (26,27)

Monozyten sind kurzlebig (ca 24h) und werden nach Auswanderung aus der Blutbahn zu Makrophagen, welche teilungsfähig sind und außerdem über eine Lebensdauer über mehreren Wochen hinweg verfügen. Ihre Aufgabe besteht darin zu phagozytieren. Sie sind Teil des mononukleären Phagozytensystems. Von leblosen Zellbestandteilen und Keimen aktiviert, können sie auch Botenstoffe freisetzen und somit auf ein pathologisches Geschehen aufmerksam machen. Nun wird klar, dass Monozyten und in weiterer Folge Makrophagen für die Wundheilung und Immunabwehr ungemein wichtig sind. (26)

1.2.1.2 Wachstumsfaktoren

Folgende Wachstumsfaktoren werden in der Literatur besonders hervorgehoben und zeigen wichtige Funktionen für die Wundheilung:

- *Platelet derived growth-factor* (PDGF)
- *Epidermal growth factor* (EGF)
- *Vascular-endothelial growth factor* (VEGF)

- Metallomatrixproteinase-9 (MMP-9)
- *Transforming growth factor β* (TGF- β) (28).

1.2.1.2.1 *Platelet-derived growth factor*

Platelet-derived growth factor regt die Mitose von weißen Blutzellen an. Dieser Wachstumsfaktor sorgt für vermehrte Anhaftung von Perizyten (differenzierte Fibrozyten für Kapillarbildung). Die forcierte Anhaftung der Perizyten wirkt sich wiederum positiv auf die Gefäßneubildung aus. Granulationsgewebe entsteht dadurch schneller.(29) Auch mesenchymale Stammzellen werden vermehrt zum Ort des Geschehens geleitet. PDGF ist in der Lage die Teilung und Reproduktion zu fördern. (30) Es lassen sich vier Isomere unterteilen: PDGF-AB,-BB, -AA und -CC. Wobei zu erwähnen ist, dass Beta-Rezeptoren von PDGF laut Literatur vermehrt Wirkung auf die Heilung im parodontalen Bereich zeigen. Weiters wird PDGF-BB eine beflügelnde Wirkung auf Osteoblasten im Bereich von parodontalen Knochendefekten zugeschrieben. (31)

1.2.1.2.2 *Epidermal growth factor*

Der *epidermal growth factor* ist bekannt für seine Wirkung auf Epithelzellen. Die teilen sich unter seinem Einfluss vermehrt und die Reifung wird ebenso angeregt. (29) Somit ist einer Heilung des Epithels der Weg bereitet.

1.2.1.2.3 *Vascular endothelial growth factor*

Vascular endothelial growth factor spielt eine große Rolle zu Beginn der Wundheilung. Er führt dazu, dass sich neue Kapillaren bilden. Diese werden gleichsam durch VEGF stabilisiert. Er trägt auch dazu bei, dass Fibroblasten und Endothelzellen proliferieren. Die Zellteilung wird ebenso gefördert. (29,32) Es wird

erwähnt, dass VEGF vermengt mit Knochenersatzmaterial die Bildung von neuem Knochen schürt. (30)

1.2.1.2.4 Metallomatrixproteinase-9

Metallomatrixproteinasen sind ebenso an der Wundheilung beteiligt. Die sind essenziell für den Umbau des Gewebes. (33) MMP-9 ist für den Abbau und Umbau von Elastin und Fibronectin zuständig. (34)

1.2.1.2.5 *Transforming growth factor-β*

TGF-β wirkt auf Entzündungen hemmend. Somit wird gewährleistet, dass die Inflammation kontrolliert abläuft und nicht ausufernd. Der Wachstumsfaktor regt ebenso wie VEGF die Neovaskularisation an.(29,32) Außerdem ist TGF-β bedeutend für die Kollagen 1 Synthese und Herstellung von Fibronectin und treibt die Neubildung mesenchymaler Stammzellen an. (30)

1.2.1.3 Fibrin

Fibrin entsteht aus Fibrinogen im Laufe der Gerinnungskaskade unter dem Einfluss von Thrombin. Um die Entstehung von Fibrin im Körper wirklich zu verstehen, ist die Kenntnis über die Hämostase unerlässlich.

Die Hämostase wird in zwei Schritte geteilt, primäre und sekundäre. Die primäre Hämostase beschreibt die Adhäsion von Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und deren Aggregation. Die sekundäre Hämostase bezieht sich auf die Bildung eines stabilen Fibrinnetzwerkes zur Stabilisierung des Koagels.

Plättchen halten sich für gewöhnlich in der Nähe der Gefäßwand auf, weil die Strömungsgeschwindigkeit in der Mitte des Blutgefäßes am höchsten ist und die Scherkräfte zur Wand hin größer werden. Somit schwimmen große Blutzellen wie

Erythrozyten gern im Zentrum und Thrombozyten eher an der Wand des Gefäßes entlang.

Wird die Endothelwand verletzt, liegen Kollagenfasern und glatte Muskelzellen frei. Die an der Thrombozytenoberfläche angelagerten Kollagenrezeptoren (Glykoprotein Ia/IIa) binden an die freiliegenden Kollagenfasern und führen zur Adhäsion von Plättchen.

Im Endothel werden die bekannten von Willebrand-Faktoren (vW-Faktoren) gebildet. Bei Verletzung des Endothels lagern sich diese an die Kollagenfasern an und Thrombozyten können mit ihren vW-Rezeptoren daran binden. Durch die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand, entleert der Thrombozyt seine Speichergranula und ist aktiviert. Er bildet Pseudopodien (Fortsätze) aus. Es kommt zur Adenosindiphosphat (ADP)-Ausschüttung seitens der Thrombozyten. Da inaktive vorbeischwimmende Thrombozyten einen ADP-Rezeptor besitzen, werden sie durch das ADP selbst auch aktiviert. Weiters entlassen die aktivierten Thrombozyten auch Serotonin (aus Darmzellen aufgenommen und eingelagert in inaktiven Thrombozyten) und Thromboxan. Beides wirkt Thrombozyten-aktivierend und unterstützt die Gefäßkonstriktion. Der an der Thrombozytenoberfläche angebrachte GPIIb/IIIa Rezeptor wird durch die ADP-Ausschüttung konformiert. Er ist nun in der Lage an Fibrinogen aus dem Blut zu binden, was nun Thrombozyten miteinander verbinden kann. Es kommt zur Plättchen Aggregation. Der weiße Thrombus ist das Ergebnis der primären Hämostase und führt vorerst zu einem Blutungsstopp.

Die sekundäre Hämostase läuft über einen extrinsischen und intrinsischen Weg ab und mündet letzten Endes in eine gemeinsame Endstrecke mit dem Ergebnis eines stabilen Fibrinnetzes. Zum Verständnis eine Übersicht der Gerinnungsfaktoren(35): Das a bedeutet „aktivierte Form“.

Gerinnungsfaktoren	Aktivierte Form
I → Fibrinogen	Ia → Fibrin
II → Prothrombin	IIa → Thrombin
III → Gewebethromboplastin	IIIa
IV → ionisiertes Calcium	IVa
V → Akzeleratorglobulin	Va → Ursprünglich VI
VII → Prokonvertin	VIIa
VIII → Antihämophiles Globulin A	VIIIa
IX → Antihämophiles Globulin B (Christmas factor)	IXa
X → Stuart-Prower-Faktor	Xa
XI → PTA (plasma thromboplastin Antecedent)	XIa
XII → Hageman-Faktor	XIIa
XIII → Fibrin-stabilisierender Faktor (FSF) (35)	XIII

Tabelle 1 Gerinnungsfaktoren entworfen nach **Stefan Silbernagl Taschenatlas Physiologie. Stuttgart; 2018** (35)

Bei Verletzungen geht der sonst im Gewebe situierte Faktor III eine Verbindung mit Faktor VII aus dem zirkulierenden Blut ein. Sie bilden einen Komplex. Dieser Komplex haftet mit Unterstützung von Calciumionen an der Zelloberfläche (extrinsischer Weg). Er aktiviert Faktor X. Der Komplex wird daher auch „extrinsischer Tenasekomplex“ genannt. Dieser Faktor X geht eine Verbindung mit seinem Co-Faktor V ein (erster Teil der Endstrecke) und aktiviert somit langsam und in geringer Menge den Faktor II, also

wird Prothrombin zu Thrombin. Es kommt zum Beginn der intrinsischen Verstärkerschleife: die kleinen Mengen Thrombin aktivieren Faktor VIII und IX. Zusammen bilden VIII und IX einen intrinsischen Tenasekomplex und aktivieren Faktor X so sehr, dass große Mengen an Faktor II aktiviert werden. Es entstehen große Mengen an Thrombin. Nun spaltet Thrombin (IIa) Fibrinogen (I) und es kommt zur Fibrinbildung (Ia). Am Ende wird Faktor XIII aktiviert, und es kommt zur Vernetzung der Fibrinmonomere. Das Fibrinnetz ist stabil und wird über kovalente Bindungen an Fibronectin und Kollagen der Extrazellulärmatrix geheftet. (26,27,35)

1.2.2 Grundsritte zur Herstellung von PRF

Je nach Hersteller gibt es verschiedene Zentrifugenmodelle, die für die Herstellung des Produktes verwendet werden. (28) Zur Herstellung wird venöses Blut abgenommen. Nach der Blutabnahme soll das Röhrchen schnell in die Zentrifuge gelangen, um ein Auslösen der Gerinnungskaskade vor der Zentrifugation zu vermeiden. Nach der Zentrifugation werden die Fraktionen sichtbar: oben azelluläres Plasma, dann der PRF-Propf aus Plättchen, Leukozyten und Wachstumsfaktoren und am Boden des Röhrchens sammeln sich Erythrozyten. (3) Die roten Blutkörperchen werden stumpf abgetrennt und der PRF Propf kann nun in einer vorgesehenen Metallbox aufbewahrt und komprimiert werden. PRF wird entweder zu einer Membran oder zu einem Zylinder modifiziert und kann dann im OP-Gebiet je nach Indikation eingebracht werden. Auch die Zerkleinerung und Beimengung zu Knochenersatzmaterialien ist in Verwendung. (19)

1.2.3 Material zur Herstellung

1.2.3.1 Zentrifugen

Je nach Forschungsgruppe werden auch unterschiedliche Zentrifugen verwendet. Grundsätzlich ist es möglich jede beliebige Laborzentrifuge zu verwenden,

solange die Rotorgröße bekannt ist und die relative Zentrifugal Kraft (Siehe Punkt 3.1.2.1 RCF) eingestellt werden kann.

Zur Zentrifugation der Proben wurde in dieser Arbeit die folgende Zentrifuge verwendet:

Duo centrifuge, Process for PRF™, Nice, France; Mectron, Cologne, Germany:(16) Winkelrotor mit 110 mm Radius, ungebremst. Zentrifuge stoppt von selbst 2-5 Sek nach der Zentrifugationszeit.

1.2.3.2 Blutröhrchen

Es werden mehrere Arten von Röhrchen verwendet:

Für flüssiges PRF werden unbeschichtete Kunststoff-Röhrchen verwendet. Für festes PRF gibt es Röhrchen aus Glas oder Kunststoffröhrchen mit Silikat-Beschichtung. Warum Glas? Glas dient als natürlicher Koagulationsbeschleuniger. Somit wird eine frühzeitige Clot-Bildung erreicht. Lässt man flüssiges PRF im Kunststoffröhrchen ein wenig stehen, koaguliert es ebenso nach etwa 30 Minuten.(36)

Es gibt noch weitere unterschiedliche Röhrchen, welche sich in der Oberflächenbeschaffenheit der Innenseite unterscheiden. Hierbei geht es nach Auskunft der Firma Mectron® hauptsächlich um unterschiedliche Rauigkeitsgrade des Kunststoffes. Auf die persönliche Frage nach genauerer Information wurde von Joseph Chokroun (Wien, 13.10.19) jedoch auf ein Betriebsgeheimnis verwiesen.

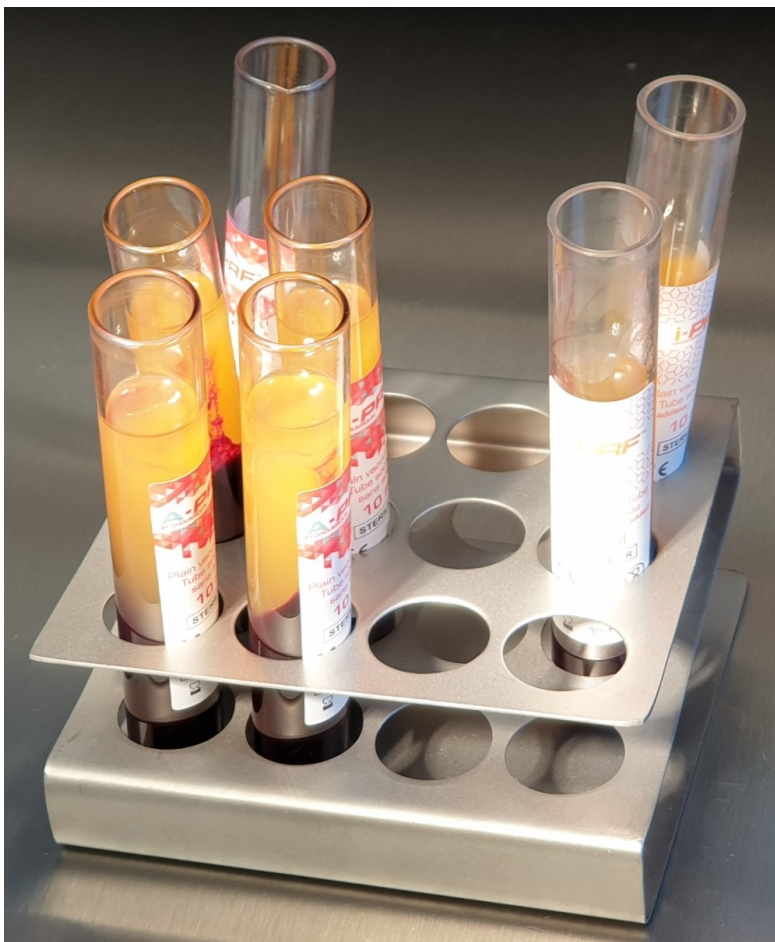


Abbildung 2 PRF Röhrchen; Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon

1.2.4 Analyseverfahren von PRF

1.2.4.1 Freisetzung von Wachstumsfaktoren gemessen mit ELISA

Enzyme-linked immuno-sorbet assay ist eine Methode den Gehalt von Antigenen mit Hilfe von Antikörpern zu messen. Auf einer Platte wird der dem gesuchten Antigen entsprechende Antikörper aufgebracht. Die Probe wird dann aufgetragen und es bilden sich Antigen- Antikörper- Komplexe. Nicht bindende Bestandteile werden ausgewaschen. Dann wird ein weiterer Antikörper aufgetragen, welcher bereits mit dem Enzym gekoppelt ist. Es wird ein Substrat für das Enzym dazugegeben, welches sich entsprechend verfärbt. Je nach Farbe kann mittels Photometer der Antigengehalt gemessen werden. (27)

Sandwich-ELISA (Nicht-kompetitiver ELISA):

Zuerst wird der *Coating* Antikörper in die 96-Well Platte gegeben und legt sich an die Kunststoffschicht an, um als immobilisierter Antikörper zu fungieren. Restliche mobile AK werden ausgewaschen. Die Probe (ein Antigen, wie z.B. VEGF) bindet an den immobilisierten Coating-Antikörper. Nicht bindende Teile werden wieder gewaschen. Und dann binden *detection*-Antikörper noch an einer anderen Stelle des Antigens. Je nachdem ob direkt oder indirekt ist bereits am detection-AK ein Enzym gebunden für die Farbreaktion. Wenn indirekt, wird dann noch ein Enzymgebundener Antikörper, der nur zum detection-AK affin ist, zugefügt und dient zur Quantifizierung des Antigens. Das Enzym (meist Alkalische Phosphatase) reagiert dann mit einem am Ende zugefügten Chromogen mit einer Farbe. Diese Farbreaktion führt durch eine Photometrische Untersuchung zum Ergebnis.(37)

Kompetitiver ELISA:

ELISA Kit Antigen konkurriert gegen das untersuchte Antigen (zum Beispiel.: VEGF) um Bindungsstellen am Detektor-Antikörper. Ein in der Probe vorliegender hoher Antigengehalt in der Probe vorliegt (bspw. viel VEGF im Plasma), würde zu einem niedrigen Signal beim ELISA führen, da die vielen gesuchten Antigene (VEGF) sich mit den *detector*-Antikörpern verbunden hätten und als Komplex ausgewaschen worden wären. Indirekt proportionaler Zusammenhang besteht,

wenn die Antikörper immobilisiert sind und die enzymmarkierten Antigene (ELISA kit) und die Antigene aus der Probe (VEGF) um die Bindungsstellen konkurrieren. Ebenso ist es möglich, dass die Antigene im Well sind und markierte und nicht-enzymmarkierte Antikörper zugefügt werden. Nicht gebundene Teile werden ausgewaschen. Dann ist die Farbentwicklung direkt proportional zur Antigenkonzentration der gesuchten Probe (VEGF).

Es gibt indirekte oder direkte Verfahren - indirekt bedeutet, es wird ein zusätzlicher Enzymgebundener Antikörper zugefügt, der an den Antikörper des Antigen-Antikörper-Komplexes bindet. Bei einem direktem kompetitiven ELISA-Verfahren ist das ELISA Kit Antigen bzw. der Antikörper bereits enzymgebunden.(37)

1.3 Formen des PRF

Es gibt flüssige und feste Formen des PRF. Einige weitere Formulierungen von PRF- Protokollen werden im Laufe der Arbeit erläutert.

1.3.1 Feste Form

Bei den festen Formen gibt es je nach Autor verschiedene Bezeichnungen. Verschiedene Protokolle führen zum Erhalt einer festen PRF-Form. Benannt werden sie unterschiedlich. Ein Beispiel wäre das sogenannte A-PRF, also *advanced PRF*, das bei einer Quelle mit 1300rpm für 14 min zentrifugiert wird. (16)
Anwendungsbeispiele für festes PRF:

- als Füllmaterial bei Sinuslift (28)
- In Kombination mit Knochenersatzmaterial bei Sinuslift (3)
- Zur Deckung von Kieferhöhlenschleimhauteinrissen bei Sinuslift.(3)
- Zur Aufrechterhaltung des Alveolarkammes nach Extraktion (28)
- Zusätzlich zur Kollagenmembran bei GBR (3)
- Rezessionsdeckung (3)
- Füllen von Alveolen nach Weisheitszahnentfernung zur Minderung des

Infektionsrisikos (3)

- Dolor-post Behandlung (28)
- Parodontal-plastische Chirurgie (28)
- Füllung von Knochendefekten(28)
- Furkationsbehandlung (28)

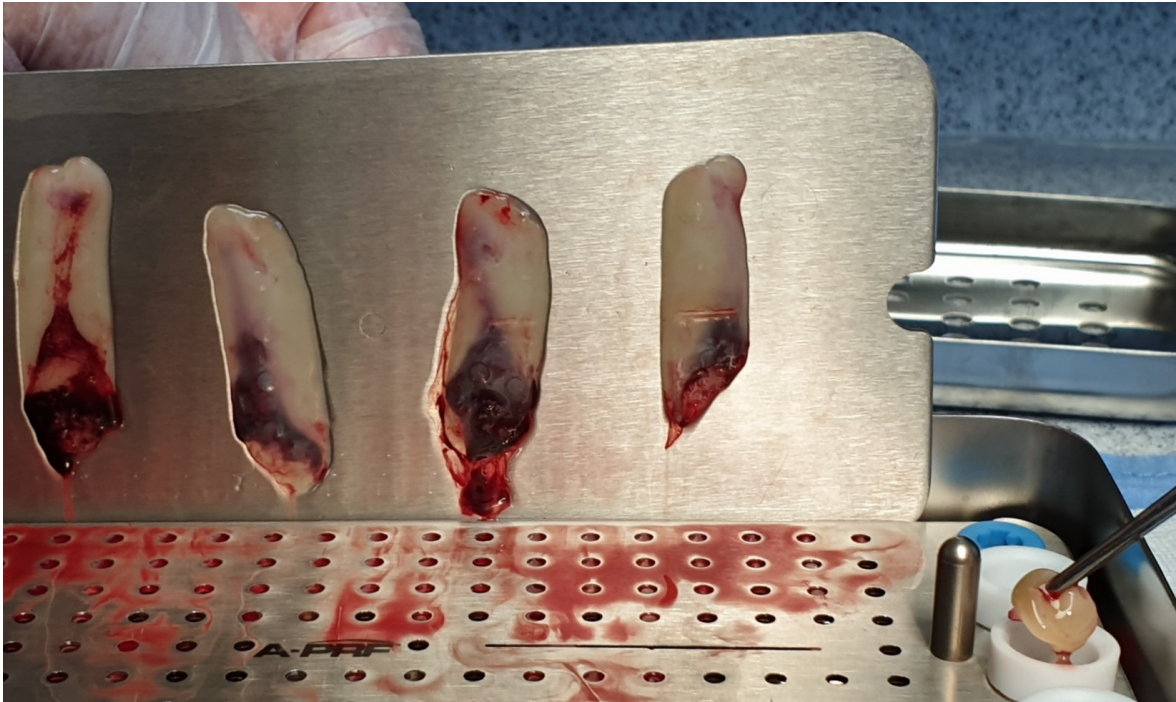


Abbildung 3 Festes PRF, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwitnig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon

1.3.2 Flüssige Form

Die flüssige Form kann hergestellt werden, wenn das gefüllte 10ml Blutröhrchen mit 700rpm für drei min zentrifugiert wird. Sie wird als I-PRF, also injectable PRF bezeichnet (28)

Anwendungsbeispiele für flüssiges PRF:

- Therapie von Medikamenteninduzierter Osteonekrose des Kieferknochens (MRONJ) → Wundheilung ↑, Epithelialisierung mit PRF: zwei bis vier Wochen; ohne PRF: zwei bis acht Wochen. (Beste Erfahrungen: Kombi von PRF mit Bone morphogenetic protein 2 (BMP 2). (28)
- Benetzen der Implantatoberfläche mit PRF → weniger Knochenresorption und bessere Osseointegration (38).



Abbildung 4 Flüssiges PRF, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwittig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon

2 Material und Methoden

2.1 Theoretischer Teil

Die Literatursuche erfolgte mittels Pubmed. Unter den Keywords „*Platelet-rich fibrin AND growth factor AND oral*“ wurde eine systematische Literatursuche von Publikationen der letzten zehn Jahre durchgeführt.

Ziel der Suche war es, die Arbeiten über PRF anhand des gemessenen Wachstumsfaktorengehaltes und der verwendeten relativen Zentrifugalkraft zu sortieren. Die Ausschüttungen Wachstumsfaktoren dient als Qualitätsmerkmal für die Anwendung von PRF. Es soll hiermit erarbeitet werden, ob man eine ideale Zentrifugeneinstellung für ein bestmögliches *Outcome* definieren kann.

2.1.1 Einschlusskriterien

- Artikel nicht älter als zehn Jahre
- Quantitative Messung des Wachstumsfaktorengehaltes
- Nachvollziehbare und ausreichende Angabe der Zentrifugeneigenschaften und deren Einstellung
- Mindestens einer der fünf Wachstumsfaktoren (TGF- β 1, PDGF, EGF, VEGF, MMP-9) wurde in der Arbeit untersucht.
- Quantitative Analyse an mindestens einem der folgenden Zeitpunkte (eine Stunde, ein Tag, drei, sieben oder zehn Tagen)
- Zahnärztlicher Bezug
- Ausschließlich humane ProbandInnen

2.1.2 Ausschlusskriterien

- Publikationen älter als zehn Jahre
- Keine quantitative Messung des Wachstumsfaktorengehaltes
- Fehlender zahnärztlicher Bezug
- Unzureichende Angaben über die Herstellung des PRFs (Zentrifugeneinstellung etc.)
- Tierversuche

2.2 Praktischer Teil

Die Erprobung eines Studienprotokolls erfolgte in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Transfusionsmedizin und Blutgruppenserologie. Das PRF Zentrum an der KGU Frankfurt forscht seit Jahren an PRF im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich.

Ein Ethikantrag um Blutabnahmen durchzuführen wurde vorbereitet und erhielt ein positives Ethikvotum. Da die finanziellen Mittel für eine größere ProbandInnenzahl vorerst nicht zu Verfügung stehen, habe ich mit vier Probandinnen gearbeitet.

Der Versuchsteil bestand aus der Blutabnahme dieser vier Personen. Ein Protokoll dieser Forschungsgruppe von Prof. Ghanaati wurde herangezogen. Der Gehalt an Wachstumsfaktoren wurde mittels ELISA Verfahrens an der Universitätsklinik für Transfusionsmedizin und Blutgruppenserologie ausgemessen. Die Ergebnisse habe ich mit jenen der Gruppe Ghanaati, S. und Al Maawi, S. verglichen.

Die Effizienz des Protokolls wurde durch ähnliche Ergebnisse bestätigt.

Somit wurde der Grundstein für weitere Erprobungen gelegt.

2.2.1 Blutabnahme

Die Blutabnahme umfasste 20ml pro Person. Mit einem Butterfly wurde eine Vene im Arm punktiert. Je ein Kunststoffröhrchen und ein Glasröhrchen wurden mit je zehn ml Blut befüllt.

2.2.2 Zentrifugation

Alle Röhrchen wurden bei 1200 rpm für acht min zentrifugiert. Die Rotorgröße der verwendeten Zentrifuge liegt bei einem Radius von 110mm. (24) Die Zentrifuge öffnet sich nach Beendigung des Vorgangs von selbst.

2.2.3 Vorbereitung zur Inkubation

Unter sterilen Bedingungen wurde das flüssige PRF (I-PRF) mit Einmalspritzen aufgezogen und in Sechs Well Platten (Sarstedt® Zellkulturpl 6-Well) transferiert. Es wurde daraufhin für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine Koagulation zu forcieren. In der Zwischenzeit wurden A-PRF *Clots* stumpf von den darunterliegenden Erythrozyten getrennt. Auch das feste PRF (A-PRF) wurde in sechs Well Platten gelegt.

Das Medium (RPMI1640+GlutaMax (500ml)) wurde mit der Antibiotikallösung (Streptomycin/Ampicilin) vermischt. Als die 30 Minuten Inkubationszeit Jede PRF-Probe wurde mit fünf ml Medium beträufelt. Dieser Arbeitsschritt erfolgte mit einem Pipettierhelfer (Eppendorf Easypet®) ebenso unter sterilen Bedingungen. Bei den Proben wurde jeweils ein Kontrollprobe (nur Medium ohne PRF) angelegt.

2.2.4 Inkubation und Vorbereitung der ELISA Untersuchung

Die beträufelten Proben werden bei 37°C inkubiert und nach sechs definierten Zeitpunkten wurde der Überstand abpipettiert. Jeder Überstand wird unter sterilen Bedingungen in händisch beschriftete, verschraubte Röhrchen (Sarstedt® Mikro-Schraubröhre zwei ml, PP) pipettiert. Der Überstand jeder PRF-Probe wurde jeweils auf sechs Röhren aufgeteilt, da die ELISA Untersuchung für fünf Wachstumsfaktoren durchgeführt wurde und jeweils ein leeres Medium mit untersucht wurde. Nach Verschluss der Gefäße wird jeweils fünf ml frisches Medium auf die PRF-Proben geträufelt. Die Proben werden erneut bei 37°C inkubiert. Die Überstände bei -81°C eingefroren.

Diese Schritte werden gleichsam zu den definierten Zeitpunkten durchgeführt:

- eine Stunde
- sieben Stunden
- ein Tag
- zwei Tage
- sieben Tage
- zehn Tage

2.2.5 ELISA Untersuchung

Nach Herstellerangaben wurde die Untersuchung der Proben von der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin durchgeführt. Es wurde ein *Sandwich*-ELISA (Duoset® ELISA, R and D'Systems) verwendet. Die Untersuchung fand im Dreifachansatz statt. Die Ergebnisse wurden wie unten (siehe nachfolgender Abschnitt) folgt übermittelt.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Theoretischer Teil

3.1.1 Anwendungsgebiete

Die erste Schlüsselfrage dieser Arbeit bezieht sich darauf, wo PRF in der Zahnheilkunde Anwendung findet.

3.1.1.1 Parodontologie

3.1.1.1.1 Furkationsdefekte

In der Parodontologie spielen unter anderem Furkationsdefekte eine Rolle. (39) PRF wird zur chirurgischen Sanierung des Attachmentverlustes im Rahmen von Furkationsdefekten verwendet. Jedoch ließ sich in der Recherche noch keine histologische Untersuchung des regenerierten Gewebes finden. Daher kann keine eindeutige Aussage über die erfolgreiche chirurgische Therapie von Furkationsdefekten mittels PRF getroffen werden.(3)

3.1.1.1.2 Rezessionsdefekte

Um Rezessionen der Miller Klasse I und II zu beheben, werden andere Methoden mehr forciert. Dennoch stellt das Aufbringen von PRF Membranen eine mögliche Methode dar, Rezessionsdefekte zu decken. Der finanzielle Aufwand ist hier geringer als mögliche andere Therapien. (3,40) Hier bietet sich die Anwendung von herkömmlichen chirurgischen Behandlungsmethoden in Kombination mit PRF an. Somit führt das PRF zu einer schnelleren Schmerzreduktion, besonders im Bereich des entnommenen Schleimhauttransplantates.(3,40)

3.1.1.2 Guided bone regeneration

Lokale Knochendefekte, welche entzündungsbedingt entstehen, werden oft mit kleinen, chirurgischen Interventionen behandelt. Man spricht hier vom sogenannten *open flap debridement*. Der zu sanierende Bereich wird aufgeklappt und das Entzündungsgewebe entfernt. In einem weiteren Schritt werden die Wurzeln oder wird die Wurzel von bestehenden Konkrementen befreit. Je nach Größe des Defektes wird eine Membran eingefügt um das Einwachsen von Epithelzellen bevor das Knochenwachstum von erfolgt ist, zu vermeiden. (34)

In Hinblick auf PRF gibt es Studien zu drei verschiedene Varianten, es in diesem Zusammenhang in Spiel zu bringen. Zum ersten wurde es anstelle einer Kollagenmembran verwendet. Zum zweiten haben ForscherInnen die Kollagenmembran mit einer zusätzlichen Schicht aus PRF Membranen abgedeckt. Eine dritte Weise beschreibt die Applikation von PRF anstelle von Knochenersatzmaterial bzw. indem es mit dem eingebrachten Knochenersatzmaterial vermischt wurde. Jedoch lässt sich aus den durchgeführten Studien keine signifikante Stellungnahme hinsichtlich einer „idealen Variante“ erkennen.(3)

Für die Anwendung des PRF in diesem Zusammenhang spricht ein Faktum jedoch eindeutig: Das Risiko einer Lappennekrose wird durch die antiinflammatorische Wirkung der Wachstumsfaktoren in der PRF Membran minimiert. Außerdem bleibt zu erwähnen, dass eine PRF Membran zwar permeabel für Zellen ist, jedoch wurden in der Literatur keine Einwanderung von Weichgewebszellen in das knöchernen Department beobachtet. (41,42)

3.1.1.3 Zahnärztliche Chirurgie

3.1.1.3.1 Alveolitis sicca

Die leere Alveole nach einer Zahnextraktion wurde bereits effektiv mit PRF behandelt. Laut Fallbeschreibung wurden nach einer einmaligen Reinigung der Alveole ein oder mehrere PRF-Koagel, je nach Defektgröße in die leere Alveole gefüllt. Diese wurden mit wenigen Nähten fixiert. (43) Die Weichgewebsheilung wurde beschleunigt, was in diesem Fall zu einem Wundverschluss und einer

schnellen Abheilung der Extraktionsalveole führt. Weiters wird das Infektionsrisiko durch die Applikation von PRF gesenkt. (3) Die Patienten äußerten eine Schmerzreduktion nach nur wenigen Tagen. Die Entzündung ging rasch zurück und innerhalb von 14 Tagen waren die trockenen Alveolen (nach außen hin) verheilt. (44)

3.1.1.3.2 Zystendefekte

Nach der Entfernung von Zysten bleiben im Kieferknochen oft Hohlräume von beachtlicher Größe zurück. Die Füllung des Defektes mit PRF und Knochenersatzmaterial bietet die Möglichkeit, Knochenstruktur und Form zu stützen und zu erhalten. Zudem schützt die Zugabe von PRF vor Infektionen. (42)

3.1.1.3.3 Medikamenten induzierte Kieferosteonekrose

Eine der unangenehmen Nebenwirkungen von Medikamenten ist die daraus resultierende Kieferosteonekrose. Sie tritt beispielsweise bei der Einnahme von Bisphosphonaten und Denosumab ein.

Bei Bisphosphonaten wird die Osteoklastenfunktion direkt gehemmt. Bei Denosumab handelt es sich um einen künstlich hergestellten humanen monoklonalen Antikörper. Er blockiert die RANKL Bindungsstelle durch seine hohe Affinität zu diesem. Dadurch kann RANK mit RANKL keine Verbindung eingehen. Demzufolge werden Stammzellen nicht mehr dazu angeregt, sich in Osteoklasten umzuwandeln und der Knochenstoffwechsel wird gehemmt.

Die Therapie von Kieferosteonekrosen gestaltet sich nach wie vor als langwierig und kompliziert. Relativ gute Ergebnisse ließen sich mit chirurgischen Revisionen, Antibiotikagabe und dem Einsatz von diversen konservativen Methoden erzielen. Der abgestorbene Knochen wird entfernt bis sich blutender, intakter Knochen zeigt. Folgende Risiken gilt es in Betracht zu ziehen: Eine Infektion im Zuge dieser Behandlungen birgt für die Patienten einen langen Leidensweg. Die ohnehin mühselige Behandlung wird abermals in die Länge gezogen. Daher gilt es Infektionen in diesem Zusammenhang tunlichst zu vermeiden. Die antiinfektiöse Wirkung von Plättchen-Konzentraten durch die Wachstumsfaktorenfreisetzung über längere Zeit hinweg, hat hinsichtlich des Infektionsrisikos bereits positive

Ergebnisse geliefert. (45) Um die entstandene Wunde schneller und schmerzärmer zur Heilung zu bewegen, bietet sich das Applizieren von PRF-Membranen an. (36)

3.1.1.4 Implantologie

3.1.1.4.1 *Socket Preservation*

Die Verwendung von PRF als Füllmaterial in Alveolen nach Extraktionen wird in der Literatur durchaus positiv hervorgehoben. Die positiven Effekte beziehen sich auf die Knochendichte und den Verlauf des Alveolarkammes. (17,46,47) Auch gibt es Daten, welche auf eine hohe Stabilität der später in diesen Regionen eingesetzten Implantate hinweisen, verglichen zu jenen, ohne Socket Preservation durch PRF. Auch der Knochenrückgang wird in einer Arbeit als niedriger beschrieben. (48,49)

3.1.1.4.2 *Alveolar Ridge Augmentation*

Die unterschiedlichen Untersuchungsparameter und Methoden erlauben bislang keine eindeutige Stellungnahme zur Anwendung von PRF bei der Augmentation am Alveolarkamm. Die klassischen Vorteile auf das Weichgewebe und die geringere Schmerzempfindung wird in der Literatur deutlich. In einem Review ist von einem tendenziell geringeren bukkalen Knochenverlust bei der PRF-Anwendung die Rede. (50) Jedoch liegen keine eindeutigen Daten mit dezidierten Hinweisen auf eine Reduktion des Knochenabbaus durch PRF vor. Somit ist die Anwendung, um Knochen zu generieren, nicht als erfolgsversprechend einzuordnen. (51) Für die Anwendung in diesem Bereich spricht hingegen das niedrigere Schmerzaufkommen und die Infektionsvermeidung, sowie die schnellere Weichgewebsheilung. (3)

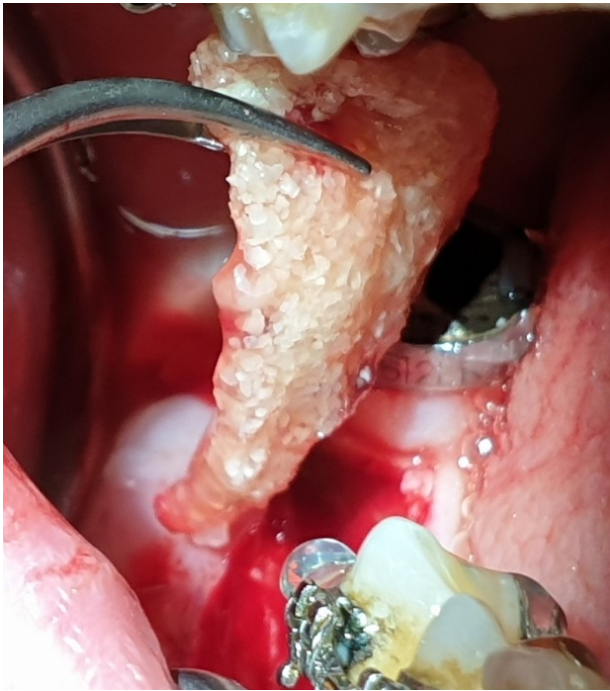


Abbildung 6 Mischen von Knochenersatzmaterial und PRF, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwittig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon

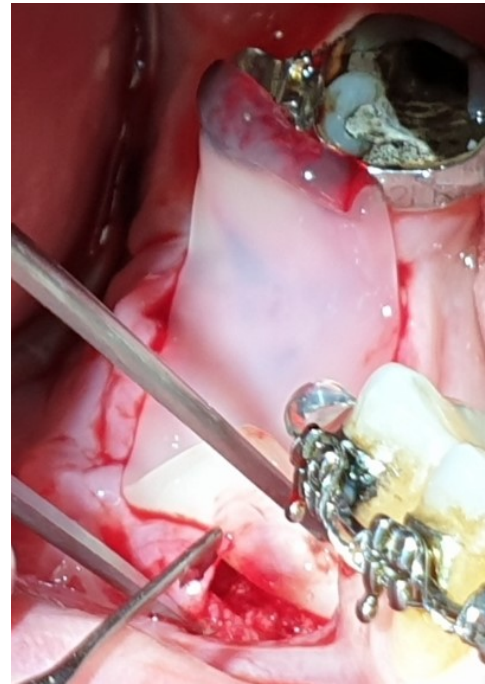


Abbildung 5 Bedecken des Augmentates mit einer PRF Membran, Bildmaterial freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Ordination Dr. Zwittig P. Am Hauptplatz 47, 8410-Wildon

3.1.1.4.3 Sinusbodenelevation

Um ein Implantat zu setzen, ist die Präsenz eines adäquaten Knochenlagers unabkömmlich. Eine der meist verbreiteten und etablierten Arten des Knochenaufbaues im Oberkiefer ist die Sinusbodenelevation. Die Kieferhöhlenschleimhaut wird vom basalen Knochen des Sinus maxillaris abpräpariert und der entstandene Hohlraum birgt eine Höhle, in der durch verschiedenste Techniken Knochen entstehen kann. Eine gängige Methode ist das Einbringen von Knochenersatzmaterial. Diese Art der Knochenaugmentation ist unter anderem beliebt, weil die eingebrachten Ersatzmaterialien im Schutz der umliegenden Gewebe vor externen Störfaktoren einheilen können. Zusätzlich wird das Gebiet von allen Seiten mit Blut versorgt und wird dabei vor dem Eintritt oraler Keime weitestgehend abgeschirmt. (52) Die Elevation kann einerseits über ein laterales Knochenfenster oder andererseits über einen crestalen Zugang im Zuge der Implantat-Präparation erfolgen. (53) Die Anwendung von PRF in diesem Zusammenhang ist vielfältig. Zum einen kann PRF zerkleinert werden, um vermischt mit Knochenmaterial, in den Hohlraum eingefügt werden. (53) Es

besteht auch die Möglichkeit, den Hohlraum zwischen knöchernem Kieferhöhlenboden und Kieferhöhlenschleimhaut mit PRF allein aufzufüllen. Stabil in Position gehalten wird die angehobene Schneider'sche Membran hierbei von den simultan gesetzten Implantaten. (41,50) In manchen Fällen erleidet die Kieferhöhlenschleimhaut bei der Präparation einen Einriss. Dieses Vorkommnis ereignet sich häufig, wenn die Kieferhöhle von scharfen, knöchernen Septen durchzogen wird (Underwood'sche Septen). Um den Eingriff dennoch erfolgreich zu vollenden, wird zur Abdichtung membranförmiges PRF auf die eingerissene Stelle gelegt. Das weitere Vorgehen entspricht dem herkömmlichen Verfahren. (52,54)

3.1.1.5 Kieferorthopädie

Um die Zahnbewegung schneller möglich zu machen, wird bei kieferorthopädischen Patienten in gewissen Fällen chirurgisch in den Knochenumbau eingegriffen. *Wilco's modified periodontally accelerated osteogenetic orthodontics (PAOO)* nennt sich diese Operation. Nach dem Abpräparieren der Mukosa und des Periosts, wird der kortikale Knochen mehrmals mit kleinen Rosenbohrern perforiert. Anschließend wird Knochenersatzmaterial an den Knochen angelagert. Die Mischung aus Knochenersatzmaterial und PRF sowie das Bedecken des Augmentationsmaterials mit PRF Membranen bietet bestmögliche Heilungsbedingungen für das Weichgewebe. Das Infektionsrisiko und der Bedarf an Schmerzmedikation postoperativ reduziert sich auf ein Minimum. (48,55)

3.1.1.6 Endodontie

Zahntraumata spielen besonders im Jugendalter eine große Rolle. Die große Problematik in diesem Bereich stellt das Infektionsrisiko der Pulpa nach Zerstörung der Krone dar. Der infizierte Teil der Pulpa wird entfernt (Pulpektomie) und die Restsubstanz gereinigt und desinfiziert. Um den Zahn zu erhalten ist eine Pulpenobliteration und ein Verschluss des Apex mit Reizdentin der Schlüssel zum Erfolg. Plättchenkonzentrate, wie PRF, unterstützen eine forcierte Dentinverdichtung. Desweiteren wird die Entwicklung einer Infektion und die

Gefahr einer periapikalen Entzündung gemindert. Die Ausheilung von Zahntraumata wird somit weitgehend unterstützt. (48,56)

3.1.2 Auswertung der Literaturanalyse

Die Hauptproblematik rund um den Themenkomplex des PRF ist die große Unklarheit über eine Systematik. Die Vergleichbarkeit verschiedener Studien erweist sich als schwierig, da keine einheitlichen Parameter gegeben sind. Als wesentliche Anhaltspunkte wurden zum Beispiel in der Literatur folgende genannt: Dimension des Rotors, Angulation des Rotors für die Halterung der Röhrrchen, Umdrehungen pro Minute (rpm), *Relative centrifugal force* (RCF), Zusammensetzung und Größe der Röhrrchen und das Zentrifugenmodell. (57) Da die die RCF mehrere der oben genannten Einflussfaktoren in sich vereint, wurde, zuletzt auch als vielversprechender Parameter für die Qualität von PRF diskutiert. (1,16,58,59).

Auch während der Literaturrecherche erwies sich die G-Kraft als auffallend häufig erwähnte Größe. Dabei wurde der Gehalt an Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen g-Wert Bereichen gemessen und quantitativ verglichen. (1,16,58,59).

3.1.2.1 *Relative Centrifugal Force* - der entscheidende Parameter?

Die RCF ist jene Kraft, welche bei einer gewissen Anzahl an Umdrehungen und einer bestimmten Rotorgröße für die Zentrifugation benötigt wird. Die stellt den Zusammenhang einiger Einflussfaktoren her und kann errechnet werden.

$$RCF = r \cdot rpm^2 \cdot 1,118 \cdot 10^{-5}$$

r..... Radius des Rotors in cm

rpm.... Umdrehungen pro Minute

$1,118 \cdot 10^{-5}$ Um die Rechnung unter Berücksichtigung der Si-Einheiten und der Erdbeschleunigung durchzuführen, jedoch die Laborparameter (Radius in cm und

Umdrehungen pro Minute für die Winkelgeschwindigkeit) ist diese Konstante einzusetzen.

Zum besseren Verständnis:

Das Bewegungsmuster einer Zentrifuge sind Kreisbewegungen. Man spricht also von der Zentripetalbeschleunigung:

$$a_z = \omega^2 \cdot r$$

$360^\circ \triangleq 1$ Umdrehung im Kreis $\triangleq 2\pi$

$1\text{U/min} \mid : 60 \mid \cdot 2\pi$

$1\text{U/min} \triangleq 0,1047 \text{ rad/sec}$

ω Winkelgeschwindigkeit ($\omega = 2\pi/60\text{sec}$)

r Radius [m]

Die Erdbeschleunigung (9,81) muss miteinberechnet werden, da die Erde unser Bezugssystem ist. Zudem rechnen wir beim Radius von m in cm um ($\frac{r}{100}$)

$$a_z = (2\pi/60\text{sec})^2 \cdot r$$

$$a_z = \frac{4 \cdot \pi \cdot \pi}{3600 \cdot 9,81 \cdot 100} \cdot r$$

$$a_z = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r$$

Dieser Zusammenhang führte zur Schlüsselfrage der Literaturrecherche: **Wirkt sich die RCF auf den Wachstumsfaktorengehalt von PRF aus?**

Besonders aufgefallen ist diesbezüglich die Gruppe aus Frankfurt am Main. Sharaam Ghanaati erarbeitete zusammen mit Joseph Choukroun das *Low speed centrifugation concept (LSCC)*. (1) Dabei handelt es sich um eine Verminderung der relative centrifugal force. Ein Vergleich von hoher, mittlerer und niedriger RCF führte zu folgendem Ergebnis: Die mittlere und niedrige RCF Einstellung ergaben einen signifikant höheren Gehalt an Wachstumsfaktoren im Plättchenreichen Fibrin als die hohe RCF Einstellung. Auf diese und weitere Arbeiten wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

Die Erklärung hierfür lässt sich so zusammenfassen: Die Reduktion der RCF äußert sich grundsätzlich in einer Erhöhung der Zellanzahl des entstandenen PRFs. Die in PRF enthaltenen Zellen (siehe Abschnitt 1.2.1.1.) waren in der Fibrinmatrix der niedrigsten RCF Gruppe am gleichmäßigsten verteilt. Passend zu den erhöhten Zellzahlen in niedrig zentrifugiertem PRF ergab auch die Wachstumsfaktorenfreisetzung einen klaren Trend. Der Gehalt an nachgewiesenen Wachstumsfaktoren während des Zentrifugationsprozesses war in den Gruppen mit mittlerer bzw. niedriger RCF deutlich größer als in der Gruppe mit hohem RCF-Wert.(16,58,60)

Dies hat gezeigt, wie entscheidend die Einstellung der Zentrifuge ist. Der RCF-Wert müsste somit zu einem Anhaltspunkt und einem Richtwert für die Herstellung von PRF werden. Folglich sollte dadurch (theoretisch) ein RCF-Referenzbereich festgelegt werden können, der den AnwenderInnen damit eine relativ hohe Zellzahl respektive einen hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren im hergestellten PRF in Aussicht stellen können sollte. Somit stiege die Erfolgsrate auf eine schnelle Heilung.

Ergebnisse der Literatursuche

Die Literatursuche mit den Suchbegriffen „Platelet-Rich Fibrin AND growth factor AND Oral “ergab am 18.2.2020 insgesamt 133 Artikel. Im ersten Durchlauf wurden alle Abstracts gelesen. Dabei reduzierte sich die Anzahl an weiterverwendbaren Arbeiten für die bestehende Literatursuche auf 16. Diese 16 Artikel wurden vertiefend in Bezug auf die verwendeten Protokolle analysiert.

Zwei dieser Arbeiten hatten die grafisch dargestellten Ergebnisse der Wachstumsfaktorenausschüttung an bestimmten Zeitpunkten als Tabelle (61,62) veröffentlicht. Daraufhin wurden mehrfach Anfragen an die Autoren der verbliebenen 14 Publikationen verfasst. Von zwei Publikationen wurden mir numerische Daten zugesandt.(63,64). Für die übrigen Publikationen mussten die Daten daher anhand der Grafiken approximativ bestimmt werden. Damit standen insgesamt 16 Arbeiten zur weiteren deskriptiven Analyse zu Verfügung.

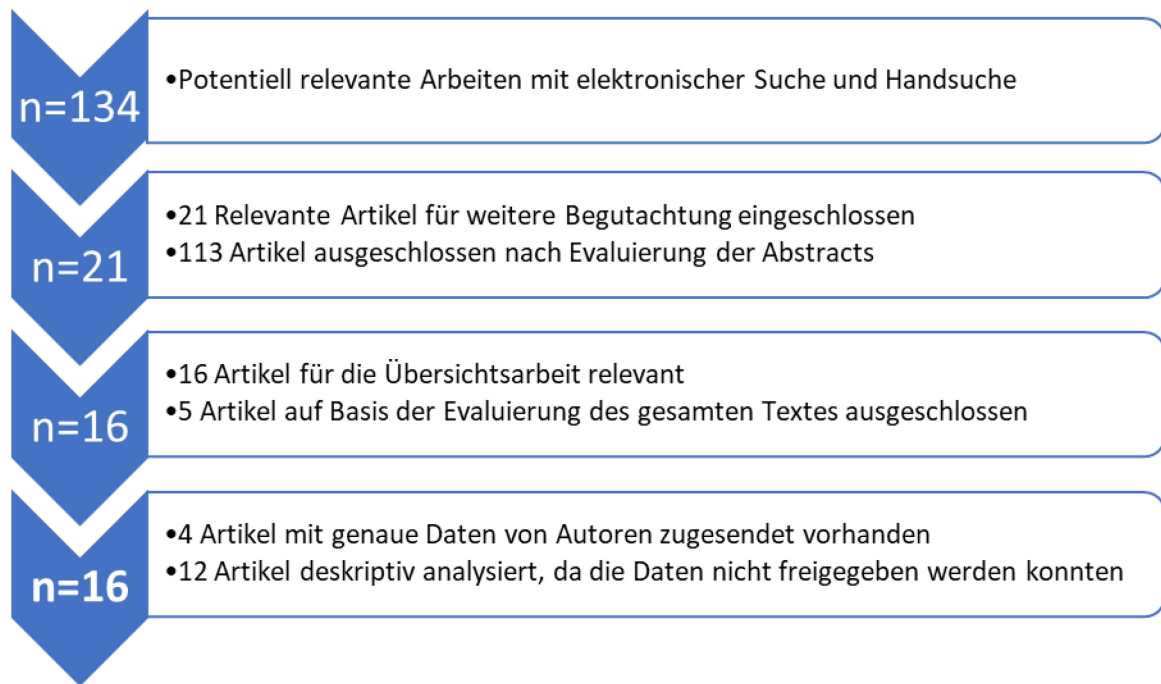


Abbildung 7 Flussdiagramm zum Screening relevanter Arbeiten

Bei 16 Artikel wurden Blutproben zentrifugiert und eine Messung des Gehaltes verschiedener Wachstumsfaktoren durchgeführt. Acht (1,21,23,58,65) dieser 16 Arbeiten haben zwei oder mehrere Protokolle mit verschiedenen RCF-Werten verwendet und die Werte der ELISA Messungen einander gegenübergestellt. Von diesen acht Arbeiten, wurden bei drei Arbeiten (16,60,62) sowohl unterschiedliche RCF-Werte, als auch verschiedene Zentrifugationszeiten verglichen.

Folgende Artikel beschreiben einen Zusammenhang zwischen RCF und dem Gehalt an freiwerdenden Wachstumsfaktoren:

- ***Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF*** Kobayashi et al. 2016

Es wurden Proben mit 100g für 14 Minuten (1500rpm) und Proben mit 325g für 12 Minuten (2700rpm) zentrifugiert und verglichen. Untersucht wurden *platelet-derived growth factor* (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), *transforming growth factor beta 1* (TGFB1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *insulin-like growth factor* (IGF). In dieser Arbeit liefern Proben, welche mit 100g zentrifugiert wurden, einen höheren Gehalt an allen

untersuchten Wachstumsfaktoren, als jene, welche mit 325g zentrifugiert wurden.(21)

- ***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*** Ehrenfest et al. 2018

Bei dieser Arbeit wurde Blut mit 400g für 12 Minuten (2700rpm) zentrifugiert und mit 100g für 14min (1500rpm). Es wurden *transforming growth factor β -1* (TGF β -1), *platelet derived growth factor AB* (PDGF-AB) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untersucht. Die Ergebnisse waren bei 400g in Bezug auf Wachstumsfaktoren höher als bei 100g. (23)

- ***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*** Choukroun et Ghanaati 2018

Drei verschiedene RCF-Werte wurden angewandt. Zum ersten 710 g für acht Minuten (2400 rpm), zum zweiten 177g für acht Minuten (1200rpm) und zum dritten 44g (600rpm) für acht Minuten. *Transforming growth factor β -1* (TGF β -1), *platelet derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wurden gemessen. In diesem Fall steigt der Gehalt an Wachstumsfaktoren je niedriger die die RCF ist. (1)

- ***Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices*** Wend et al. 2017

Auch bei dieser Arbeit wurden drei verschiedene Stärken der RCF verglichen, 966g für drei Minuten (2800rpm); 241g für drei Minuten (1400rpm) und 60g für drei Minuten (700rpm). Nach einer Stunde Die ELISA Untersuchung durchgeführt.

Die Mittelwerte von *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF)-b1 und *epidermal growth factor* (EGF) waren bei 241g und 60g etwa gleich hoch, hingegen lagen die Werte deutlich höher als bei 966g. Für VEGF war die RCF von 60g jene mit der größten Ausschüttung an Wachstumsfaktoren. (58)

- ***Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces*** Miron et al. 2020

Die Proben wurden in drei unterschiedlichen Zentrifugen (Radius von 85mm, 110mm und 104mm Rotorgröße) mit 693g für 12 Minuten (2700rpm), 700g für 12 Minuten (2400rpm), 700g für 12 Minuten (2500g), 200g für acht Minuten (1500rpm), 207g für acht Minuten (1300rpm) und 200g für acht Minuten (13311rpm) zentrifugiert.

Die Zentrifugationen mit 200g bzw. 207g haben jeweils höhere Werte ergeben als jene mit rund 700g.(65)

Folgende Artikel beschreiben einen Zusammenhang zwischen RCF und Zeit der Zentrifugation, sowie dem Gehalt an freiwerdenden Wachstumsfaktoren:

- ***Optimized platelet rich fibrin with the low speed concept: growth factor release, biocompatibility and cellular response*** Fujioka-Kobayashi et al. 2017

Die Arbeit hat Messungen mit drei verschiedenen Protokollen durchgeführt. 708 g für 12 Minuten (2,700rpm), 200g für 14 Minuten (1300rpm) und 200g für acht Minuten (1300rpm). Die Wachstumsfaktorenmessung wurde für *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF)-b1, *epidermal growth*

Factor (EGF) und *insulin-like growth factor* (IGF) gemacht. Die Ergebnisse waren bei den Proben mit niedriger RCF und der kürzesten Zentrifugationszeit am höchsten.(60)

- ***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)*** El Bagdadi et al. 2017

Diese Arbeit hat drei Protokolle durchgeführt, 708g für 12 Minuten (2400rpm), 208g für 14 Minuten (1300rpm) und 208g für acht Minuten (1300rpm). Hier wurden *transforming growth factor β -1* (TGF β -1), *platelet derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) beobachtet. Die gesamten freigesetzten Wachstumsfaktoren waren innerhalb von 10 Tagen jeweils bei 208g und acht Minuten am höchsten. Bei VEGF war an Tag sieben und Tag zehn ein etwas höherer Gehalt bei 208g und acht Minuten zu sehen. An den übrigen Messzeitpunkten (sechs Stunden, ein Tag, zwei Tage, drei Tage) wurde bei allen drei Protokollen etwa gleich viel VEGF frei. Am siebten und zehnten Tag wurde auch deutlich mehr TGF- β 1 bei 208g für 14 Minuten sowie 208g für acht Minuten detektiert. An den Messzeitpunkten davor lagen alle Protokolle in einem ähnlichen Bereich. Jedoch wurde an Tag drei bei 708g für 14 Minuten und 208g für acht Minuten mehr TGF- β 1 freigesetzt, als bei 208g für 14min. EGF verlief von Beginn an bei 208g für 14 Minuten und 208g für acht Minuten deutlich höher als bei 708g für 14 Minuten. Es bleibt zu erwähnen, dass 208g für acht Minuten nach einem Tag am meisten gestiegen ist.(16)

- ***White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds*** Cabaro et al. 2018

Die Blutproben wurden einerseits mit 408g für 12 Minuten (2700rpm), andererseits mit 100g für 14 Minuten (1500rpm) zentrifugiert. *Platelet derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wurden nach einem Tag gemessen und waren bei 100g für 14 Minuten deutlich höher als bei 408g für 12 Minuten. (62)

Die Ergebnisse der analysierten Arbeiten lassen einen Zusammenhang zwischen RCF, Zentrifugationszeit und Wachstumsfaktorengehalt möglich erscheinen. Aufgrund der mangelnden Datenlage und der Vielzahl an unterschiedlichen PRF-Protokollen war eine Korrelationsanalyse bezüglich

RCF und Wachstumsfaktorengleichheit bzw. RCF, Zentrifugationszeit und Wachstumsfaktorengleichheit jedoch nicht möglich. Große Variabilität zwischen den Protokollen besteht hauptsächlich hinsichtlich RCF und Zeit der Zentrifugation. Um die Hypothese „Eine niedrigere RCF sowie eine kürzere Zentrifugationszeit führt zu höherem Wachstumsfaktorengleichheit“ zu untermauern, bedarf es größerer Datenmengen zur Untersuchung eines idealerweise einheitlichen Herstellungsprotokolls.

3.2 Praktischer Teil

Die ELISA-Untersuchung der *Proof of Concept*- Testphase ergab folgende Werte (66). Zum Überblick wurden die Mittelwerte errechnet. Die Ergebnisse wurden wie folgt grafisch veranschaulicht.

Für das flüssige PRF (hier: I-PRF) und feste PRF (hier als A-PRF) liegen entsprechende, gruppenbezogene Diagramme vor. Die Blutabnahmen erfolgen bei vier PatientInnen mit Glasröhrchen für flüssiges PRF und Kunststoffröhrchen für festes PRF. Beide PRF Typen wurden im Anschluß bei 1200 rpm für acht min bei 177g zentrifugiert. Der max. Zentrifugen-Radius bei der verwendeten Zentrifuge beträgt 110mm.

Es ist anzumerken, dass die Werte der Vergleichsstudie auf Mittelwerten von sechs PatientInnen beruhen.

3.2.1 Flüssige Matrix

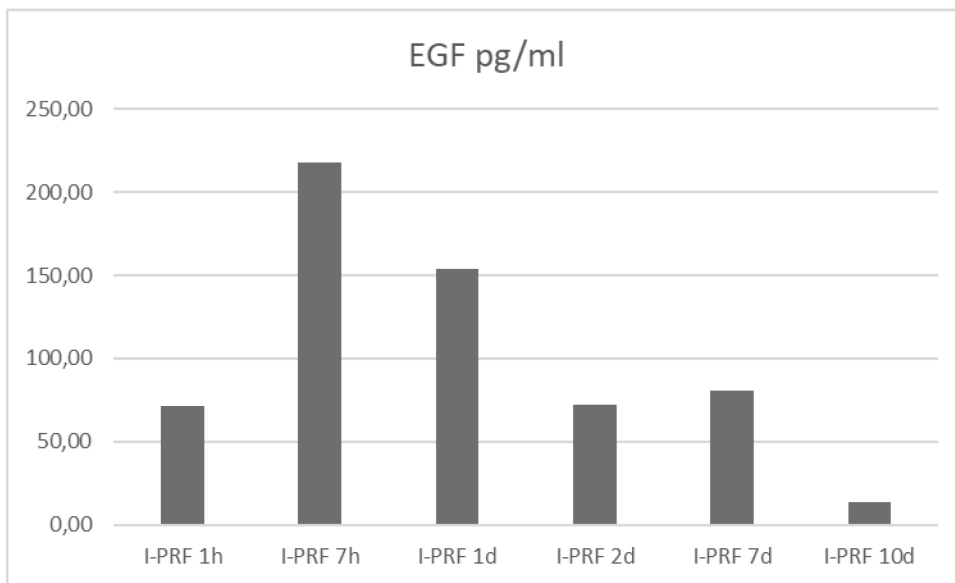


Abbildung 8 EGF pg/ml Mittelwerte für I-PRF

Mittelwerte	EGF pg/ml
I-PRF 1h	71,12
I-PRF 7h	217,87
I-PRF 1d	153,80
I-PRF 2d	72,04
I-PRF 7d	80,53
I-PRF 10d	13,31

Mittelwerte	VEGF pg/ml
I-PRF 1h	88,09
I-PRF 7h	89,91
I-PRF 1d	97,17
I-PRF 2d	90,25
I-PRF 7d	141,87
I-PRF 10d	45,43

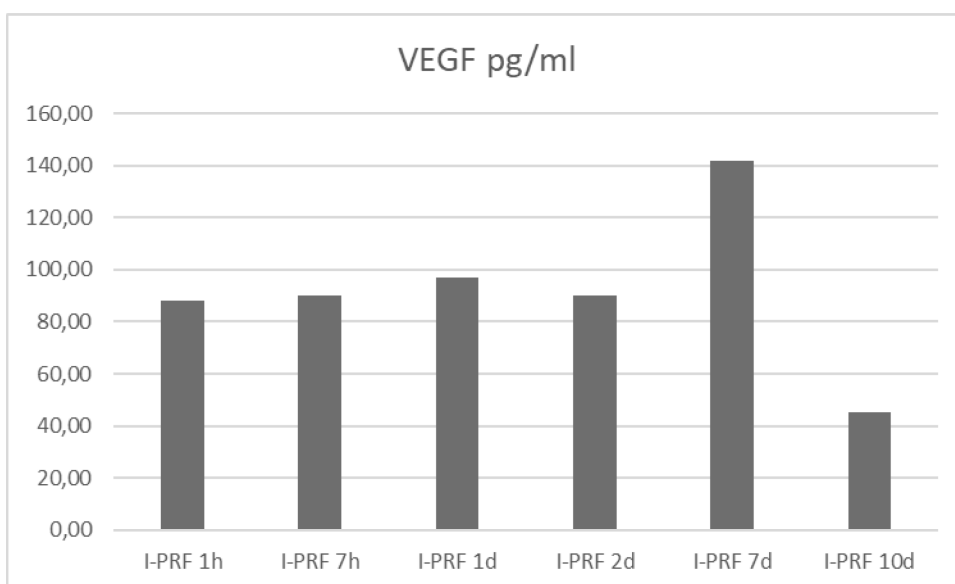


Abbildung 9 VEGF pg/ml Mittelwerte für I-PRF

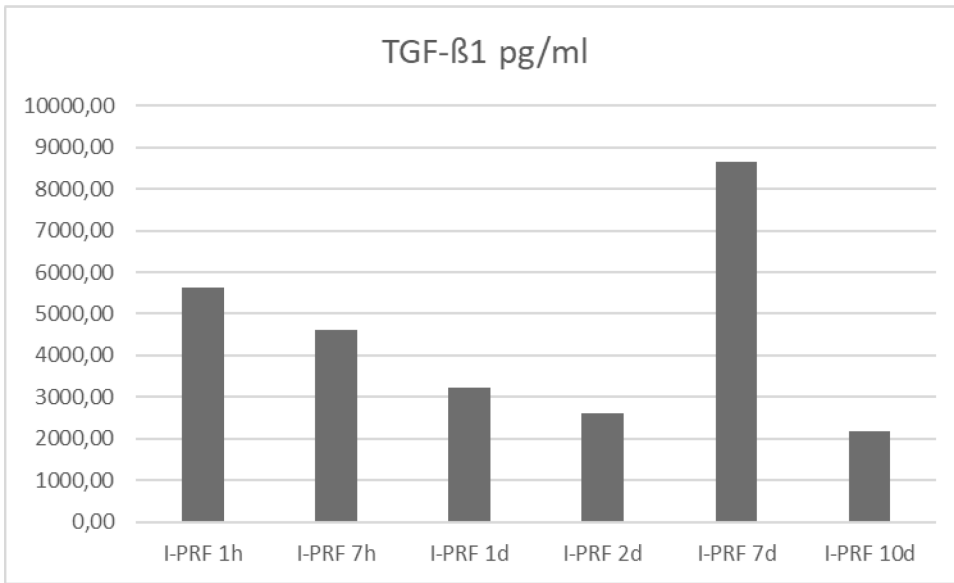


Abbildung 10 TGF-β1 pg/ml Mittelwerte für I-PRF

Mittelwerte TGF-β1 pg/ml	
I-PRF 1h	5618,96
I-PRF 7h	4626,75
I-PRF 1d	3220,42
I-PRF 2d	2601,09
I-PRF 7d	8639,24
I-PRF 10d	2189,03

Mittelwerte PDGF-BB pg/ml	
I-PRF 1h	296,93
I-PRF 7h	191,06
I-PRF 1d	131,13
I-PRF 2d	246,62
I-PRF 7d	740,98
I-PRF 10d	386,46

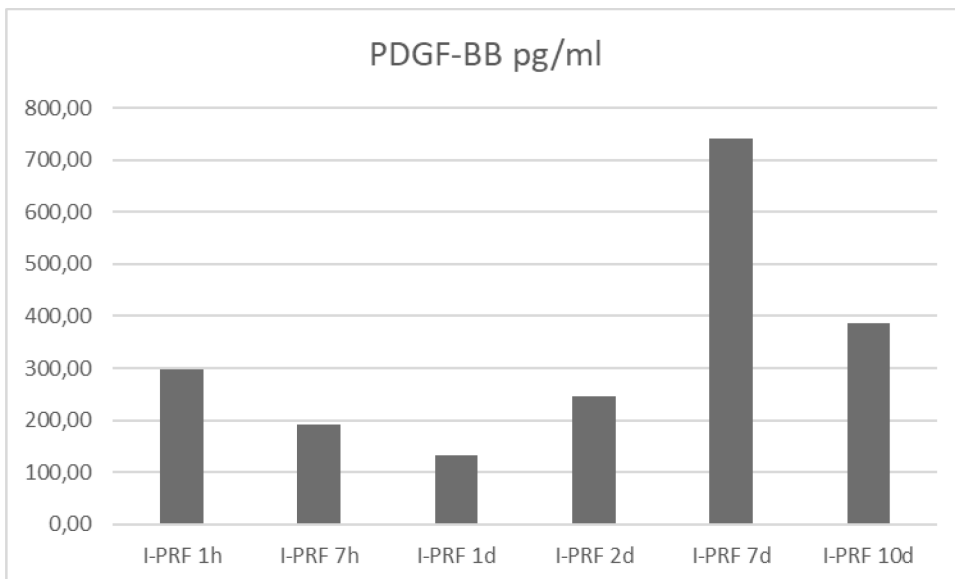


Abbildung 11 PDGF-BB pg/ml Mittelwerte für I-PRF

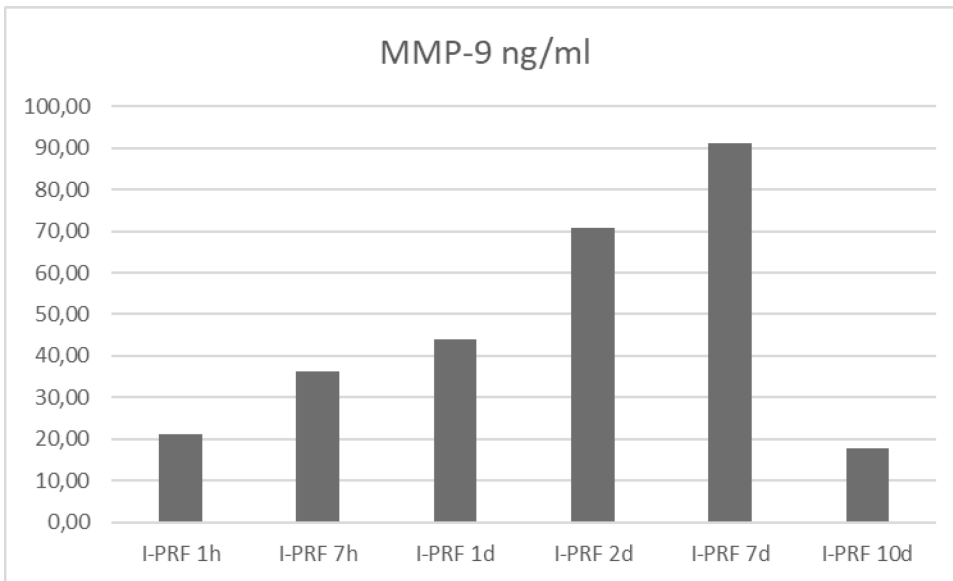


Abbildung 12 MMP-9 ng/ml Mittelwerte für I-PRF

Mittelwerte MMP-9 ng/ml	
I-PRF 1h	21,12
I-PRF 7h	36,13
I-PRF 1d	44,07
I-PRF 2d	70,71
I-PRF 7d	91,17
I-PRF 10d	17,72

Es zeigt sich bei allen untersuchten Faktoren, außer EGF, besonders an Tag sieben ein beträchtlicher Gehalt an Wachstumsfaktoren. Dies lässt auf eine langsame Freisetzung über die Heilungsperiode schließen.

Im Vergleich zu Al-Maawi et al, lassen sich hier grafisch ähnliche Größenordnungen bei VEGF und TGF- β 1 feststellen. EGF ist jedoch entscheidend höher bei Al-Maawi et.al.

3.2.2 Feste Matrix

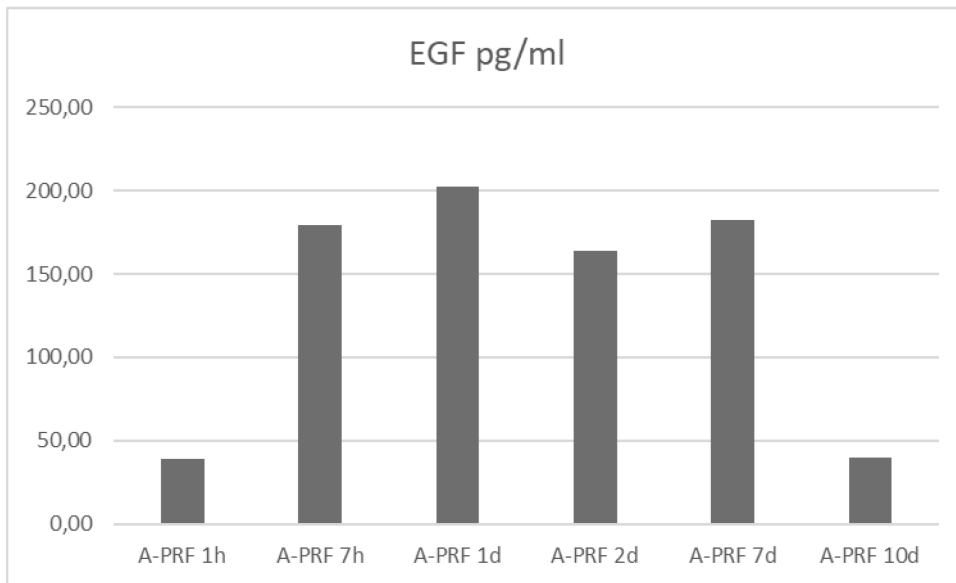


Abbildung 13 EGF pg/ml Mittelwerte für festes PRF

Mittelwerte EGF pg/ml	
A-PRF 1h	38,94
A-PRF 7h	179,66
A-PRF 1d	202,60
A-PRF 2d	164,16
A-PRF 7d	182,30
A-PRF 10d	39,56

Mittelwerte VEGF pg/ml	
A-PRF 1h	110,26
A-PRF 7h	110,38
A-PRF 1d	193,72
A-PRF 2d	214,59
A-PRF 7d	379,79
A-PRF 10d	104,66

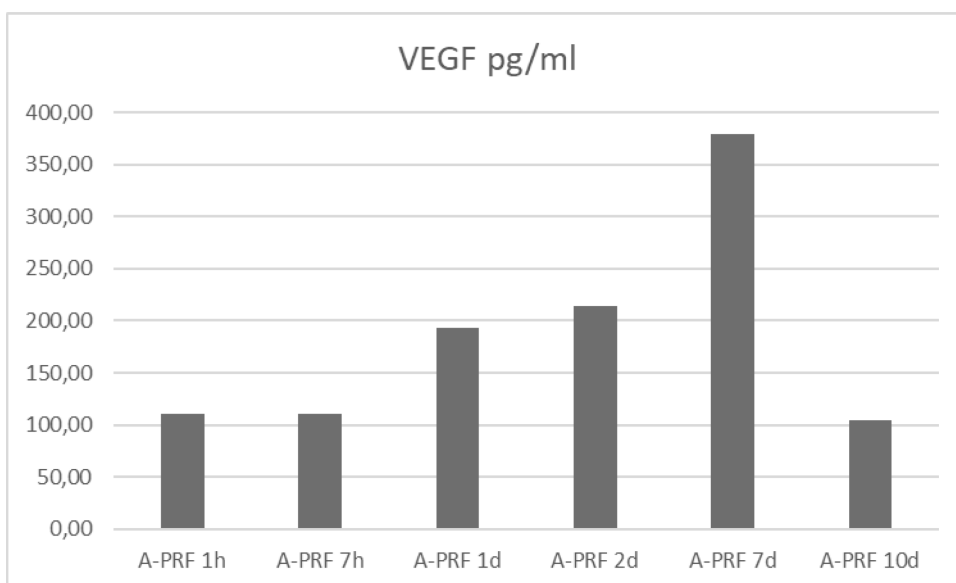


Abbildung 14 VEGF pg/ml Mittelwerte für festes PRF

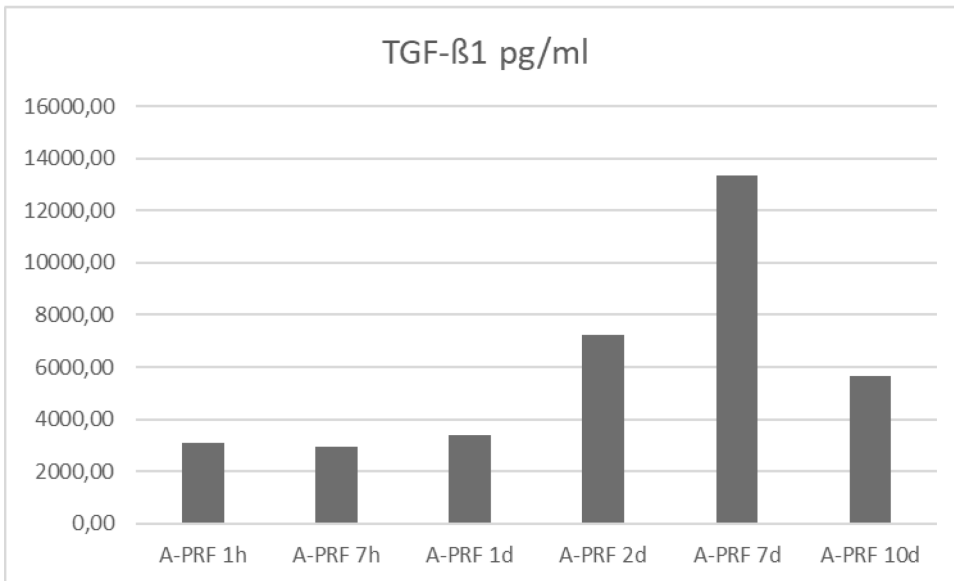


Abbildung 15 TGF-β1 pg/ml Mittelwerte für festes PRF

Mittelwerte TGF-β1 pg/ml		Mittelwerte PDGF-BB pg/ml	
A-PRF 1h	3111,41	A-PRF 1h	238,13
A-PRF 7h	2934,13	A-PRF 7h	119,55
A-PRF 1d	3367,37	A-PRF 1d	78,25
A-PRF 2d	7211,18	A-PRF 2d	69,33
A-PRF 7d	13337,38	A-PRF 7d	280,96
A-PRF 10d	5638,21	A-PRF 10d	114,53

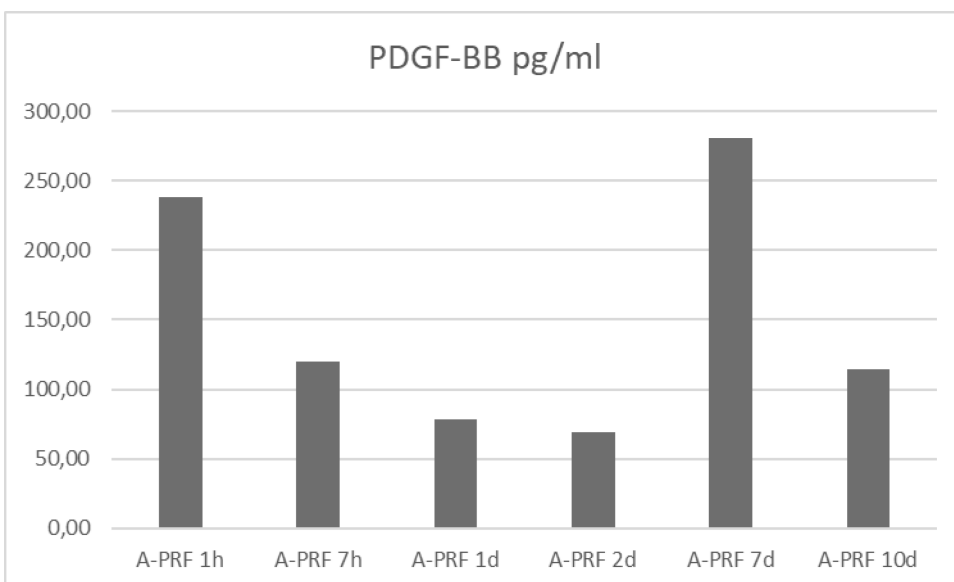


Abbildung 16 PDGF pg/ml Mittelwerte für festes PRF

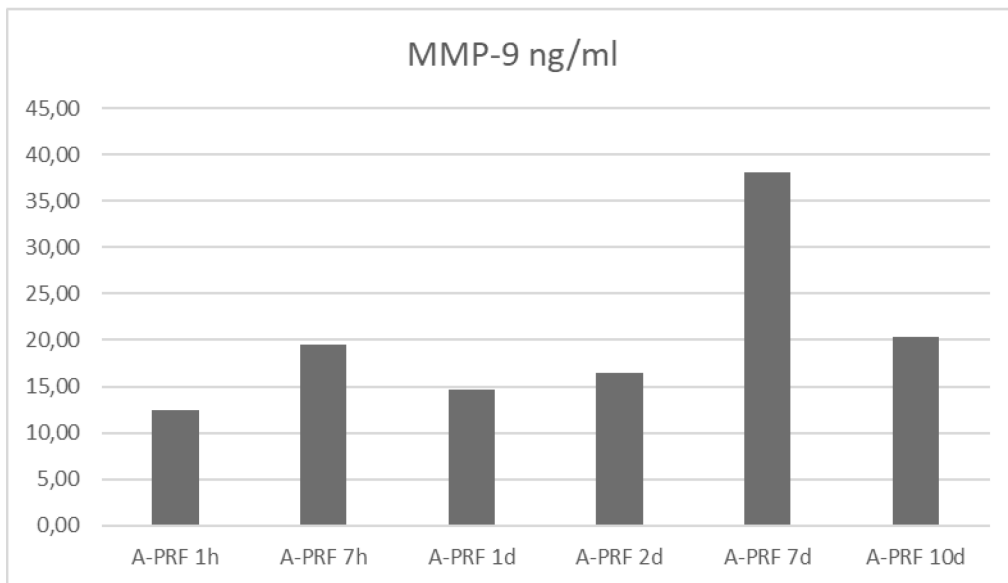


Abbildung 17 MMP-9 ng/ml Mittelwerte für festes PRF

Mittelwerte	MMP-9 ng/ml
A-PRF 1h	12,47
A-PRF 7h	19,55
A-PRF 1d	14,69
A-PRF 2d	16,50
A-PRF 7d	38,11
A-PRF 10d	20,31

Auch bei der Auswertung der festen Form zeigt sich meist ein Anstieg an Tag sieben. Die Grafiken zeigen an allen untersuchten Tagen eine nennenswerte Ausschüttung an ausgewählten Faktoren. Es lässt sich also annehmen, dass die positive Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Wundheilung in den ersten zehn Tagen nach der Applikation vorhanden ist. Auch bei der Vergleichsarbeit steigen die Werte von TGF- β 1 und VEGF am siebten Tag an. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen ist auch der Mittelwert von EGF bei dieser Arbeit vergleichsweise hoch. Insgesamt liegen die Werte für EGF bei Al-Maawi et al. etwa doppelt so hoch wie in unserer Vergleichsstudie. Die Werte für VEGF liegen in etwa in derselben Größenordnung wie bei uns. TGF- β 1 tendiert zu etwas niedrigeren Werten bei unserem Versuch.

4 Diskussion

Wie in der Methode erwähnt, stellen verschiedene Forscher unterschiedliche Produkte mit derselben Grundidee her. Bei der Unterscheidung geht es jedoch nicht um die Herstellung verschiedener Produkte. Die Quintessenz ist es, zu verstehen, dass es sich um eine Therapiemethode handelt, und nicht um ein Produkt, das von Firmen hergestellt und gekauft wird. Um die Herstellung eines körpereigenen Stoffes, welcher wieder im Körper eingesetzt wird. Dies kann mit jeder verstellbaren Zentrifuge geschehen. Je nach Zentrifugen-Einstellung und Größe des Rotors, kann die Beschaffenheit des vom Blut hergestelltem Ergebnisses beeinflusst werden. Es geht nicht vorrangig darum, ein A-PRF oder L-PRF herzustellen. Es geht darum, zu erkennen, mit welchen Bedingungen und Gegebenheiten ÄrztInnen die bestmögliche Beschaffenheit dieses Teils des Blutes erlangen können, welcher dann in das Wundgebiet aufgebracht wird. Denn letztlich streben wir danach, die verwendete Struktur, welche durch eine Zentrifugation entsteht, so zu behandeln, dass sie all jenen Blutbestandteilen, welche eine Rolle in der Wundheilung spielen, eine Unterkunft von höchstem Komfort bietet. Als Struktur wird hier das Fibrin als Matrix definiert. Die Bestandteile unseres Blutes, welche zur Heilung beitragen, sind all die genannten Dinge, welche in Punkt 1.2.1 beschrieben wurden.

Man möchte mit der Anwendung von Plättchen reichen Fibrin eine schnellere Heilung, weniger Schmerzen, weniger Entzündungen, ein geringeres Infektionsrisiko, ein höheres Alveolarknochen-Niveau und einige weitere Vorteile erzielen.(67) Die Vielseitigkeit des PRFs wird durch die Erfahrung in den unterschiedlichsten Bereichen deutlich. Von der Parodontologie über die Implantologie bis hin zur Endodontie wurde Blut der PatientInnen abgenommen, zentrifugiert und wieder in den Körper eingebracht. In den einzelnen Bereichen hat es auf seine Art und Weise zur Wundheilung beigetragen und den natürlichen Heilungsprozess des Körpers beschleunigt. Das Schmerzempfinden der PatientInnen wurde in vielen Fällen gemindert. Eine Kontraindikation für PRF wurde bislang noch nicht nachgewiesen. Es fällt auch schwer Limitationen

hinsichtlich der Verträglichkeit zu finden, da es sich um zusatzstofffreies autologes Material der jeweiligen PatientInnen handelt.

Einschränkungen gibt es jedoch auf wissenschaftlicher Ebene. Es gibt zahlreiche Arbeiten über das Thema. Jedoch liegt die Problematik in der Vergleichbarkeit der Daten. Da keine standardisierten Protokolle vorliegen, war es statistisch zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, eine Korrelation aufzustellen.

Erschwerend zur mangelhaften standardisierten Datenlage kommt hinzu, dass der Zugang zu rohem Datenmaterial sehr eingeschränkt ist. Dies ist leider ein gängiges Problem, welches jedoch besonders in der Zahnheilkunde bereits vermehrt erwähnt wurde. (68)

Die Erarbeitung eines möglichen Protokolls sollte vorrangig auf die Qualität des PRFs abgestimmt werden. Dafür könnte beispielsweise der Gehalt an für die Wundheilung relevanten Wachstumsfaktoren als Qualitätsmerkmal herangezogen werden. Zusätzlich wäre es wünschenswert, dies auch mit entsprechender Praktikabilität für die AnwenderInnen zu kombinieren. Die vielen verschiedenen Anwendungsprotokolle gaben uns die Möglichkeit, Qualität mit Praktikabilität zu vereinen. Darum wurde in der praktischen Versuchsreihe zur Testung eines möglichen Standardprotokolls (nach der Vorlage von Ghanaati, S. et al.) 1200 rpm für acht Minuten (177g) bei einer Rotorgröße von 110mm verwendet.(1) So wurden flüssiges und festes PRF in einem Zentrifugationsvorgang hergestellt. Dieses Vorgehen würde für die Anwendung im klinischen Alltag eine entsprechende Zeitersparnis zur Folge haben. Der RCF-Bereich war im mittleren Bereich. Die einzelnen Nachweise zeigten keine großen Unterschiede zwischen mittleren und niedrigen RCF-Bereich, wie im vorhergehenden Abschnitt bereits erläutert. Zur detaillierten Auswertung bedarf es jedoch einer höheren Fallzahl. Die Grundsteine für eine *Proof-of-Concept* Studie wurden mit einem positiven Ethikvotum und einem bestehenden Studienprotokoll gelegt. Zusätzlich wäre eine Untersuchung auf Qualitätsunterschiede durch bspw. Alter, Nikotinkonsum und Geschlecht klinisch relevant und sinnvoll.

Als *Conclusio* der Arbeit ergibt sich folgendes:

Die Knappheit an einheitlichen Protokollen und Daten erschwert einen Vergleich der verschiedenen Arbeiten. Somit ist es nicht möglich, die Einflussfaktoren eindeutig herauszuarbeiten. Auch die Nennung eines RCF-Referenzbereiches bzw. eines „idealen Protokolls“ war statistisch nicht errechenbar. Hinsichtlich dieser Problemkonstellationen bedarf es weiterer Studien mit standardisierten Protokollen.

Der Einsatz von PRF im klinischen Alltag erweist sich als risikoarm und nebenwirkungsfrei. Das breite Spektrum an Indikationen und der große positive Zuspruch der Methode durch veröffentlichte Arbeiten, lässt eine Empfehlung für die Anwendung von PRF durchaus zu.

Das im Rahmen der Diplomarbeit erprobte Studienprotokoll (1) war durchführbar und lieferte vergleichbare Ergebnisse. Einer Studie mit größerer Fallzahl sollte in Hinblick darauf nichts im Weg stehen.

5 Literaturverzeichnis

1. 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. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018 Feb 1;44(1):87–95.
2. Statistik Austria. Österreichische Gesundheitsbefragung 2014 Fragebogen. 2014. 12 p.
3. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1913–27.
4. 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 Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):56–60.
5. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar Ridge and Sinus Augmentation Utilizing Platelet-Rich Plasma in Combination With Freeze-Dried Bone Allograft: Case Series. *J Periodontol*. 2000;71(10):1654–61.
6. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 2009;91-B(8):987–96.
7. 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. *J Oral Implantol*. 2014;40(4):511–21.
8. Lee KS, Wilson JJ, Rabago DP, Baer GS, Jacobson JA, Borrero CG. Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: Fad or future? *Am J Roentgenol*. 2011;196(3):628–36.
9. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Rahul Marshal V. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent*. 2013;16(4):284–93.
10. Kamionka M. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia*

- coli. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(2):268–74.
11. Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology*. 2015;103(2):126–35.
 12. Kiefel V. Reactions induced by platelet transfusions. *Transfus Med Hemotherapy*. 2008;35(5):354–8.
 13. Anitua E, Sánchez M, Orive G. The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not. *J Shoulder Elb Surg*. 2011;20(1):23–4.
 14. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3).
 15. Chenchev IL, Ivanova V V., 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 Med (Plovdiv)*. 2017;59(3):362–6.
 16. 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). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017;1–13.
 17. Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, et al. Fifteen years of platelet rich fibrin in dentistry and oromaxillofacial surgery: How high is the level of scientific evidence? *J Oral Implantol*. 2018;44:471–92.
 18. Liu Y, Sun X, Yu J, Wang J, Zhai P, Chen S, et al. Platelet-Rich Fibrin as a Bone Graft Material in Oral and Maxillofacial Bone Regeneration: Classification and Summary for Better Application. *Biomed Res Int*. 2019;2019.
 19. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol*. 2010;81(4):546–55.
 20. Italiano JE, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: The birth of

- platelets. *J Thromb Haemost.* 2003;1(6):1174–82.
21. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20(9):2353–60.
 22. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101(3).
 23. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso M Del, 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.
 24. Wend S, Kubesch A, Orłowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28(12).
 25. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol.* 2013;35(3):254–61.
 26. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. 4th ed. Kiel & Erlangen; 2012. 280–293, 304–322 p.
 27. Horn F. Biochemie des Menschen. 5th ed. Innsbruck; 2012. 593–609; 526–532; 621 p.
 28. Zrnc TA, Metzler P, Zemmann W, Ghanaati S. PRF in der Zahnmedizin. 2018;128:712–3.
 29. Deutzmann, Joachim Rasso Karin, Hauser Roland NR. Duale Reihe Biochemie. 4. Auflage. Biochemie DR, editor. Stuttgart: Thieme; 2016.
 30. 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 [Internet].* 2017 Feb [cited 2019 Oct 6];23(1):83–99. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2016.0233>
 31. Javed F, Al-askar M, Al-rasheed A, Al-hezaimi K. Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. *Arch Oral*

- Biol [Internet]. 2011;56(12):1476–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.06.020>
32. Niu Y, Li Q, Ding Y, Dong L, Wang C. Engineered delivery strategies for enhanced control of growth factor activities in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2019;146:190–208. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.002>
 33. Strobel S, Literaturübersicht E, Strobel S. Der Einfluss von Matrix-Metallo - proteinasen und - Chlorhexidin auf den adhäsiven Verbund. 2015;125:141–5.
 34. Herbert F. Wolf, Edith M. Rateitschak KHR. *Parodontologie*. 3. Auflage. Verlag GT, editor. Stuttgart; 2004.
 35. Stefan Silbernagl, Agamemnon Despopoulos jr. AD. *Taschenatlas Physiologie*. 9th ed. Vol. 9. Stuttgart; 2018. 106–125 p.
 36. Feigin K, Shope B. Use of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Dentistry and Oral Surgery: Introduction and Review of the Literature. *J Vet Dent*. 2019;36(2):109–23.
 37. Gey MH. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 3.Auflage. Springer-Lehrbuch; 2015. S. 402 ff.
 38. Boora P, Rathee M, Bhoria M. Effect of Platelet Rich Fibrin (PRF) on peri-implant soft tissue and crestal bone in one-stage implant placement: A randomized controlled trial. *J Clin Diagnostic Res*. 2015;9(4):ZC18–21.
 39. Sharma A, Pradeep AR. Autologous Platelet-Rich Fibrin in the Treatment of Mandibular Degree II Furcation Defects: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol* [Internet]. 2011;82(10):1396–403. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2011.100731>
 40. Moraschini V, Barboza E dos SP. Use of Platelet-Rich Fibrin Membrane in the Treatment of Gingival Recession: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol* [Internet]. 2016;87(3):281–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2015.150420>
 41. Simonpieri A, Choukroun J, Corso M Del, Sammartino G, Ehrenfest DMD. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: A six-year experience. *Implant Dent*. 2011;20(1):2–12.
 42. 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. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1207–30.
43. Chakravarthi S. Platelet rich fibrin in the management of established dry socket. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2017;43(3):160.
 44. Sharma A, Aggarwal N, Rastogi S, Choudhury R, Tripathi S. Effectiveness of platelet-rich fibrin in the management of pain and delayed wound healing associated with established alveolar osteitis (dry socket). *Eur J Dent [Internet].* 2017 [cited 2019 May 14];11(4):508–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29279679>
 45. Dincă O, Zurac S, Stăniceanu F, Bucur MB, Bodnar DC, Vlădan C, et al. Clinical and histopathological studies using fibrin-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(3):961–4.
 46. Soydan SS, Uckan S. Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a platelet-rich fibrin membrane: Technical report. *J Oral Maxillofac Surg [Internet].* 2014;72(2):322–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2013.07.027>
 47. Yelamali T, Saikrishna D. Role of Platelet Rich Fibrin and Platelet Rich Plasma in Wound Healing of Extracted Third Molar Sockets: A Comparative Study. *J Maxillofac Oral Surg [Internet].* 2015;14(2):410–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12663-014-0638-4>
 48. Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, et al. Fifteen Years of Platelet Rich Fibrin in Dentistry and Oromaxillofacial Surgery: How High is the Level of Scientific Evidence? *J Oral Implantol.* 2018;44(6):471–92.
 49. Kotsakis GA, Boufidou F, Hinrichs JE, Prasad HS, Rohrer M, Tosios KI. Extraction socket management utilizing platelet rich fibrin: A proof-of-principle study of the “accelerated-early implant placement” concept. *J Oral Implantol.* 2016;42(2):164–8.
 50. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A

- systematic review. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 6];44(2):225–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27891638>
51. Pan J, Xu Q, Hou J, Wu Y, Liu Y, Li R, et al. Effect of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation: A systematic review. *J Am Dent Assoc* [Internet]. 2019;150(9):766–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31439204>
52. 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. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1231–56.
53. Starch-Jensen T, Jensen JD. Maxillary Sinus Floor Augmentation: a Review of Selected Treatment Modalities. *J Oral Maxillofac Res* [Internet]. 2017;8(3):1–13. Available from: <http://www.ejomr.org/JOMR/archives/2017/3/e3/v8n3e3ht.htm>
54. Öncü E, Kaymaz E. Assessment of the effectiveness of platelet rich fibrin in the treatment of Schneiderian membrane perforation. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2017;19(6):1009–14.
55. Zumarán CC, Parra M V., Olate SA, Fernández EG, Muñoz FT, Haidar ZS. The 3 R's for platelet-rich fibrin: A “super” tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration. *Materials (Basel)*. 2018;11(8).
56. Murray PE. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6(October).
57. Miron RJ, Pinto NR, Quirynen M, Ghanaati S. Standardization of relative centrifugal forces in studies related to platelet-rich fibrin. *J Periodontol*. 2019;90(8):817–20.
58. Wend S, Kubesch A, Orlowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Dec 1;28(12).

59. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016 Dec 1;20(9):2353–60.
60. 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. *J Periodontol*. 2017 Jan;88(1):112–21.
61. Blatt S, Burkhardt V, Kämmerer PW, Pabst AM, Sagheb K, Heller M, et al. Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2020 Feb 6 [cited 2020 Feb 18]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00784-020-03213-8>
62. Cabaro S, D'Esposito V, Gasparro R, Borriello F, Granata F, Mosca G, et al. White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. *Platelets* [Internet]. 2018;29(5):463–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2017.1319046>
63. Thanasrisuebwong P, Surarit R, Bencharit S, Ruangsawasdi N. Influence of fractionation methods on physical and biological properties of injectable platelet-rich fibrin: An exploratory study. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).
64. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araújo RF, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig*. 2019 Mar 8;23(3):1309–18.
65. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. *Clin Oral Investig*. 2020;24(3):1171–82.
66. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C DE, Zrnc TA, Parvini P, Schwarz F et al. Homogeneous pressure influences the growth factor release profiles in solid platelet- rich fibrin matrices and enhances vascular endothelial growth factor release in the solid platelet- rich fibrin plugs. *Int J Growth Factors Stem Cells Dent* [Internet]. 2018;1:8–16. Available from: www.cellsindentistry.org
67. Kumar YR, Mohanty S, Verma M, Kaur RR, Bhatia P, Kumar VR, et al. Platelet-rich fibrin: The benefits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016;54(1):57–

- 61.
68. Vidal-Infer A, Tarazona B, Alonso-Arroyo A, Aleixandre-Benavent R. Public availability of research data in dentistry journals indexed in Journal Citation Reports. *Clin Oral Investig.* 2018;22(1):275–80.

Anhang -Projektplan

Einfluss von Geschlecht, Alter und Nikotinkonsum auf den Wachstumsfaktorengehalt in Plättchenreichem Fibrin

Eine prospektive Pilotstudie an 40 PatientInnen

Principle Investigator: Univ.Prof. Dr.med. Peter Schlenke

Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und
Transfusionsmedizin

Sponsor: Univ.-Prof. Dr.med.univ. Dr.med.dent. Norbert Jakse

Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit
Klinische Abteilung für Orale Chirurgie und Kieferorthopädie

Klinische Mitarbeiter:

- Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Dr.med.dent.et scient.med. Michael Payer

1583 Klin. Abteilung für Orale Chirurgie und Kieferorthopädie

- Ko-Betreuer: Univ.-Ass. Dr.med. Dr. med. dent. Tomislav Ante Zrnc

1586 Klin. Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
8036 Graz, Auenbruggerplatz 5/6

- DiplomandIn: Katharina Zwitnig

Inhaltsverzeichnis

1	Wissenschaftlicher Hintergrund.....	57
2	Ziel	59
3	PatientInnen	60
4	Zielgrößen (Endpunkte).....	60
4.1	Hauptzielgrößen.....	60
4.2	Nebenzielparameter.....	61
5	Methodik.....	61
6	Statistik.....	61
6.1	Geplante Auswertung.....	61
6.2	Fallzahlplanung:.....	62
7	Datenschutz	63
8	Nutzen-Risiko Evaluierung.....	63
9	Referenzen.....	64

1 Wissenschaftlicher Hintergrund

In den letzten Jahren hat die Zahl an Publikationen und Berichten über die Anwendung von platelet-rich fibrin (PRF) in der Zahnmedizin stark zugenommen (Choukroun et al. 2006). Die einfache Möglichkeit zur chair-side Herstellung und die propagierten positiven Eigenschaften, die PRF zugeschrieben werden, lassen es zur Anwendung für vielfältigste zahnmedizinische Indikationen geeignet erscheinen. Standardisierte klinische Untersuchungen, die zur Anwendung von PRF klare Empfehlungen zulassen würden, stehen jedoch größtenteils noch aus. Ebenso wenig gibt es bislang genaue Untersuchungen über altersabhängige und interindividuelle Unterschiede in Hinblick auf Inhaltsstoffe des PRF. Das körpereigene und zusatzstofffreie Produkt erwies sich bislang als risikoarm und nebenwirkungsfrei für den Patienten. Neben dem positiven Einfluss auf die Weichgewebs- und Knochenregeneration, soll das thrombozytenreiche Fibrin auch das Risiko postoperativer Infektionen minimieren, was eventuell auf die hohe Leukozytenkonzentration in PRF zurückzuführen ist. Analog stimuliert es die Angiogenese im Operationsgebiet. Um die Verwendung von PRF in der Zahnheilkunde etablieren zu können, ist jedoch eine genaue Kenntnis der Zusammensetzung unerlässlich. Hierfür soll in einer prospektiven Untersuchung in Kooperation zwischen der Univ. Klinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit und der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin aus dem Blut von ca. 40 anonymisierten, gesunden Probanden (BlutspenderInnen & StudentInnen) PRF gewonnen werden und anhand des Protokolls von Choukroun et. al. untersucht werden. Für A-PRF wird Blut in 10ml Röhrchen aus Kunststoff entnommen und

zentrifugiert. Nun bildet sich an der obersten Stelle des Röhrchens azelluläres Plasma, darunter Fibrin und am Boden des Röhrchens Erythrozyten. Nun wird der Erythrozytenpfropf abgetrennt und das Fibrin kann verwendet werden. I-PRF wird in Glasröhrchen ebenso bei 1200 rpm 8min zentrifugiert. Dann wird der flüssige Teil mittels Kanüle und Spritze aufgezogen und kann verwendet werden. Das Blut teilt sich nach der Zentrifugierung mit Mectron „Choukroun PRF Duo Starter System PRF1020F“ in die Bestandteile auf. Ziel ist es, einen hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren (PDGF [Gefäßneubildung wird gefördert], EGF [Kollagenbildung und Hautzellwachstum wird forciert], VEGF, MMP-9, TGFβ [Zellwachstum und Knochenmetabolismus steigen], Platelet-Derived-Angiogenesis Factor Vaskularisationsstimulation], Fibrin und Fibronectin [für die Lokalisation der Wachstumsfaktoren]) zu erhalten. Dies ist je nach Beschaffenheit des Röhrchens sowohl in solider als auch in flüssiger Form möglich.

Mittels der geplanten Untersuchung soll festgestellt werden, mit welchen Konzentrationen die jeweiligen Wachstumsfaktoren in flüssiger(I-PRF) sowie membranöser Form (A-PRF) zu rechnen ist. Es handelt sich um ein Proof of Concept der unten genannten Vergleichsstudie.

Zusätzlich werden wir im Zuge der Untersuchung mögliche Unterschiede bei Nikotinabusus und Geschlecht erheben.

Nachdem PRF in verschiedensten Indikationen Anwendung findet und ein möglicher Alterseinfluss im Hinblick der PRF Inhaltsstoffe untersucht werden soll, werden die Blutabnahmen bei Patienten verschiedensten Alters (zwischen 18 und 65 Jahren) durchgeführt.

Die Konzentration der Wachstumsfaktoren ist ein unmittelbarer Indikator für die Wirksamkeit der Anwendung des plättchenreichem Fibrin in der zahnärztlichen Chirurgie. Die Untersuchung soll Aufschluss darüber geben, ob der Gehalt an Wachstumsfaktoren im Blut von Rauchern wesentlich geringer ist. Über diese Information ist es klarer ersichtlich, ob eine Anwendung von PRF bei Rauchern zielführend ist oder ob von dieser Methode bei Rauchern oder Patienten höheren Alters abzusehen ist.

-Vergleichsstudie:

Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C, Dohle E,
Zrnc TA, Parvini P, Schwarz F, *et al.* Homogeneous pressure influences the growth factor release profiles in solid platelet-rich fibrin matrices and enhances vascular endothelial growth factor release in the solid platelet-rich fibrin plugs. Int J Growth Factors Stem Cells Dent 2018;1:8-16.

- *Mit der Studie erfasst man die Qualität von PRF in flüssiger und fester Form und implementiert die Anwendung an der Univ. Klinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit Graz. Weiters kann somit ein einheitliches Protokoll für unsere Abteilung standardisiert werden.*

2 Ziel

Ziel der Studie ist es, herauszufinden, ob die Ergebnisse der Vergleichsstudie ähnliche oder gleiche Resultate zeigen. Weiters wird untersucht, ob ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen TeilnehmerInnen bzw. RaucherInnen und NichtraucherInnen festzustellen ist.

3 PatientInnen

Beschreibung des PatientInnenkollektivs:

Einschlusskriterien:

Gesunde PatientInnen zwischen 20 und 65 Jahren

20 männliche Teilnehmer

20 weibliche Teilnehmerinnen

Davon jeweils 10 RaucherInnen (>10 Zigaretten pro Tag) und 10

NichtraucherInnen (seit > 1 Jahr)

Ausschlusskriterien:

Antikoagulantieneinnahme

Diabetes mellitus (insulinpflichtig)

Schwangere Frauen

Systemische Autoimmunerkrankungen

Aktuelle systemische Grunderkrankungen (Medikamentenanamnese)

Die Rekrutierung erfolgt über eine Anfrage per Mail an Mitarbeiter und

Studierende der Universitätsklinik für Transfusionsmedizin und

Blutgruppenserologie sowie der Universitätsklinik für Zahnmedizin und

Mundgesundheit.

4 Zielgrößen (Endpunkte)

4.1 Hauptzielgrößen

Gehalt der Wachstumsfaktoren (Epidermal growth factor, Transforming growth factor- β 1 und Vascular endothelial growth factor) gemessen mit ELISA.

4.2 Nebenzielparameter

- Gibt es einen Unterschied des Wachstumsfaktorengehalts zwischen RaucherInnen und NichtraucherInnen?
- Gibt es einen Unterschied hinsichtlich des Geschlechts?

5 Methodik

Die Probanden, welche unabhängig von der Studie im Zuge einer freiwilligen Blutspende auf die Universitätsklinik für Transfusionsmedizin kommen bzw. freiwillige Studierende, werden um eine Blutabnahme von 20ml gefragt. Das Blut wird dann zentrifugiert (1200rpm für 8min) und nach etwa einer halben Stunde in ein Nährmedium eingebracht und bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (nach 1h, 7h, 1d, 2d, 7d & 10d) werden die Überstände eingefroren und das PRF mit frischem Medium beträufelt. Am Ende werden die Ergebnisse in der Abteilung mittels ELISA analysiert. Das patientenführende Zentrum ist die Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin in Zusammenarbeit mit den klinischen Abteilungen für Orale Chirurgie und Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie.

6 Statistik

6.1 Geplante Auswertung

Die Auswertung erfolgt mittels deskriptiver Statistik. Folgende Variablen werden ausgewertet:

Wachstumsfaktoren (EGF, VEGF, TGF- β 1)

Geschlecht

Raucherstatus

6.2 Fallzahlplanung

Aus der Arbeit *"Homogeneous Pressure Influences the Growth Factor Release Profiles in Solid Platelet-rich Fibrin Matrices and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor Release In The Solid Platelet-rich Fibrin Plugs"* wurden folgende entnommen:

Wachstumsfaktoren nach 10 Tagen (*nonpressed matrix*):

VEGF (pg/ml):	585,1 (SD 64,6)
TGF- β 1 (pg/ml):	51184,6 (SD 5620,1)
EGF (pg/ml):	2013,8 (SD 261,8)

Es handelt sich bei den Patienten um Nichtraucher, bei Rauchern wird von einer reduzierten Freisetzung an Wachstumsfaktoren von ca. 20 % ausgegangen.

Daraus ergeben sich bei 80% Power und 5% Signifikanzniveau folgende Fallzahlen abhängig vom Parameter:

VEGF (pg/ml):	6 pro Gruppe
TGF- β 1 (pg/ml):	6 pro Gruppe
EGF (pg/ml):	8 pro Gruppe

Männer und Frauen werden getrennt ausgewertet, daher wird die doppelte Anzahl an Patienten eingeplant.

7 Datenschutz

Alle Probanden werden mit einer fortlaufenden Nummer codiert (pseudonymisiert). Die Daten werden nur mit diesem Code versehen und mittels *Excel und SPSS ausgewertet*. Sie werden auf einem PC mit Zugriffsbeschränkung an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin sowie der Universitätsklinik für Zahnmedizin und Mundgesundheit gespeichert und anschließend bearbeitet.

Nur autorisierte Personen haben Zugriff auf die Originaldaten.

8 Nutzen-Risiko Evaluierung

Die eingeschlossenen Probanden haben keinen direkten Nutzen von der Studie.

Obwohl es sich um eine prospektive Studie handelt, ist kein Risiko zu erwarten. Die Blutabnahme erfolgt im Zuge der freiwilligen Blutabnahme von Studierenden und Blutspendern. Die Teilnehmer werden diesbezüglich über mögliche Risiken und Nebenwirkung (Hämatombildung, Rötung an der Entnahmestelle Schmerzen während der Blutabnahme, Schwindel, Unwohlsein) aufgeklärt.

Ein mögliches Risiko, das Bekanntwerden der sensiblen Teilnehmerdaten, wird durch die Pseudonymisierung und Zugriffsbeschränkung minimiert.

Die Ergebnisse dieser Studie können als Grundlage zur Hypothesengenerierung für weitere Studien dienen.

9 Referenzen

- 1 Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1913–27.
- 2 Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing Joseph Choukroun MD^a, Antoine Diss DDS, MS^b, Alain Simonpieri DDS^c, Marie-Odile Girard DDS^c, Christian Schoeffler DDS^c, Steve L. Dohan^d, Anthony J.J. Dohan^e, Jaafar Mouhyi DDS, PhD^f, David M. Dohan DDS, MS
- 3 El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orlowska 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). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2017;1–13
- 4 Zrnc TA, Metzler P, Zemmann W GS. PRF in dentistry – a short synopsis about implementation and workflow. *Swiss Dent J*. 2018;
- 5 Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3).
- 6 Ghanaati S, Herrera-Vizcaino C, Al-Maawi S, Lorenz J, Miron RJ, Nelson K, et al. Fifteen years of platelet rich fibrin (PRF) in dentistry and oromaxillofacial surgery: How high is the level of scientific evidence? *J Oral Implantol* [Internet]. 2018;aaid-joi-D-17-00179. Available from: <http://www.joionline.org/doi/10.1563/aaid-joi-D-17-00179>