

Aus der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Dr. Sieg

**In vitro Studie zur Wirkung des Platelet-
Rich Plasma (PRP) und Platelet-Rich
Fibrin (PRF) auf die Zellmigration und
-adhäsion an Titanoberflächen unter
Einfluss der antiresorptiven
Bisphosphonat-Therapie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- **Aus der Sektion Medizin-**

vorgelegt von
Nele Herbst
aus **Düsseldorf**

Lübeck, 2025

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Christoph Frohn

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.04.2026

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Zellen des Knochens.....	1
1.2 Rolle der Wachstumsfaktoren bei der Knochenremodellierung.....	3
1.3 Bisphosphonate	4
1.3.1 Chemische Struktur und Gruppeneinteilungen	4
1.3.2 Wirkmechanismus	5
1.3.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen.....	7
1.3.4 Zoledronsäure.....	8
1.4 Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (BRONJ).....	9
1.4.1 Definition und Symptome.....	9
1.4.2 Pathogenese.....	10
1.4.3 Stadienabhängige Therapie der BRONJ	11
1.5 Die Thrombozytenderivate PRP und PRF.....	13
1.6 Nutzung von PRP und PRF beim Gebrauch von endossalen Implantaten.....	14
1.7 Ziele der vorliegenden Dissertation	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Verwendete Materialien.....	16
2.1.1 Zelllinien	16
2.1.2 Zellkulturmedien	16
2.1.3 Geräte.....	17
2.1.4 Chemikalien und Lösungen	18
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.6 Kits.....	20
2.1.7 Software	20
2.2 Verwendete Methoden	21
2.2.1 Zellbiologische Methoden	21
2.2.2 Vorversuche.....	23
2.2.3 Hauptversuche.....	30

2.2.4	Statistische Evaluation.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Vorversuche	36
3.1.1	ELISA-Tests zur Messung der Wachstumsfaktoren bei den unterschiedlichen Inkubationsmethoden von PRP und PRF.....	36
3.1.2	RTCA zur Bestimmung der Zellzahlen und Konzentrationen an PRP und PRF.....	42
3.1.3	Austestung der Konzentrationen für PRP und PRF	43
3.2	Hauptversuche	45
3.2.1	RCTA.....	45
3.2.2	Migrationsassay.....	47
3.2.3	MTT-Test	49
3.2.4	Implantatversuch	51
4	Diskussion	55
4.1	Ausschüttung von Wachstumsfaktoren bei den verschiedenen Inkubationsmethoden zur Herstellung von PRP und PRF.....	55
4.2	Die Wirkung der Konzentration der Thrombozytenderivate	60
4.3	Die Wirkung von PRP und PRF auf die Migration und Proliferation von mit Bisphosphonat behandelte Zellen	61
4.4	Die Anhaftung von Osteoblasten an enossale Implantate unter Bisphosphonattherapie und dem Einfluss von PRP und PRF.....	62
4.5	Die Vor- und Nachteile der Nutzung von PRP gegenüber PRF	64
4.6	Die Stellung von Thrombozytenkonzentraten in der Behandlungsstrategie der BRONJ.....	65
5	Fazit.....	67
5.1	Zusammenfassung.....	67
5.2	Ausblick.....	68
6	Literaturverzeichnis.....	70
7	Anhang	82
7.1	Wertetabellen des Ergebnisteils	82
7.2	Ethikantrag	86
8	Danksagung.....	87

Abkürzungsverzeichnis

BMP 7	Bone Morphogenetic Protein 7
BRONJ	Bisphosphonate related Osteonecrosis of the Jaw ($\hat{=}$ Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fetales Kälberserum
KI	Konfidenzintervall
NK	Negativkontrolle
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PK	Positivkontrolle
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PRF	Platelet-Rich Fibrin
PRP	Platelet-Rich Plasma
RTCA	Real Time Cell Analyzer
TGF- β 1	Transforming Growth Factor beta 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZA	Zoledronic Acid ($\hat{=}$ Zoledronsäure)
ZI	Zellindex

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht aufgeführt. Weiterführend werden die international standardisierten SI-Einheiten verwendet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellen des Knochens	2
Abbildung 2: Chemische Struktur von Pyrophosphat und Bisphosphonaten.....	5
Abbildung 3: Eingriff der Bisphosphonate in den Mevalonatstoffwechsel.....	6
Abbildung 4: Klinische und radiologische Darstellung einer BRONJ	10
Abbildung 5: Stadien der BRONJ	11
Abbildung 6: Herstellung von Thrombozytenkonzentrat aus humanem Vollblut....	24
Abbildung 7: Flussdiagramm zur Herstellung von PRP und PRF	26
Abbildung 8: Impedanzmessung des Real-Time Cell Analyzers (RTCA)	29
Abbildung 9: Durchführung des Migrationsassays	33
Abbildung 10: VEGF-Anteil in PRP und PRF	38
Abbildung 11: PDGF-BB-Anteil in PRP und PRF	39
Abbildung 12: TGF- β 1-Anteil in PRP und PRF.....	41
Abbildung 13: Zellindex der Fibroblasten unter Optimalbedingungen	42
Abbildung 14: Zellindex der Osteoblasten unter Optimalbedingungen	43
Abbildung 15: Der Effekt von PRP und PRF in verschiedenen Konzentrationen auf den Zellindex (ZI) der Fibroblasten.....	44
Abbildung 16: Der Effekt von PRP und PRF in verschiedenen Konzentrationen auf den Zellindex (ZI) der Osteoblasten	45
Abbildung 17: Proliferation der Fibroblasten im RTCA-Versuch.....	46
Abbildung 18: Proliferation der Osteoblasten im RTCA-Versuch	47
Abbildung 19: Migrationsassay der Fibroblasten.....	48
Abbildung 20: Migrationsassay der Osteoblasten	49
Abbildung 21: MTT-Test der Fibroblasten	50
Abbildung 22: MTT-Test der Osteoblasten.....	51
Abbildung 23: Wash-Assay der Osteoblasten nach 24 Stunden	52
Abbildung 24: Elektronenmikroskopie der Osteoblasten auf den enossalen Implantaten.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	16
Tabelle 2: Zellkulturmedien	16
Tabelle 3: Geräte.....	17
Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen	18
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 6: ELISA-Kits	20
Tabelle 7: Software	20
Tabelle 8: Auflistung der verschiedenen Inkubationsmethoden mit der jeweiligen Zusammensetzung.....	31
Tabelle 9: Semiquantitative Auswertung der Osteoblasten in der Rasterelektronenmikroskopie	53
Tabelle 10: VEGF-Anteil in PRP und PRF	82
Tabelle 11: PDGF-BB-Anteil in PRP und PRF	82
Tabelle 12: TGF- β 1-Anteil in PRP und PRF.....	83
Tabelle 13: Zellproliferation der Fibroblasten im RTCA.....	83
Tabelle 14: Zellproliferation der Osteoblasten im RTCA	83
Tabelle 15: Migrationsassay der Fibroblasten.....	84
Tabelle 16: Migrationsassay der Osteoblasten.....	84
Tabelle 17: MTT-Tests bei Fibroblasten.....	84
Tabelle 18: MTT-Tests bei Osteoblasten	85

1 Einleitung und Fragestellung

Die Bisphosphonattherapie gilt als wichtiger Therapiepfeiler bei resorptiven Knochenerkrankungen wie Knochenmetastasen oder Osteoporose, da diese Medikamente dem Knochenabbau entgegenwirken. Als Nebenwirkung bei Nutzung von Bisphosphonaten ist die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (kurz BRONJ für engl. Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw) zu nennen. Es kommt hierbei vermehrt zu freiliegendem Knochen, rezidivierenden bakteriellen Entzündungen und somit zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität der Patienten. (Marx, 2003)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der möglichen Ausweitung der Therapieoptionen der BRONJ auf die topische Nutzung von Thrombozytenderivaten, um eine effektivere Therapie zu etablieren.

Zur Einordnung der Thematik erfolgt in diesem Kapitel eine Darstellung der wissenschaftlichen Grundlagen. Zunächst werden dem Leser die Grundbausteine des Knochenaufbaus und der Knochenremodellierung vermittelt. Darauf aufbauend wird die medikamentöse Therapie mit Bisphosphonaten bei Knochenerkrankungen inklusive der für diese Arbeit relevanten Nebenwirkung der Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose des Kiefers erläutert. Ferner erfolgt eine Darstellung des gegenwärtigen Literaturstandes zur Therapie einer BRONJ mit Thrombozytenderivaten.

1.1 Zellen des Knochens

Knochen gilt als wichtiger, fester Bestandteil des menschlichen Bewegungsapparates und macht ca. 15% der menschlichen Körpermasse aus. Dabei dient er als Stütz- und Fortbewegungsorgan, als Schutz der inneren Organe, der Hämatopoese im Knochenmark und als Mineraldepot. (Bartl et al., 2006, S. 5-6) Das Knochengewebe setzt sich aus spezifischen Zellen und einer Grundsubstanz zusammen. Die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten spielen beim Knochenaufbau und Knochenumbau die wichtigste zelluläre Rolle. (Riddle & Clemens, 2017)

Durch die Osteoblasten wird das Osteoid gebildet, die organische Komponente der Grundsubstanz. Durch die Einlagerung des kristalloiden Kalksalzes

Hydroxylapatit in das Osteoid entsteht eine Mineralisierung, wodurch der Knochen seine charakteristische Härte erhält. Die Osteoblasten mauern sich in diese mineralisierte Interzellulärsubstanz ein und werden dann als Osteozyten bezeichnet (Ulfig, 2005, S. 48-53). Osteoblasten werden neben Östrogen und Parathormon auch von anderen Hormonen und Zytokinen gesteuert, wie beispielsweise BMPs, TGF- β und PDGF. Die Osteozyten sind die Knochenzellen mit dem höchsten Vorkommen. Sie sind durch kleine Kanäle über Ausläufer verbunden, über die sie untereinander kommunizieren. Zu ihren vielfältigen Funktionen zählen das Erkennen von Frakturen und Knochenalter und die Einleitung entsprechender Reparaturmaßnahmen. Osteozyten werden als mechanosensorische Zellen bezeichnet, die die Signale des Knochens in Umbauprozesse umwandeln. (Bartl et al., 2006, S. 10-17)

Während die Osteoblasten für den Knochenaufbau fungieren, sind die Osteoklasten für den Knochenabbau zuständig. Die Osteoblasten sind große, unregelmäßig geformte Zellen mit bis zu 50 Zellkernen, die sich in den Resorptionslakunen (sogenannten Howship-Lakunen) befinden, welche beim Osteoidabbau entstehen (Ulfig, 2005, S. 48-53). Sie liegen mit ihrer stark gefalteten Zellmembran der Knochenoberfläche auf (siehe Abb.1). Durch das Freisetzen von proteolytischen Enzymen wird die Knochenmatrix gelöst und in den Osteoklasten verdaut. Die Osteoklasten dienen als Hauptangriffspunkt für die Bisphosphonattherapie (Bartl et al., 2006, S. 66-68).

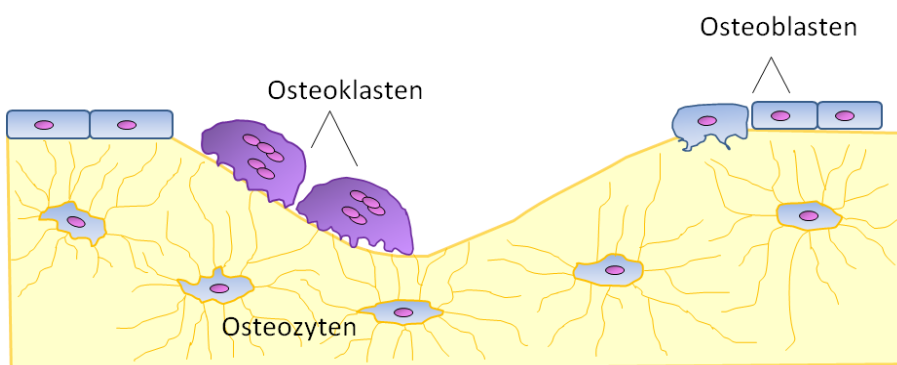


Abbildung 1: Zellen des Knochens (angelehnt an Riddle & Clemens, 2017, S.669)

1.2 Rolle der Wachstumsfaktoren bei der Knochenremodellierung

Im adulten Skelett findet ein kontinuierlicher Knochenumbau statt, der als Remodellierung bezeichnet wird, wobei die Form und Quantität der Knochen unverändert bleibt (Frost, 1969). Die Knochenremodellierung setzt sich aus fünf Phasen zusammen. Zuerst erfolgt eine Aktivierung des Knochenumbaus durch verschiedene parakrine und endokrine Faktoren. Dadurch wird die darauffolgende osteoklastenvermittelte Knochenresorption stimuliert. Nach Beendigung der Knochenresorption wird eine Apoptose der Osteoklasten in der sogenannten Umkehrphase initiiert. Gleichzeitig wird die Rekrutierung von Osteoblastenvorläuferzellen durchgeführt. Durch die ausdifferenzierten Osteoblasten erfolgt daraufhin eine Knochenformation, bei der der zuvor resorbierte Knochen wiederaufgebaut und mineralisiert wird. Der Kreislauf schließt in der Terminierungsphase. Auf diese Art können zusätzlich zur Knochenerneuerung unter anderem Knochenschäden wie Frakturen oder Mikrorisse wieder repariert werden, es findet also eine Knochenregeneration statt (Henriksen et al., 2009; Sims & Gooi, 2008).

Knochenremodellierung und -regeneration werden gesteuert durch die Wechselwirkungen verschiedener Zellen, wie Osteoblasten und Osteoklasten sowie weiteren Modulatoren (Gerstenfeld et al., 2003). Unterstützend wirken zudem Wachstumsfaktoren, natürlich vorkommende Proteine oder Hormone, durch ihre Chemotaxis und Stimulation der Zelldifferenzierung und Proliferation (Roberts & Rosenbaum, 2012). Im Folgenden wird auf die in dieser Versuchsreihe untersuchten Wachstumsfaktoren und ihre Einwirkung auf den Knochenumbau eingegangen. Als erster relevanter Wachstumsfaktor ist der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) zu nennen. Sezerniert wird er unter anderem durch Thrombozyten und glatte Muskelzellen (Fredriksson et al., 2004). PDGF wirkt auf verschiedene Zelltypen, die an der Wundheilung beteiligt sind. Neben der Chemotaxis von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Makrophagen ist auch die Stimulation der Produktion von Matrixmolekülen wie Kollagen als bedeutender Einfluss an einer gesteigerten Wundheilung anzusehen (Heldin & Westermark, 1999).

Der dem PDGF strukturell ähnliche Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wirkt besonders positiv auf die Angiogenese. Blutgefäße proliferieren bei Anwesenheit von VEGF vermehrt und ein Wachstum dieser wird gefördert. (Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Fredriksson et al., 2004) Ferner stimulieren Untergruppen der VEGF die Migration von Monozyten zur Reduktion einer Entzündung (Clauss et al., 1990).

Die Familie der Transforming Growth Factors β (TGF- β) beeinflusst ebenso zahlreiche Zellfunktionen. Als Zytokine unterstützen die TGF- β die Differenzierung und Proliferation von Fibroblasten (Wehrhan et al., 2011). Diese befinden sich unter anderem in Knochen- und Knorpelgewebe, wo sie die Chondrogenese durch einen Zusammenschluss mesenchymaler Stammzellen initiieren (Shen et al., 2014). Wehrhan et al. (2011) konnten zeigen, dass eine unterdrückte TGF- β 1-Expression zu einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose des Kiefers führen kann (zur BRONJ siehe Kapitel 1.4)

1.3 Bisphosphonate

Bisphosphonate sind Medikamente, die durch ihre osteotrope Wirkung häufig zur Behandlung von Stoffwechselstörungen des Knochens eingesetzt werden. Fleisch et al. erkannten in den 60er Jahren das kalziumlösende Potenzial der bis dahin nur in der Industrie vorkommenden Stoffe und es folgten eine Reihe von Forschungen (Fleisch et al., 1969). Heutzutage sind einige Bisphosphonate erforscht und finden je nach Typ Anwendung bei Knochenerkrankungen wie zum Beispiel Knochenmetastasen, Multiples Myelom, Morbus Paget, Osteoporose oder einer tumorinduzierten Hypercalciämie (Bartl et al., 2006, S.265-269).

1.3.1 Chemische Struktur und Gruppeneinteilungen

Als Grundstruktur der Bisphosphonate gilt das in der Natur vorkommende Pyrophosphat. Wie in Abbildung 2 dargestellt, besteht im Pyrophosphat eine P-O-P-Brücke, die zwar in vitro bestehen bleibt, allerdings in vivo hydrolytisch gespalten wird. Deswegen wurde diese instabile Bindung bei der Herstellung der Bisphosphonate durch eine P-C-P-Bindung ersetzt, die resistent gegen die enzymatische Hydrolyse des Körpers wirkt. Somit können die Bisphosphonate ihre Wirkung in vivo entfalten. An dem Kohlenstoffatom binden zwei freie Liganden.

Während der eine Ligand zangenartig an die Kalziumatome der Knochenoberfläche bindet, bestimmt der andere Ligand die Klasse und Potenz des Bisphosphonates. Die Bisphosphonatmoleküle binden vor allem in verletzten Stellen in den Resorptionslakunen und dem somit freiliegenden Calcium zangenartig. (Bartl et al., 2006, S. 41-47)

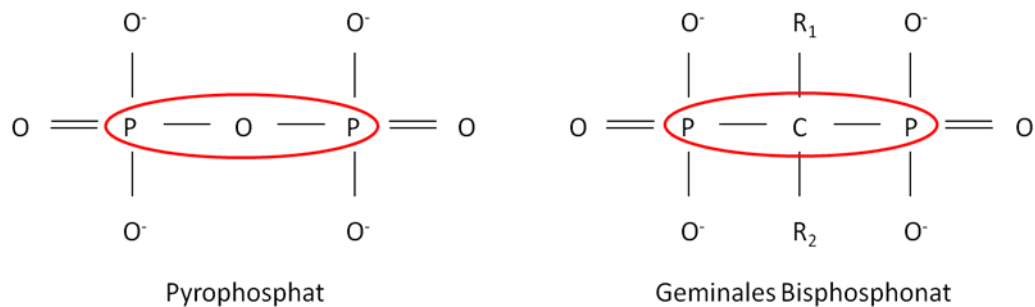


Abbildung 2: Chemische Struktur von Pyrophosphat und Bisphosphonaten (angelehnt an Bartl et al., 2006, S.42)

In Abbildung 2 ist die chemische Struktur der Bisphosphonate mit der Summenformel $R_1R_2C(PO_3H_2)(PO_3H_2)$ zu erkennen. Durch die Bindung verschiedener „Reste“ an das zentrale Kohlenstoff-Atom können die unterschiedlichen Bisphosphonate entstehen. Dadurch hat jedes Bisphosphonat eine separate Wirksamkeit und Potenz. Die Bisphosphonate werden in drei chemische Gruppen unterteilt. Die erste Generation besitzt keine Stickstoffatome (Etidronat, Clodronat, Tiludronat). Durch den Einsatz einer Aminogruppe entstehen die Bisphosphonate der zweiten Generation (Pamidronat, Alendronat, Neridronat). Die potentesten Bisphosphonate können durch die Substitution der Grundstruktur mit Stickstoffatomen beispielsweise in Heterozyklen hergestellt werden (Olpadronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat). (Bartl et al., 2006, S. 41-47)

1.3.2 Wirkmechanismus

Durch eine hohe Affinität der Bisphosphonate an Calciumphosphat binden diese fast ausschließlich an Knochen. Dabei docken sie besonders an freiliegendes Calciumphosphat in den Resorptionslakunen an und entfalten dort ihre Wirkung.

Bereits innerhalb der ersten Tage wird die Knochenresorption durch den Eingriff in den Mevalonat-Stoffwechsel inhibiert. Als Folge dessen entsteht weniger Farnesyl und Geranyl, welches physiologisch für die Verankerung und somit die Kommunikation von Proteinen an die Zellmembran verantwortlich ist. Die Zellen können somit ihre Funktionen nicht ausführen. (Bartl et al., 2006, S. 59-74) Die unterschiedlichen Angriffspunkte der Bisphosphonatgenerationen sind in Abbildung 3 zu erkennen.

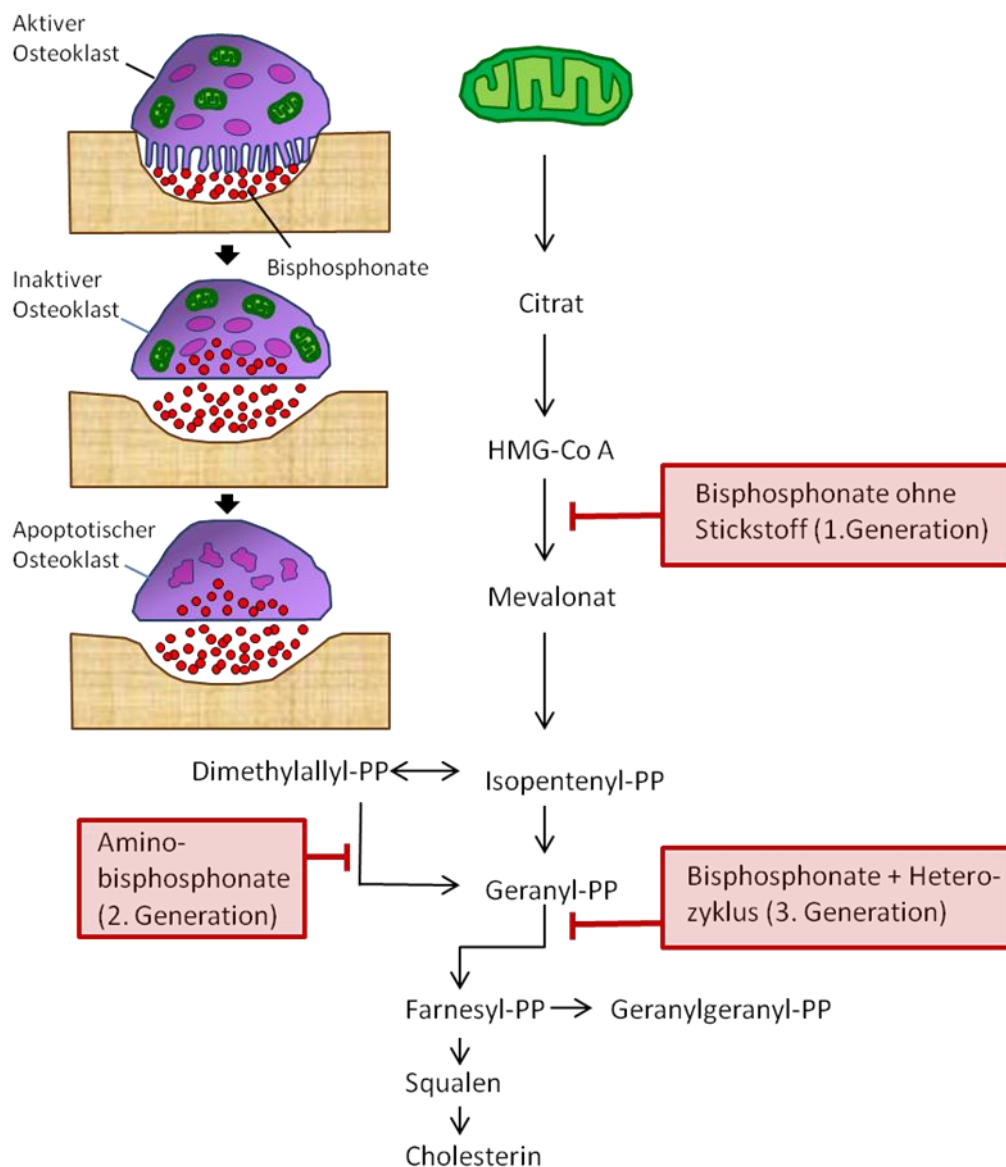


Abbildung 3: Eingriff der Bisphosphonate in den Mevalonatstoffwechsel (angelehnt an Bartl et al., 2006, S.61)

Als zellulärer Angriffspunkt gelten die Osteoklasten. Ihre Aktivität wird durch verschiedene Mechanismen gehemmt. Durch die Aufnahme der Bisphosphonate verändert sich ihre Zellstruktur und innerhalb kürzester Zeit kann eine Störung der „ruffled border“, mit der sie an den Knochen andocken, vermerkt werden (Sato et al., 1991). Daraufhin kommt es zu einer Inhibierung der Adhäsion von Osteoklasten am Knochen (Colucci et al., 1998). Die Osteoklasten entfernen sich dadurch von der Knochenoberfläche und die Osteoblasten können den Knochendefekt reparieren. Zudem führen Bisphosphonate durch eine reduzierte Osteoklastenrekrutierung zu einer verminderten Anzahl der Osteoklasten und leiten weiterhin deren Apoptose ein. Das Ergebnis dieser Effekte ist eine Hemmung der Osteoklastenaktivität und damit der Knochenresorption. (Hughes et al., 1995).

1.3.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Die Einnahme von Bisphosphonaten birgt auch unerwünschte Nebenwirkungen. Eine häufige Nebenwirkung stellt die Nephrotoxizität dar. Nach Beginn der Einnahme können sich die Nierenretentionsparameter verschlechtern. Eine bestehende stark verminderte Nierenfunktion gilt als Kontraindikation für die Gabe von Bisphosphonaten. (Boonen et al., 2008; Hexal AG, 2024) Eine weitere häufig auftretende Nebenwirkung stellt die Hypocalciämie dar, die durch den verminderten Knochenabbau und eine dadurch verringerte Freisetzung von Calcium aus dem Knochen entsteht. Zudem spielt die Komplexbildung von Bisphosphonaten und Calcium im Serum eine Rolle (Bartl et al., 2006, S. 78). In den meisten Fällen ist diese jedoch nicht in dem Maße ausgeprägt, dass sie sich klinisch präsentiert. Zudem erfolgt prophylaktisch eine Zugabe von Calcium und Vitamin D, sodass sich eine Hypocalciämie nicht manifestiert (Saag et al., 2007).

Bei einem von 100 Behandelten tritt nach erstmaliger Gabe eine Akute-Phase-Reaktion mit grippeähnlichen Symptomen, Fieber und Knochenschmerzen auf. Dies reguliert sich allerdings nach den ersten Tagen nach Erstgabe wieder herunter (Bartl et al., 2006, S. 79-80; Hexal AG, 2024).

Des Weiteren wird in Verbindung mit der Einnahme von Bisphosphonaten das gelegentliche Auftreten von Vorhofflimmern gesehen. Der Zusammenhang ist allerdings umstritten. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass kein Hinweis auf

eine erhöhte Mortalität in Bezug auf Vorhofflimmern unter Bisphosphonateinnahme besteht (Pazianas et al., 2010).

Mit einer Inzidenz von 0,7 % bis 6,7 % tritt unter Gabe von Zoledronsäure eine Osteonekrose des Kiefers auf (Ruggiero et al., 2014). Da diese Arbeit den Fokus auf diese Nebenwirkung legt, ist ihr das Kapitel 1.4 gewidmet.

1.3.4 Zoledronsäure

Zoledronsäure oder Zoledronat gehört der dritten Generation der Bisphosphonate an und gilt momentan als das potenteste Bisphosphonat. Seine Potenz liegt 20000-fach höher als die der ersten Bisphosphonate. (Bartl et al., 2006, S. 44-47; Green, 2005) Die Grundstruktur der Bisphosphonate ist mit einem Imidazolring und einer Hydroxylgruppe konjugiert. Das Vorhandensein der Stickstoffmoleküle im Imidazolring führt durch eine erhöhte Affinität zum Knochen zu einer stärkeren Hemmung der Osteoklastenaktivität als bei anderen Bisphosphonaten (Green, 2005; Li & Davis, 2003). Neben dem hemmenden Effekt auf die Osteoklastenaktivität wirkt die Bisphosphattherapie darüber hinaus auf Fibroblasten, deren Wachstum gehemmt wird. Zudem erfolgt eine Reduktion der Transkription von Typ I Kollagen. (Ravosa et al., 2011) Es ist nachgewiesen, dass Zoledronsäure neben der Verhinderung der Knochenresorption die Proliferation und Lebensfähigkeit von Tumorzellen verringert. Dadurch wird außerdem das Gesamtüberleben des Patienten verbessert (Coleman et al., 2010). Zoledronsäure ist zugelassen für Komplikationen des Skelettes mit abnormalem Knochenstoffwechsel. Dazu gehören pathologische Frakturen, Wirbelkompressionen und die Behandlung mit Bestrahlung oder Operation am Knochen. Zudem besteht eine Zulassung von Zoledronsäure für die tumorinduzierte Hyperkalzämie und Patienten mit Tumorerkrankungen des Skelettes. Osteoporose und Morbus Paget können ebenso mit Zoledronsäure therapiert werden. (Bartl et al., 2006, S. 262-264; Hexal AG, 2024)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Speziellen mit Zoledronsäure als Auslöser der BRONJ, da Zoledronsäure bei einer Vielzahl von Erkrankungen angewandt wird und das Auftreten der BRONJ überwiegend mit der Einnahme der potenten, intravenös verabreichten Zoledronsäure assoziiert ist (Otto et al., 2010). Deshalb wird im Folgenden lediglich auf dieses Bisphosphonat eingegangen.

1.4 Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (BRONJ)

Als Osteonekrose wird durch einen Knocheninfarkt abgestorbenes Knochengewebe bezeichnet. Nekrotische Areale im Knochen können viele verschiedene Ursachen haben. Als kieferspezifisch gilt neben der Osteoradionekrose primär die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers, kurz BRONJ. Durch die zunehmende Einnahme von Bisphosphonaten und dem gehäuftem Auftreten der BRONJ im Zusammenhang mit der Einnahme von Zoledronsäure steigt die Fallzahl der BRONJ nachweislich (Marx, 2003).

1.4.1 Definition und Symptome

Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers gilt als spezifische Nebenwirkung der Bisphosphonattherapie. Zur Differenzierung gegenüber anderen Erkrankungen wurde von der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) die folgende Definition erstellt, bei deren gemeinsamen Vorliegen man von einer BRONJ ausgeht (Ruggiero et al., 2009):

- Aktuelle oder frühere Bisphosphonattherapie in der Anamnese
- Freiliegender Kieferknochen für mindestens 8 Wochen
- Keine Bestrahlung im oralen Bereich in der Anamnese

Unter Einführung der Gabe von intravenösen, hochpotenten Bisphosphonaten der Gruppe 3, wie zum Beispiel Zoledronat und Ibandronat, wurde die BRONJ als Nebenwirkung zum ersten Mal im Jahre 2013 dokumentiert (Marx, 2003). Die intravenöse Gabe dieser Medikamente gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung der BRONJ (Stumpe et al., 2009). Als häufigstes klinisches Symptom stellt sich ein freiliegender Knochen des Kiefers dar, gefolgt von Schmerzen, einer verlängerten Wundheilung und einer lokalen Entzündung mit Schwellung des Zahnfleisches oder Fisteln. Es wird auch von pathologischen Frakturen oder eingeschränkter Nervenfunktion im Bereich der Mandibula berichtet. (Otto et al., 2012)

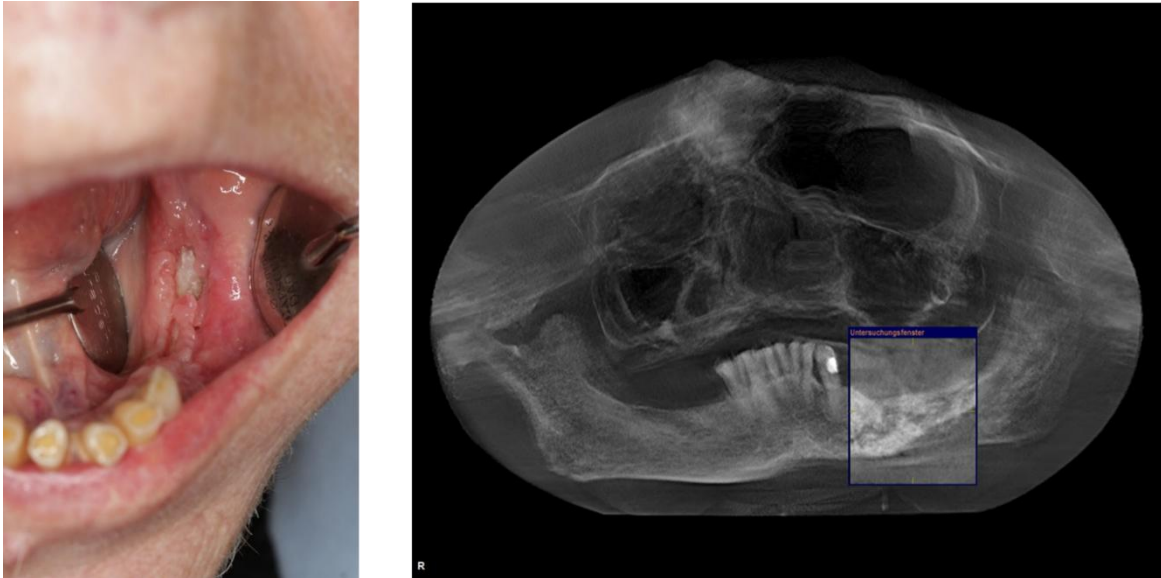


Abbildung 4: Klinische und radiologische Darstellung einer BRONJ im linken Unterkiefer einer Patientin der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH Lübeck

1.4.2 Pathogenese

Obgleich der vielseitigen Forschung an der BRONJ in den letzten Jahren ist die Pathogenese dieser Medikamentennebenwirkung noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Ansatzpunkte werden dabei in Betracht gezogen.

Bisphosphonate inhibieren die Funktion und Differenzierung der Osteoklasten und unterdrücken somit die Knochenremodellierung (Ruggiero et al., 2014; Russell et al., 2008). Es kommt zur Apoptose und einem Anfallen von funktionslosen Osteoklasten in den Resorptionslakunen. Es ist fraglich, warum die Osteonekrose bei systemischer, intravenöser Anwendung primär im Kiefer auftritt (Woo et al., 2006). Untersuchungen haben ergeben, dass in den Kieferknochen generell eine höhere Remodellierungsrate im Vergleich zum restlichen Skelett vorliegt. Dabei zeigt der Unterkiefer eine vermindert durchblutete Kortikalis und ist dadurch anfälliger für Nekrosen (Marx et al., 2005). Die Kieferknochen sind lediglich von einer dünnen Mukosa umgeben und kontinuierlich unterschiedlichen Erregern ausgesetzt. Eine Infektion oder Entzündung trägt zudem zu der Entstehung einer BRONJ bei. In früheren Studien wurden Bakterien, insbesondere Actinomyces, in Biopsien aus entfernten nekrotischen Kieferknochen der Patienten mit Bisphosphonateinnahme gefunden und begünstigen folglich eine BRONJ (Hansen

et al., 2006). Diese anaeroben, grampositiven Bakterien können eine Aktinomykose hervorrufen. Dabei kommt es zu einer bakteriellen Mischinfektion, die in der Regel zervikofascial auftritt. Eine Immunsuppression wirkt sich ebenfalls negativ auf den Krankheitsverlauf einer BRONJ aus (Wehrhan et al., 2011). Landesberg et al. (2008) konnten darstellen, dass Bisphosphonate neben dem Knochen auch die orale Mukosa angreifen. Weiterhin werden die Proliferation sowie die Wundheilung des Epithels unterdrückt.

Generell haben in vitro Experimente gezeigt, dass Zoledronsäure die Angiogenese im Knochen reduzieren kann (Wood et al., 2002). Eine verminderte Angiogenese kann zu einer Avitalisierung und Nekrose des Knochens führen. Santini et al. (2003) bestätigten eine Unterdrückung des VEGF-Levels unter Bisphosphonateinnahme. Da die physiologische Wirkung des VEGF auf die Neubildung von Gefäßen reduziert wird, kommt es zu einer verminderten Stabilisation des Kiefers, Nekrosen und somit zu einer erhöhten Frakturrate.

Die oben genannten Studien zeigen, dass die Pathogenese der BRONJ vielseitig und noch nicht umfassend geklärt ist.

1.4.3 Stadienabhängige Therapie der BRONJ

Je nach Ausmaß der Symptome wird die BRONJ in vier verschiedene Stadien eingeteilt. Diese sind in der folgenden Abbildung 5 dargestellt.

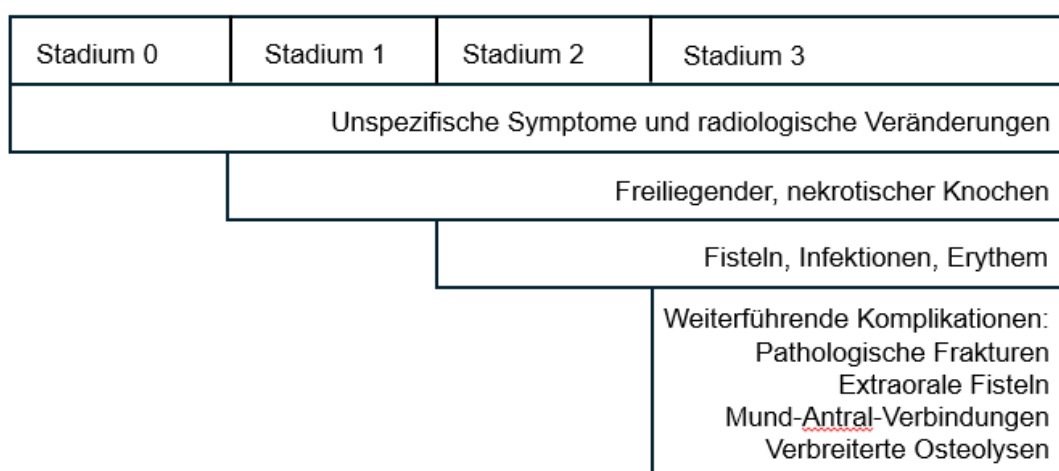


Abbildung 5: Stadien der BRONJ (angelehnt an Ruggiero et al., 2014)

Aufgrund bisher fehlender Erkenntnisse über die genaue Pathogenese der BRONJ setzt sich die Therapie aus vielfältigen Ansätzen zusammen und gestaltet sich schwierig. Dabei kommen je nach Stadium und Ausmaß der Klinik sowohl konservative als auch chirurgische Behandlungsstrategien zur Anwendung. Patienten ohne auffällige Klinik sollen vorerst keiner Behandlung unterzogen, gleichzeitig aber über Prävention und mögliche Symptome aufgeklärt werden. Dies begünstigt eine möglichst frühe Entdeckung einer BRONJ. (Ruggiero et al., 2014) Reines Beobachten einer bereits vorhandenen BRONJ wird nicht empfohlen, da die Osteonekrose des Kiefers asymptomatisch weiter fortschreiten kann. Antibiotikatherapie, desinfizierende Mundspülungen und eine ausreichende Schmerztherapie werden als konservative Mittel bei kleineren, asymptomatischen Defekten in niedrigen Stadien eingesetzt. (Schiegnitz et al., 2017)

Abu-Id et al. (2006) stellen in ihrer Arbeit dar, dass in 66 % der von ihnen untersuchten Fälle eine konservative Vorgehensweise oder begrenzte chirurgische Maßnahme langfristig nicht zu einer Heilung führt, sodass die Osteonekrose fortschreitet oder weiterführende Komplikationen auftreten (siehe Abbildung 5, Stadium 3). In diesem Fall müssen größere chirurgische Maßnahmen in Betracht gezogen werden (Abu-Id et al., 2006; Mücke et al., 2011). Die chirurgische Sanierung liegt in der möglichst vollständigen Entfernung des nekrotischen Areals. Nerven, gesunder Knochen und gesunde Zähne sollten dabei geschont werden. Daraufhin sollte eine speicheldichte plastische Deckung der Wunde erfolgen. Eine adäquate Antibiotikatherapie komplettiert die chirurgischen Eingriffe. (Schiegnitz et al., 2017)

Neuere Methoden, wie die hyperbare Oxygenierung, der Einsatz von Laser, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) oder plättchenreiches Plasma sind Teil moderner Forschungen und werden auf ihre Wirkung im Heilungsprozess der BRONJ untersucht. (Freiberger et al., 2012; Gerard et al., 2014; Lee et al., 2007; Ruggiero et al., 2014; Vescovi et al., 2008)

1.5 Die Thrombozytenderivate PRP und PRF

Als neuere Methode in der Behandlung von chirurgischen Wunden stellt sich die Nutzung von Thrombozytenderivaten dar. Als thrombozytenreiches Plasma (kurz PRP für engl. platelet-rich plasma) wird ein autologes, thrombozytenreiches Plasma bezeichnet, bei dem die Thrombozyten durch verschiedene Herstellungsmethoden konzentriert vorliegen (Dohan Ehrenfest et al., 2009b). Durch eine Umwandlung der Herstellungsprotokolle für PRP entstand das thrombozytenreiche Fibrin (kurz PRF für engl. platelet-rich fibrin).

Bei der Herstellung von PRP erfolgt eine Ausschüttung verschiedenster Botenstoffe und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF, PDGF oder TGF- β 1 nach Aktivierung aus den Granulae der Thrombozyten. Resultierend zeigt sich eine gesteigerte Wundheilung durch Chemotaxis und vermehrter Gefäßversorgung (Blair & Flaumenhaft, 2009). Verschiedene Studien haben bereits einen positiven Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten gezeigt (Cácares et al., 2008; Kakudo et al., 2008). Die Notwendigkeit einer Aktivierung der Thrombozyten zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren wird häufig beschrieben. Hierbei sind verschiedene Verfahren bekannt. Dazu zählen unter anderem die freeze-thaw-freeze-Methode, eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde gefolgt von einer Kühlung bei 4 °C für 16 Stunden, eine direkte Aktivierung durch Zugabe von CaCl₂-Lösung oder ein Versetzen mit Thrombin (Burnouf et al., 2016).

Die Herstellung von PRF wurde das erste Mal im Jahre 2000 von Choukroun beschrieben (Choukroun et al., 2000). Die Besonderheit der Gewinnung von PRF im Gegensatz liegt in der fehlenden Zugabe von Antikoagulanzen, sodass nach der venösen Blutentnahme ein Fibrinclot durch natürliche Koagulation entsteht (Kobayashi, E. et al., 2016). Diese autologe Fibrinmatrix soll als Fibrinkleber ebenso wie PRP die Heilung von Knochendefekten fördern (Choukroun et al., 2006). Die einfache Handhabung der Gewinnung von PRF und das fehlende Behandeln mit Antikoagulanzen macht PRF interessant für die weitere Forschung (Dohan Ehrenfest et al., 2009). Im Jahre 2014 haben Ghanaati et al. bereits erläutert, dass das durch veränderte Zentrifugationsschritte modifizierte aktivierte PRF (A-PRF) eine relevante Rolle in der klinischen Anwendung spielt und weiter

untersucht werden sollte. Das Standard PRF wird bei 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Dohan et al., 2006). Das Protokoll für die Herstellung des A-PRF wurde auf 1500 U/min für 14 Minuten Zentrifugation modifiziert (Ghanaati et al., 2014).

In vivo findet die Nutzung von Thrombozytenkonzentraten bereits seit einigen Jahren Anklang. PRP wird in der Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie aufgrund des positiven Effekts auf die Heilung von Knochendefekten eingesetzt (Anitua et al., 2004; Marx et al., 1998). Auch im orthopädischen Bereich und der rekonstruktiven Chirurgie kommen Thrombozytenderivate zum Einsatz (Meheux et al., 2016). Die Nutzung von PRP, PRF und A-PRF ist aufgrund seines Wirkungsprofils und der einfachen und risikoarmen Herstellung von erhöhtem Interesse für den klinischen Einsatz.

1.6 Nutzung von PRP und PRF beim Gebrauch von enossalen Implantaten

Osteoblasten spielen eine entscheidende Rolle in der Osseointegration von enossalen Implantaten in den Kiefer. Sie synthetisieren Knochenmatrix und regulieren das Knochenwachstum, sodass ein Anhaften des Implantates im Kiefer entsteht. (Brunette & Chehroudi, 1999) Die Osteoblastenadhäsion an die Materialoberfläche des Zahnimplantates erfolgt sowohl durch eine Zell-Zell-Adhäsion als auch durch eine Anhaftung über die Proteine der extrazellulären Matrix (Schwartz & Boyan, 1994). Dabei ist die Oberflächenbeschaffung der Implantate ebenso ausschlaggebend für die Stärke der Zelladhäsion. Eine Optimierung des Anhaftens kann durch eine Veränderung der Materialoberfläche entstehen. Eine mit Titanplasma besprühte Oberfläche führt hierbei beispielsweise zu einer schnelleren Anhaftung der Osteoblasten als glatte oder gestrahlte Oberflächen. (Lumbikanonda & Sammons, 2001)

Durch eine Verminderung der Zellproliferation und Lebensfähigkeit der Knochenzellen führt der Einsatz von Bisphosphonaten zu einer gestörten Osteointegration von enossalen Implantaten. Mozzati et al. (2015) konnten in einer retrospektiven Studie bereits darlegen, dass die Implantatheilung unter Bisphosphonattherapie bei Verwendung eines plättchenreichen Wachstumsfaktors (PRGF) verbessert ist.

1.7 Ziele der vorliegenden Dissertation

Die vorliegende Arbeit befasst sich damit, die potenziell regenerative Wirkung von PRP und PRF in einem Zellkulturmodell auf Osteoblasten und Fibroblasten unter Bisphosphonattherapie zu untersuchen. Hierzu wurden gingivale Fibroblasten und Osteoblasten zusammen mit PRP und PRF kultiviert und im Rahmen eines etablierten Zellkulturmodells genauer untersucht. Ferner wurde auch die Wirkung von PRP und PRF auf die Osteoblastenadhäsion auf enossalen Implantaten in diesem Zellkulturmodell evaluiert. Somit sollen die Therapieoptionen der BRONJ ausgeweitet und verbessert werden.

Als Ziele der vorliegenden Studie sind zu definieren:

- 1.) Die Etablierung einer standardisierten effektiven Inkubationsmethode zur Herstellung der Thrombozytenderivate PRP und PRF.
- 2.) Die Etablierung eines Zellkulturmodells mit oralen Osteoblasten und Fibroblasten.
- 3.) Die Untersuchung der potenziell regenerativen Wirkung von PRP und PRF in diesem Zellkulturmodell unter Einfluss von Bisphosphonaten.
- 4.) Die Untersuchung der Wirkung von PRP und PRF auf die Zellmigration und -adhäsion auf Titanoberflächen in diesem Zellkulturmodell.

Folgende Fragestellungen lassen sich daraus ableiten:

- 1.) Welche Inkubationsmethoden für PRP und PRF führen zur vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren und können somit als einheitliche Methode für kommende Versuche genutzt werden?
- 2.) Wie wirken sich PRP und PRF auf die Migration und Proliferation auf mit Bisphosphonat behandelte Zellen aus?
- 3.) Inwiefern können PRP und PRF die Anhaftung von Osteoblasten an enossale Implantate unter Bisphosphonattherapie optimieren?

2 Material und Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die in dieser Arbeit genutzten Materialien, Geräte und Softwares beschrieben.

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller
HFIB-G	Human Fibroblasts, gingiva, vital	provitro AG, Berlin
HOB	Human Osteoblasts, vital	provitro AG, Berlin

2.1.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Zellreihe	Medium oder Zusatz	Hersteller
Fibroblasten	Fibroblast growth medium, basal (500ml)	provitro AG, Berlin
	Fibroblast growth Supplement-Mix (FCS) & Antibiotics	provitro AG, Berlin
Osteoblasten	Osteoblast growth medium, basal (500ml)	provitro AG, Berlin
	Osteoblast growth Supplement-Mix (FCS) & Antibiotics	provitro AG, Berlin

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Cedex® XS Analyser	Roche Innovatis AG, Bielefeld
CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Labor-pH-Meter Calimatic 766 mit Messelektrode SE100	Knick, Berlin
Lichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RH basic	IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Stauffen
Multipette® plus - Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research® Plus (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND GmbH&Co.KG, Wertheim
Rasterelektronenmikroskop „Zeiss EVO HD15“	Carl Zeiss Mikroskopie Deutschland GmbH, Oberkochen
Schüttelinkubator ST5CAT	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Schüttelwasserbad 1083 Thermolab®	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Sputtergerät SCD 040	Balzers, Liechtenstein
Vakuum-Absauggerät	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Wippschüttler ST5 CAT	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
xCELLigence® RTCA DP	ACEA Biosciences, Inc., San Diego
Zeiss Axiovert 200 M	Carl Zeiss Mikroskopie Deutschland GmbH, Oberkochen
Zentrifuge Allegra™ 25 R	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)

2.1.4 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen

Methoden	Chemikalie	Hersteller
Zellkultur, RTCA, Migration & Implantate	Gibco DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham
	DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt
	Gibco DPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham
	Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Bielefeld
	Mycoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
	Gibco Trypanblau 0,2%	Thermo Fisher Scientific, Waltham
	Trypsin/EDTA	provitro AG, Berlin
	Trypsin-neutralising solution (serum-free)	provitro AG, Berlin
ELISA	Elektrolytlösung 3mol/l KCl	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co.KG, Weilheim
	Pufferlösung pH 4 ± 0.02	Carl Roth GmbH & Co.KG, Bielefeld
	Pufferlösung pH 7 ± 0,02	Carl Roth GmbH & Co.KG, Bielefeld
	CaCl ₂	Carl Roth GmbH & Co.KG, Bielefeld
MTT-Test	1 N HCl	Merck KGaA, Darmstadt
	Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
	MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis
	Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis
Medikamente	Zoledronsäure 4mg/5ml	Hexal AG, Holzkirchen

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Aspirationspipetten (2ml)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Culture-Insert 2 Well 24	Ibidi GmbH, Gräfelfing
E-Plate 16	ACEA Biosciences, San Diego
Eppendorf Combitips advanced® (1ml, 5ml, 10ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kunststoffröhrchen (15ml, 50ml; konisch, steril, mit Schraubverschluss)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Mikrotiterplatten (6,12 bzw 96 Kavitäten; Flachboden, mit Deckel)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Smart slides	Ibidi GmbH, Gräfelfing
tioLogic ST Implant Ø 3,3mm, L 11,0mm	Dentaurum Implants, Ispringen
Zellkulturflaschen Stand. (T25, T75, T175)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Zellkulturschale 150, Stand.	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht

2.1.6 Kits

Tabelle 6: ELISA-Kits

Kit	Hersteller
Human PDGF-BB Quantikine® ELISA Kit	R & D Systems, Minneapolis (USA)
Human TGF-β1 Quantikine® ELISA Kit	R & D Systems, Minneapolis (USA)
Human PDGF-BB Quantikine® ELISA Kit	R & D Systems, Minneapolis (USA)

2.1.7 Software

Tabelle 7: Software

Software	Entwickler
AxioVision Rel. 4.8.2.	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Cedex XS	Roche Inovatis AG, Bielefeld
IBM SPSS Statistics Version 24	IBM Deutschland Kreditbank GmbH, Böblingen
Inkscape 0.92.4	Inkscape Community
Microplate Manager Software	Bio-Rad, München
Microsoft 365 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Corporation, Redmont (USA)
Wound Healing Tool	MRI, Montpellier (Frankreich)

2.2 Verwendete Methoden

Jegliche Versuche sind durch das Ethikkomitee der Universität zu Lübeck freigegeben (ID 16-348) und anlehnend an die Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden haben eine Einverständniserklärung zur Blutentnahme und weiteren Analysen abgegeben.

Zunächst wird auf die zellbiologischen Methoden zur Darstellung der Kultivierung, Herstellung des Zellvorrates und die Zellzählung eingegangen. Folgend werden die Vorversuche beschrieben. In diesen wird auf die verschiedenen Herstellungsmethoden von PRP und PRF eingegangen und die ELISA-Tests zur Messung des jeweiligen Gehaltes an Wachstumsfaktoren erläutert. Zudem werden die Methoden zur Messung der optimalen auszusäenden Zellzahl für die Versuche und die optimale Konzentration an PRP und PRF beschrieben. Mit diesen Ergebnissen werden folgend die Methoden der Hauptversuche erläutert. Hierbei wird auf die Anwendung des RTCA (Real-time Cell Analyzer), Migrationstest und MTT-Test eingegangen. Das Kapitel schließt mit der Beschreibung der Implantatversuche, bei denen angehaftete Osteoblasten unter Bisphosphonattherapie mit und ohne Thrombozytenderivate elektronenmikroskopisch untersucht werden.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Versuche wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Der in den im Folgenden beschriebenen Versuchen benötigte Laborbedarf wurde vor Benutzung durch Autoklavierung sterilisiert. Neben der Arbeitsfläche wurden Geräte oder Flaschen, die nicht hitzestabil waren, mit 70 % Ethanol und Mycoplasma-Off gereinigt, um eine Kontamination der Zelllinien zu vermeiden. Alle Lösungen wurden steril geliefert und ausschließlich unter der Sterilwerkbank geöffnet.

2.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung jeder Zellreihe erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 %. Alle 48-72 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche mit einer Stabpipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit ca.

10 ml PBS (phosphate buffered saline) gespült, sodass nicht adhärenente Zellen entfernt wurden. Anschließend wurde frisches, auf 38 °C aufgewärmtes Medium dazugegeben und die Zellen weiter kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zellen wie vom Hersteller empfohlen passagiert, um die Zellen in der exponentiellen Phase zu halten. Dazu wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung auf die übriggebliebenen adhärenenten Zellen inkubierten diese ca. 5-10 Minuten im Begasungsbrutschrank. Die Protease Trypsin wurde eingesetzt, um die extrazellulären Proteine zu spalten und somit die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Durch regelmäßige Kontrolle unter dem Lichtmikroskop wurde die Einwirkzeit möglichst geringgehalten, um das Angreifen lebenswichtiger Proteine der Zellen durch das Trypsin zu verhindern. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde die proteolytische Reaktion des Trypsins durch Zugabe der doppelten Menge an Kulturmedium gestoppt. Im Anschluss wurde die gewonnene Zellsuspension zentrifugiert (200 x g, 5 min, 18 °C). Der Überstand über dem erhaltenen Zellpellet wurde abpipettiert und verworfen. Nach der Resuspension des Zellpellets wurde die gewonnene Zellsuspension wieder in mit frischem Medium versehene Zellkulturflaschen gegeben und im Begasungsbrutschrank bis zur nächsten Nutzung inkubiert.

2.2.1.2 Herstellung des Zellvorrates

Um einen Vorrat an Zellen herzustellen, wurden einige Zellen in niedrigen Passagen eingefroren. Hierzu wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Daraufhin wurden die verbliebenen Zellen mit zweifach konzentriertem Einfriermedium versetzt (20 % FCS, 10 % DMSO, 70 % DMEM) und in Kryoröhrchen überführt. Durch die Nutzung eines Einfrierkarussells, welches mit Isopropanol gefüllt ist und die Zellen mit einem Grad pro Minute auf -80 °C herunterkühlt, wurde ein schonendes Einfrieren gewährleistet.

Zur Nutzung der eingefrorenen Zellen in den Kryoröhrchen wurden diese vom Stickstofftank in ein auf 37 °C geheiztes Wasserbad gegeben und bis zur Verflüssigung des Inhaltes angewärmt. Nach diesem Auftauprozess wurden die Zellen in eine mit dem jeweiligen vorgewärmten Medium gefüllte Zellschale

gegeben, um das schädliche DMSO zu verdünnen und somit eine ungestörte Zellanhaftung zu erreichen. Danach wurden die Zellen wie in Absatz 2.2.1.1 beschrieben kultiviert.

2.2.1.3 Zellzählung

Die genaue Zellzahl wurde durch die Nutzung des Cedex Zellzählers (Roche) ermittelt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der abtrypsinierten und in Medium resuspendierten Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau gelangt durch die Zellmembran von toten oder apoptotischen Zellen und färbt diese demgemäß an, wohingegen lebende Zellen nicht angefärbt werden. 10 µl dieser angefärbten Suspension wurden in eine Probenkammer eines Cedex Smart Slides überführt und in den Cedex Zellzähler geschoben. Dieser unterscheidet aufgrund der Färbung mit Trypanblau lebendige von abgestorbenen Zellen und gibt eine Gesamtzellzahl sowie die Anzahl der lebendigen bzw. abgestorbenen Zellen an. Anschließend wurde mit der Anzahl der lebendigen Zellen weitergearbeitet und es erfolgte die weitere Kultivierung wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.2 Vorversuche

Zunächst wurden die im folgenden Kapitel erläuterten Vorversuche absolviert, um die Hauptversuche unter optimalen Bedingungen durchführen zu können.

2.2.2.1 Präparation von PRP und PRF

Um herauszufinden, welche Inkubationsmethode von PRP und PRF die meisten Wachstumsfaktoren produziert, wurden sechs verschiedene Produktionswege sowohl für PRP als auch für PRF durchgeführt. Dazu wurden verschiedene, in der Literatur bekannte, Herstellungsmethoden genutzt und miteinander verglichen.

Für die Herstellung von PRP wurde ein Thrombozytenkonzentrat, bestehend aus anonymisierten Spenden von verschiedenen Spendern mit Blutgruppe B, Rhesus negativ, genutzt. Eine routinemäßige Herstellung in den Blutbanken gewährleistet ein Endprodukt mit einem Thrombozytengehalt von $\geq 2 \times 10^{11}$ /Einheit (Bundesärztekammer, 2023). Das Thrombozytenkonzentrat wurde durch das Institut für Transfusionsmedizin des UKSH Lübeck zur Verfügung gestellt und

unter Verwendung der „Buffy-Coat-Methode“ hergestellt. Um den Buffy-Coat zu erhalten, wurde Vollblut zuerst für 20 Minuten mit 3500 U/min zentrifugiert. Vier Buffy-Coat-Einheiten wurden mit einer Plasmaeinheit versetzt und gepoolt. Nach der zweiten Zentrifugation für 17 Minuten mit 920 U/min wurde das Thrombozytenkonzentrat durch einen Leukozyten-Depletionsfilter in einen Aufbewahrungsbeutel gegeben. Zu Beginn der Versuche wurde die Hälfte des Thrombozytenkonzentrates mit 5,5 % CaCl₂ mit einer Konzentration von 1:10 versetzt. Jede Methode wurde einmal mit und einmal ohne diese Aktivierung durchgeführt.

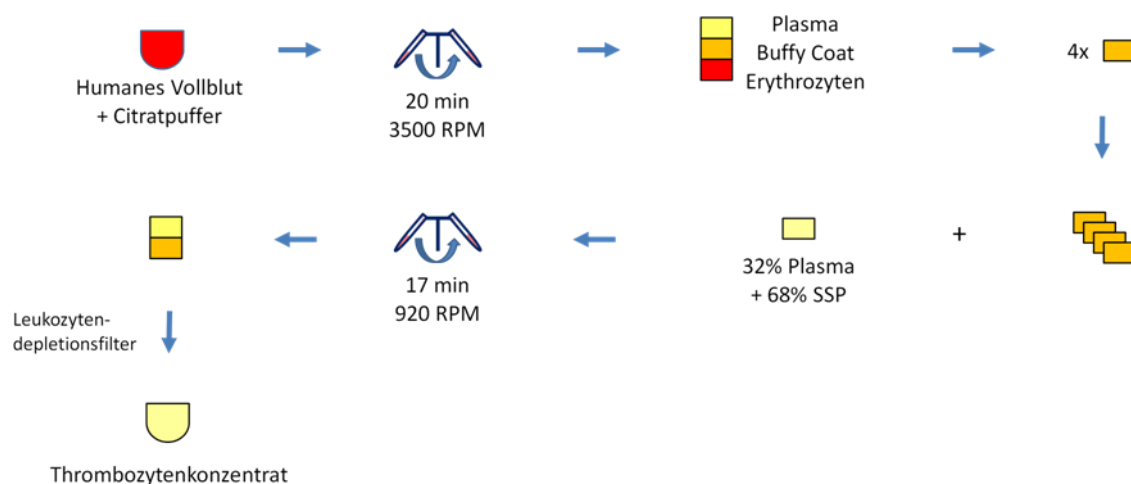


Abbildung 6: Herstellung von Thrombozytenkonzentrat aus humanem Vollblut durch das Institut für Transfusionsmedizin des UKSH Lübeck (SSP = storage solution for platelets)

Zur Herstellung von PRF wurde venöses Blut von freiwilligen, gesunden Spendern im Alter von 20 bis 40 Jahren abgenommen. Die eine Hälfte der Proben wurde bei 1500 U/min für 14min zentrifugiert, um A-PRF herzustellen. Die Zentrifugation der anderen Hälfte wurde bei 3000 U/min für 10 Minuten durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurden nur das Plasma und die Buffy-Coat-Schicht ohne das Erythrozytensediment abgenommen. (Dohan et al., 2006; Ghanaati et al, 2014)

Ca₂-aktiviertes PRP (PRP+Ca), PRP ohne Ca₂-Aktivierung (PRP), PRF und A-PRF wurden anschließend mit jeweils drei verschiedenen Inkubationsmethoden weiter behandelt. Dadurch entstanden im Endeffekt zwölf verschiedene Ansätze zur Weiterverwendung (siehe Abbildung 7).

Die erste Gruppe wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (PRP+Ca-RT, PRP-RT, PRF-RT, A-PRF-RT) (Parrish et al., 2016). Ein zweiter Teil wurde für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C und dann für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert (PRP+Ca-Ink, PRP-Ink, PRF-Ink, A-PRF-Ink) (Amable et al., 2013). Bei der Präparation des dritten Teils wurden die Konzentrate direkt bei -80 °C für 24 Stunden eingefroren. Danach wurden diese Ansätze bei 37 °C eine Stunde im Wasserbad wieder aufgetaut, um dann wieder bei -80 °C für 24 Stunden eingefroren zu werden. Diese letztgenannte Methode wird als Freeze-Thaw-Freeze-Methode bezeichnet (PRP+Ca-FTF, PRP-FTF, PRF-FTF, A-PRF-FTF). (Kobayashi, Y. et al., 2016; Wasterlain et al., 2012)

Nach den verschiedenen Inkubationen wurde bei jeder Probe eine Zentrifugation mit 3000 U/min für 20 Minuten bei 18 °C durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C in Aliquots weggefroren, bis sie für die Versuche verwendet wurden.

Die insgesamt zwölf genannten Herstellungsmethoden lassen sich aus Abbildung 7 entnehmen.

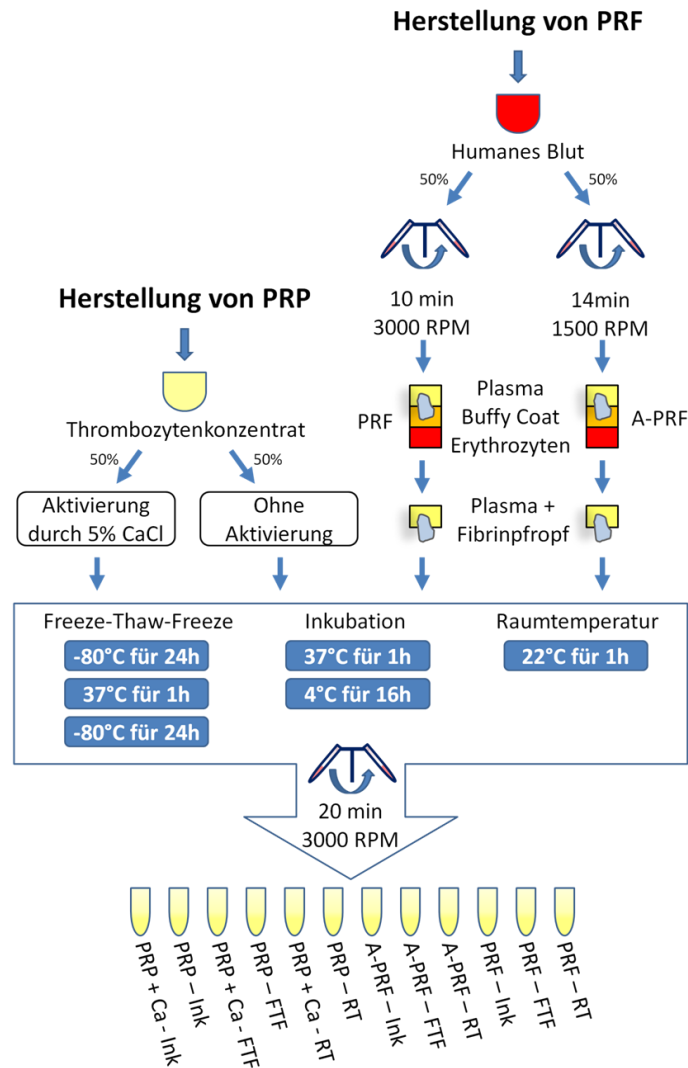


Abbildung 7: Flussdiagramm zur Herstellung von PRP und PRF (Ink = Inkubationsmethode; FTF = Freeze-Thaw-Freeze-Methode, RT= Raumtemperaturmethode)

2.2.2.2 ELISA-Tests

Der ELISA-Test ist ein Immunoassay, der die quantitative Bestimmung eines spezifischen Antigens erlaubt. Hierzu sind auf dem Boden von Mikrotiterplatten Antikörper kovalent gebunden, die auf ein Epitop des Antigens in der zugefügten Probe reagieren. Dieses wird dadurch am Boden gebunden während andere, überflüssige Stoffe ausgewaschen werden. Durch Zugabe weiterer Antikörper, die ein anderes Epitop der Antigene binden, entsteht ein sogenanntes „Sandwich“. Diese Antikörper dienen als Detektoren für die Antigene, da an ihnen zusätzlich

Enzyme gebunden sind. Sie sorgen durch die Katalyse einer Substratumsetzung für einen Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann. Insgesamt wurden die Proben mithilfe von ELISA-Testkits (R&D Systems, Minneapolis) auf das Vorhandensein der drei verschiedenen menschlichen Wachstumsfaktoren PDGF-BB, VEGF und TGF- β 1 getestet. Die jeweiligen Mengenangaben der zugefügten Flüssigkeiten variieren zwischen den verschiedenen ELISA-Tests und sind aufgrund dessen der Bedienungsanleitungen zu entnehmen (R&D Systems, Inc., 2019a; R&D Systems, Inc., 2019b; R&D Systems, Inc., 2019c).

Vor der Durchführung des unten beschriebenen Standardverfahrens musste das latente TGF- β 1 in den Proben zuerst durch Säure aktiviert und danach wieder neutralisiert werden. Dazu wurde zu 40 μ l Probe 20 μ l 1N HCl gegeben und 10 Minuten inkubiert. Nach dieser Aktivierung folgte die Neutralisierung durch Zugabe von 20 μ l 1,2N NaOH/0,5M HEPES. Des Weiteren wurde sowohl bei Testung auf PDGF-BB als auch auf TGF- β 1 eine 1:20-Verdünnung der Proben hergestellt. Dies stellte sicher, dass alle gemessenen Extinktionen innerhalb der Werte der Standardreihe liegen und dementsprechend ein adäquater Vergleich geleistet werden kann.

Anfangs wurde mithilfe einer Verdünnung des im Kit erhaltenen Standards mit Calibrator Diluent eine Standard-Reihe erstellt, die die Vergleichskurve für die gemessenen Extinktionen darstellt. Zu Beginn des Tests wurde in jedes Well Assay Diluent vorgelegt, welches Testschwankungen ausgleicht und als Negativkontrolle in der Standardreihe dient. Daraufhin erfolgte die Zugabe von Standard, Leerwert oder Probe, wobei jeder Ansatz in doppelter Ausführung pipettiert wurde. In der folgenden zweistündigen Inkubation wurden die vorhandenen Antigene an die Antikörper in den Wells gebunden. Nach vierfacher Waschung mit je 400 μ l Waschpuffer pro Well wurde 200 μ l des Antikörpers mit gekoppeltem Enzym dazugegeben und es erfolgte eine erneute Inkubation für zwei Stunden. Die bereits an den Boden gebundenen Antigene waren danach an einem anderen Epitop mit dem Antikörper plus Enzym versehen. Nach einer weiteren vierfachen Waschung mit 400 μ l Waschpuffer pro Well wurde die Substratlösung zugegeben. Diese bestand aus den beiden Farbreagenzien Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin, die nach gemeinsamer Vermischung als Substrat für das Enzym, in diesem Fall der Meerrettichperoxidase, dienen. Auf

eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten in vor störendem Lichteinfall schützender Alufolie folgte die Abstopfung der Reaktion mithilfe einer im Kit enthaltenen Stop Solution. Der Farbumschlag wurde anhand der Extinktion bei $OD_{450nm/540nm}$ im ELISA Reader bestimmt. (R&D Systems, Inc., 2019a; R&D Systems, Inc., 2019b; R&D Systems, Inc., 2019c).

2.2.2.3 RTCA

Der Echtzeit-Analysator (RTCA, xCELLigence, Roche von engl. Real-Time Cell Analyzer) enthält eine impedanz-basierte Technologie, die Auskunft über die Proliferation, Adhäsion und Funktionsfähigkeit der Zellen gibt. Die zugehörigen Mikrotiterplatten bestehen aus 16 Wells, die jeweils mit Mikroelektroden ausgestattet sind. Durch eine biokompatible Oberfläche des Bodens wird ein adhärentes Wachstum der Zellen gewährleistet. Bei einer Veränderung der Zelladhäsion lässt sich als Folge ebenfalls eine Änderung der elektrischen Impedanz (Wechselstromwiderstand) messen. Diese elektrischen Signale werden in digitale Signale umgewandelt und als Zellindex in Relation zu der Zeit dargestellt. Die Impedanz und somit auch der Zellindex steigen sowohl mit zunehmender Adhäsionsfläche als auch mit zunehmender Zellzahl an. Dieser Sachverhalt ist Abbildung 8 zu entnehmen. (ACEA Biosciences, Inc., 2013)

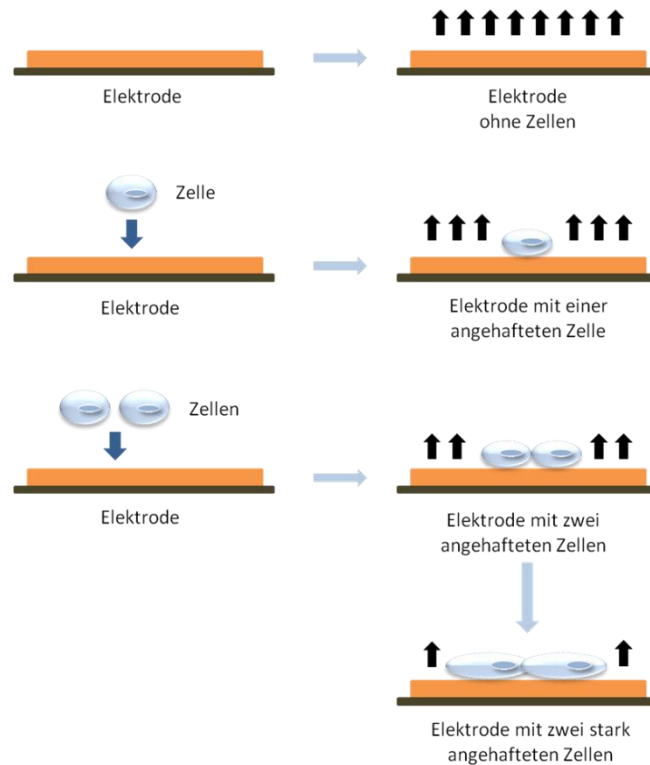


Abbildung 8: Impedanzmessung des Real-Time Cell Analyzers (RTCA) (angelehnt an ACEA Biosciences, Inc., 2013, S. 14)

2.2.2.3.1 RCTA – Ermittlung der auszusäenden Zellen

Zuerst wurde durch eine Aussaat unterschiedlicher Zellzahlen in die E-Plates die optimale Zellkonzentration für die Wells ermittelt. In jedes Well wurden dazu 100 µl Zellmedium vorgelegt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden dazu 50 µl Zellsuspension mit jeweils 2000, 5000 und 10000 Zellen in die Wells der E-Plates eingesät. Jedes Well enthielt an Zellsuspension und dem jeweiligen optimalen Medium insgesamt 150 µl. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die RTCA-Messungen gestartet. Die E-Plates wurden dazu in den RTCA DP device Inkubator eingelegt und im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % inkubiert. Es erfolgte die Messung der Impedanz alle 15 Minuten für jeweils 72 Stunden.

2.2.2.3.2 RTCA – Ermittlung der optimalen Konzentration an PRP und PRF

Nach Ermittlung der passenden Zellzahlen wurden die optimalen Konzentrationen für PRP und PRF untersucht. Der Versuchsaufbau ähnelt dem in Kapitel 2.2.2.3.1 beschriebenen Aufbau. 100 µl Zellmedium wurde inklusive PRP und PRF jeweils

in den Konzentrationen 2,5 %, 5 %, 10 %, 25 % und 50 % in die Wells für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorgelegt. 50 µl Zellsuspension wurde mit der für Fibroblasten bzw. Osteoblasten vorher ermittelten auszusäenden Zellzahl dazugegeben (siehe Kapitel 3.1.2.1). Danach wurden die E-Plates im RTCA DP device Inkubator im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % erneut inkubiert. Die Impedanzmessung wurde für 72h alle 15 Minuten durchgeführt. Nach der Beendigung des Experimentes wurden Zeitpunkt und maximaler Wert des Zellindex abgelesen. Die Probe mit dem durchschnittlich höchsten Zellindex wurde dann für die Hauptversuche genutzt.

2.2.3 Hauptversuche

Als Stellvertreter der Bisphosphonate wurde Zoledronsäure gewählt (siehe Kapitel 1.3.4). Diese lag als intravenöse Infusion mit einer Konzentration von 4 mg/5 ml vor. Es wurde eine Verdünnung mit NaCl hergestellt, um eine Konzentration von 80 µmol/L zu erreichen. Diese gewählte Konzentration von Zoledronsäure für die Hauptversuche basierte auf der gebräuchlichen therapeutischen Dosis (Corrado et al., 2010). Zum Ausschluss einer Zerstörung der Zellen durch den pH-Wert wurde dieser mithilfe von NaOH neutral eingestellt.

Wenn im Folgenden von Zoledronsäure oder Bisphosphonaten die Rede ist, wird immer mit der hier angegebenen Konzentration von 80 µmol/L gerechnet.

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche – nachzulesen Kapitel 3.1 – wurden die Hauptversuche mit den Thrombozytenderivaten PRP-FTF und A-PRF-RT durchgeführt. Aus Kapitel 3.1.3 ist nachzuvollziehen, dass die Konzentration für die PRP-Nutzung 2,5 % beträgt, während Versuche mit PRF mit einer Konzentration von 5 % durchgeführt wurden.

Auf Basis der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde das folgende Auftragsschema für die weiteren Hauptversuche mit Fibroblasten und Osteoblasten gewählt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Auflistung der verschiedenen Inkubationsmethoden mit der jeweiligen Zusammensetzung

Inkubationsmethode	Abkürzung	Zusammensetzung
Positivkontrolle	PK	10 % FKS; Grundmedium inkl. P/S
Negativkontrolle	NK	1 % FKS; Grundmedium inkl. P/S
PRP	PRP	1 % FKS; 2,5 % PRP; Grundmedium incl. P/S
PRP + Zoledronsäure	PRP + ZA	1 % FKS; 2,5 % PRP; 0,08 mMol Zoledronsäure; Grundmedium inkl. P/S
PRF	PRF	1 % FKS; 5 % PRF; Grundmedium inkl. P/S
PRP + Zoledronsäure	PRF + ZA	1 % FKS; 5 % PRF; 0,08 mMol Zoledronsäure; Grundmedium inkl. P/S
Zoledronsäure	ZA	1 % FKS; 0,08 mMol Bisphosphonat; Grundmedium inkl. P/S

2.2.3.1 RTCA-Hauptversuch

In einem RTCA-Test wurde in den Vorversuchen für jede Zellreihe die Zellzahl ausgewählt, die den höchsten Zellindex mit sich brachte (siehe Kapitel 3.1.2.1). Es zeigten sich 10000 Fibroblasten pro Well und 5000 Osteoblasten Well der E-Plates als geeignet. Mit diesen Zellzahlen wurden folgend die RTCA-Hauptversuche durchgeführt.

Dabei wurden ebenfalls die Mikrotiterplatten E-Plate mit 16 Wells (ACEA Biosciences) genutzt. In dem RTCA-Gerät xCELLigence (ACEA Biosciences) wurde die Proliferation der verschiedenen Ansätze aus Kapitel 2.2.3 gemessen. Die jeweiligen Ansätze wurden in die Wells gegeben. Nach 30 Minuten wurden 50 µl der Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl zu jedem Well dazugegeben. Um eine Adhäsion der Zellen zu gewährleisten, wurden die E-Plates nach Gebrauchsanweisung erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % wurden die Zellsuspensionen im RTCA DP Device Incubator anschließend

inkubiert. In einem 15 minütigen Intervall wurde für 72 Stunden die Zellimpedanz gemessen und somit die Proliferation, Adhäsion und Funktionsfähigkeit der Zellen aufgezeichnet.

2.2.3.2 MTT-Test

Der MTT-Test dient dem Nachweis der mitochondrialen Aktivität von Zellen. Lebendige Zellen verstoffwechseln das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum violetten, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff. Abgestorbene Zellen dagegen können diesen Stoffwechselvorgang nicht mehr leisten, wodurch die Ergebnisse des Testes die Zellvitalität widerspiegeln. Bei einer Wellenlänge $OD_{570nm/690nm}$ wird die Menge des Formazanes photometrisch bestimmt, wobei die Dichte des Formazanes proportional zur Zellvitalität zunimmt. (Mosmann, 1983)

Um ein Austrocknen der Platten zu verhindern, wurde in die äußere Reihe der Platte je 100 μ l PBS in die Kavitäten pipettiert. Wie auch in den RTCA-Hauptversuchen wurden basierend auf den Vorversuchen pro Ansatz je 5000 Fibroblasten bzw. 10000 Osteoblasten in 100 μ l verschiedenartiger Zellsuspensionen in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 und 72 Stunden wurde zu jedem Well 10 μ l der MTT-Lösung zugefügt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l einer MTT-Solubilisationslösung wurde die Reaktion durch eine Lyse der Zellen gestoppt. Die Kulturplatten wurden daraufhin in Alufolie gewickelt und auf dem Schüttler drapiert, um die Farbstoffkristalle zu lösen. Nach Ablauf von 24 Stunden wurde die Absorption des Formazanfarbstoffes bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen 690 nm Referenzwellenlänge im Photometer bestimmt.

2.2.3.3 Migrationsassay

Zur Bestimmung der Migration der verschiedenen Zellreihen wurden die Migrationsplatten „Culture-Insert 2 Well 24“ von ibidi genutzt (ibidi GmbH, 2021). Bei diesem Test wurden zwei aneinander angrenzende Kammern in einem Well mit der jeweiligen Zellsuspension beimpft und 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellkammern waren durch einen Steg voneinander getrennt. Nachdem die Zellen

an dem Boden angehaftet waren, wurde der Steg zwischen den beiden Kammern gezogen und das Zellmedium mit gewünschten Zusätzen dazugegeben. Die angehafteten Zellen können daraufhin in die entstandene Lücke migrieren. Anhand von mikroskopischen Bildern dieser Lücke in Bezug auf die Zeit kann das Migrationsvermögen der Zellen dargestellt werden.

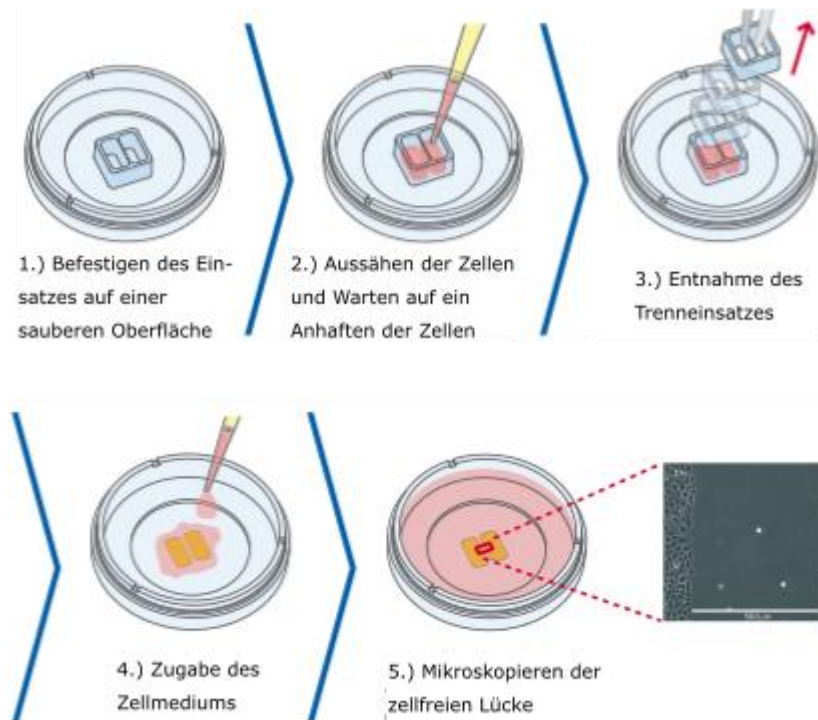


Abbildung 9: Durchführung des Migrationsassays mit den Culture-Inserts 2 von Ibidi (modifiziert nach Ibidi GmbH, 2019)

Zuerst wurde eine optimale Aussaatdichte der Zellen ermittelt. Es zeigten sich folgende Ergebnisse in den Vorversuchen als geeignet: $1,75 \cdot 10^5$ Fibroblasten und $2,00 \cdot 10^5$ Osteoblasten pro Well. Weniger ausgesäte Zellen führten dazu, dass nach 24 Stunden nicht genug Zellen an den Steg gewachsen waren. Bei mehr ausgesäten Zellen wurden diese bei der Ziehung des Stegs mit abgezogen. Zu Beginn wurden die Zellen inklusive Zellmedium als Zellsuspension von 70 μl in jede Kammer gegeben und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser 24 Stunden wurde mikroskopisch geprüft, ob eine vollständige Konfluenz in dem Well vorlag, um nach Ziehung des Steges eine gerade Linie der Zellen zur Lücke hin gewährleisten zu können. Daraufhin wurde der Steg gezogen und die Wells zweimal vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen, um nicht anhaftende

Zellen zu entfernen. Nach dem im Kapitel 2.2.3 angegebenen Schema wurden die verschiedenen Medien dazugegeben. Alle 5-12 Stunden wurde die Migration der Zellen in die Lücke anhand elektronenmikroskopischer Bilder mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop festgehalten. Die Migration der Zellen wurde so bis zum Schluss der Lücke bis zu 7 Tage dokumentiert. Mithilfe des MRI Wound Healing Tool wurde die freie Fläche während der Migration der Zellen bestimmt.

2.2.3.4 Beimpfen der Implantate

Die Implantate wurden in einer Plastikvorrichtung geliefert. Diese Vorrichtung wurde als Stabilisator genutzt, sodass das Implantat nicht vollständig auf dem Boden auflag und sich nicht drehen konnte. Mit einer sterilen Schere wurde das Plastik gekürzt, sodass die Implantate in 12er-Wellplatten passten. Dabei wurde das Implantat an sich nicht berührt, sondern nur am Plastik mit einer sterilen Pinzette gehalten. Die Implantate wurden in die vorhergesehenen Wells gelegt und mit dem jeweiligen Ansatz mit jeweils 3 ml beimpft. Das Beimpfen der Implantate erfolgte nur mit Osteoblasten und nicht mit Fibroblasten.

Durch einen Wash-Assay wurde die Anzahl der an die Implantate angehefteten Zellen ermittelt. Dazu wurden die Suspensionen nach einer Inkubationszeit von 24h abgesaugt und die Implantate vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Nach Überführung in neue Wellplatten erfolgte eine Behandlung mit Trypsin. Dadurch konnten die anhaftenden Zellen von den Implantaten entfernt werden und mit Hilfe des Cedex XS Cell Analyzer (Roche Innovatis AG) gezählt werden. Alle Messungen wurden als Triplikat durchgeführt.

2.2.3.5 Rasterelektronenmikroskopie

Nach dem oben erläuterten Wash-Assay erfolgte eine Fixierung der Osteoblasten an der Oberfläche der Implantate mit 2,5 % Glutaraldehyd und phosphotgepufferter Lösung. Die Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie wurde von dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck übernommen. Zur Trocknung der Implantate wurde eine abgestufte Dehydratation für eine Stunde pro Stufe mit 70-100 % Aceton durchgeführt. Es folgte eine Trocknung mit CO₂

(Polaron). Die Implantate wurden auf Aluminiumpads fixiert und mit Gold besputtert.

Zur Beurteilung der Oberflächenmorphologie der Zellen auf den Implantaten wurde das Rasterelektronenmikroskop Zeiss EVO HD15 (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH) genutzt. Die ultrastrukturellen Veränderungen der angehafteten Osteoblasten wurden semiquantitativ kategorisiert. Die Zellen wurden verglichen in der Größe, der Zell-Zell-Interaktion, der Zelloberfläche und in der Anzahl und Länge der Filopodien.

2.2.4 Statistische Evaluation

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde durch das Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck begleitet. Zur statistischen Evaluation wurde das Programm IBM SPSS Statistics Version 24 genutzt. Alle Experimente wurden als Triplikate in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Die zu Beginn der Arbeit durchgeführten ELISA-Tests und die Implantatversuche wurden nach folgendem Muster evaluiert. Per Varianzanalyse (kurz ANOVA von engl. analysis of variance), korrigiert durch den Bonferroni post hoc, wurden die jeweiligen Ergebnisse ausgewertet. Die statistische Signifikanz wurde als $p \leq 0,05$ festgelegt und die Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Bei der experimentellen Durchführung der Migration und Proliferation (RTCA, Migrationsassay und MTT-Test) erfolgte eine Auswertung mithilfe des Kruskal-Wallis-H und Mann-Whitney-U-Test. Die statistische Signifikanz wurde ebenfalls als $p \leq 0,05$ festgelegt und die Werte wurden als Mittelwert mit einem Konfidenzintervall von 95 % angegeben.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden zuerst die Ergebnisse der Vorversuche dargelegt. Dazu gehören die Ergebnisse der ELISA-Tests zur Messung der Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF-BB und TGF- β 1 als Entscheidungsgrundlage für die Herstellungsweise von PRP und PRF mit dem höchsten Anteil an Wachstumsfaktoren. Zudem sind die Ergebnisse der beiden RTCA-Versuche zur Bestimmung der auszusäenden Zellzahlen und der zu wählenden Konzentrationen der Vertreter von PRP und PRF dargestellt. Hierauf folgt eine Beschreibung der Ergebnisse der Hauptversuche. Diese beinhaltet zunächst einen RTCA-Versuch mit den vorher ausgetesteten Zellzahlen und Konzentrationen der Thrombozytenderivate zur Aussage über die Proliferation der Osteoblasten und Fibroblasten. Zur Bestimmung der Migration folgt ein Migrationsassay. Die Ergebnisse eines MTT-Tests geben Auskunft über die Zellvitalität. Abschließend wird die Anhaftung der Osteoblasten an die enossalen Implantate anhand der Elektronenmikroskopie optisch ausgewertet.

Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass Teile der vorliegenden Ergebnisse bereits veröffentlicht wurden in Steller et al. (2018, 2019a, 2019b).

3.1 Vorversuche

In den folgenden Abschnitten wird zunächst auf die Ergebnisse der Vorversuche eingegangen.

3.1.1 ELISA-Tests zur Messung der Wachstumsfaktoren bei den unterschiedlichen Inkubationsmethoden von PRP und PRF

Zu Beginn wurden verschiedene Herstellungsmethoden von PRP und PRF hinsichtlich ihres Gehaltes an den Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF-BB und TGF- β 1 verglichen, um basierend auf den daraus gewonnenen Ergebnissen mit den Proben mit dem höchsten Gehalt dieser Wachstumsfaktoren weiterzuarbeiten. Zur Messung der Wachstumsfaktoren wurde auf ELISA-Tests als Methode zurückgegriffen. Verglichen wurden die in Kapitel 2.2.2.1 erläuterten Herstellungsmethoden PRP-RT, PRP+CA-RT, PRP-Ink, PRP+Ca-Ink, PRP-FTF, PRP+Ca-FTF, PRF-RT, A-PRF-RT, PRF-Ink, A-PRF-Ink, PRF-FTF und A-PRF-FTF.

3.1.1.1 Freisetzung von VEGF bei der Herstellung der Thrombozytenderivate

Im Vergleich zu allen Inkubationsmethoden zeigte die Herstellung von PRP-FTF die signifikant höchste Freisetzung von VEGF (753.8 ± 39.7 pg/ml), direkt gefolgt von der PRP+Ca-FTF (630.3 ± 44.0 pg/ml). Auch die Herstellungsmethode PRP+Ca-Ink brachte signifikant mehr VEGF hervor (412.3 ± 75.7 pg/ml) verglichen mit den restlichen Methoden. Die gleiche Herstellungsweise des PRP allerdings ohne Ca^{2+} -Aktivierung, also PRP-Ink, erbrachte den niedrigsten VEGF-Gehalt der PRP-Herstellung (101.6 ± 16.6 pg/ml). Die Inkubationsmethoden bei Raumtemperatur mit und ohne Ca^{2+} -Aktivierung, PRP+Ca-RT (119.0 ± 13.0 pg/ml) und PRP-RT (109.8 ± 19.4 pg/ml) unterschieden sich in ihren VEGF-Gehalt nicht signifikant von PRP-Ink.

Bei der PRF-Herstellung zeigte die Inkubationsmethode PRF-Ink den höchsten VEGF-Gehalt (165.3 ± 68.3 pg/ml). Darauf folgte die Methode A-PRF-Ink (163.1 ± 59.7 pg/ml). Bei der Herstellung von A-PRF-FTF (135.2 ± 42.1 pg/ml) und A-PRF-RT (132.1 ± 39.1 pg/ml) prägten sich ähnliche VEGF-Werte aus. Die bei dem gesamten ELISA-Test niedrigste gemessene Freisetzung von VEGF wurde bei der Anfertigung von PRF-RT (33.3 ± 20.0 pg/ml) gesehen, gefolgt von PRF-FTF (67.9 ± 28.1 pg/ml). Ein anschaulicher Vergleich der VEGF-Konzentration der verschiedenen Inkubationsmethoden ist in Abbildung 10 zu finden.

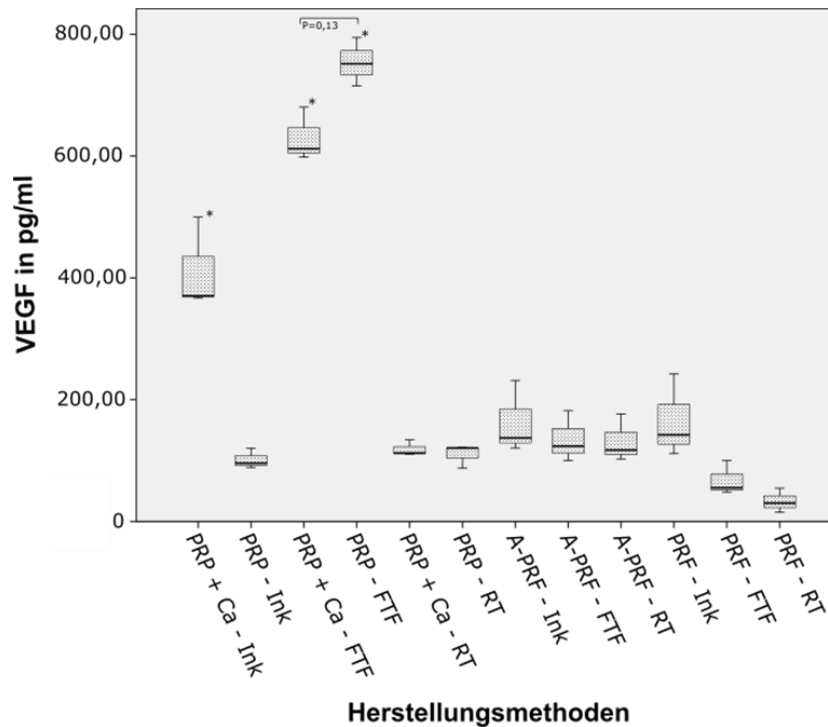


Abbildung 10: VEGF-Anteil in PRP und PRF unter verschiedenen Inkubationsmethoden (* = signifikanter Unterschied zu allen anderen Methoden, außer es ist ein p-Wert angegeben)

3.1.1.2 Freisetzung von PDGF-BB bei der Herstellung der Thrombozytenderivate

Bei der Durchführung des ELISA-Testes zur Messung des Wachstumsfaktors PDGF-BB zeigte das PRP-FTF die höchste Konzentration an PDGF-BB ($14208.9 \pm 1313,1$ pg/ml) mit einem signifikanten Unterschied zu den meisten anderen Inkubationsmethoden außer zu PRP+Ca-Ink (12533.3 ± 869.2 pg/ml). Diese exprimierte die zweithöchste Freisetzung von PDGF-BB. Bei PRP+Ca-FTF konnte eine signifikante Erhöhung des getesteten Wachstumsfaktors im Vergleich zu allen Ansätzen gesehen werden (8631.1 ± 2390.9 pg/ml). Eine Ausnahme bildeten die bereits genannten Ansätze PRP-FTF und PRP+Ca-Ink. Abseits dieser höheren Werte für den Gehalt an PDGF-BB lag die Expression dieses Wachstumsfaktors bei der Produktion von PRP+Ca-RT (1913.4 ± 353.8 pg/ml) und PRP-Ink (1717.7 ± 30.1 pg/ml). Den geringsten Gehalt an PDGF-BB beim Vergleich der verschiedenen Methoden zur Produktion von PRP verzeichnete PRP-RT (1302.2 ± 427.2 pg/ml).

Alle Ansätze der PRF-Herstellung enthielten signifikant weniger PDGF-BB als die drei Ansätze der PRP-Herstellung, die mit den höchsten Konzentrationen dieses Wachstumsfaktors einhergingen, PRP-FTF, PRP+Ca-Ink und PRP+Ca-FTF. In den Inkubationsmethoden A-PRF-Ink (4571.1 ± 1290.2 pg/ml), A-PRF-RT (4568,9 ± 1720.0 pg/ml) und PRF-Ink (4568.9 ± 1530.2 pg/ml) trat zueinander ein ähnlich großer Anteil an PDGF-BB auf. Weniger PDGF-BB konnte bei der Herstellung von A-PRF-FTF (1677.8 ± 636.8 pg/ml) und PRF-FTF (1397.8 ± 599.2 pg/ml) gemessen werden. Die niedrigste Konzentration wurde im Ansatz PRF-RT gefunden (628.9 ± 292.6 pg/ml), wobei ein signifikanter Unterschied zu A-PRF-Ink, A-PRF-RT und PRF-Ink gezeigt werden konnte. Ein detaillierter Vergleich der PDGF-BB-Konzentrationen der einzelnen Ansätze beschreibt die Abbildung 11.

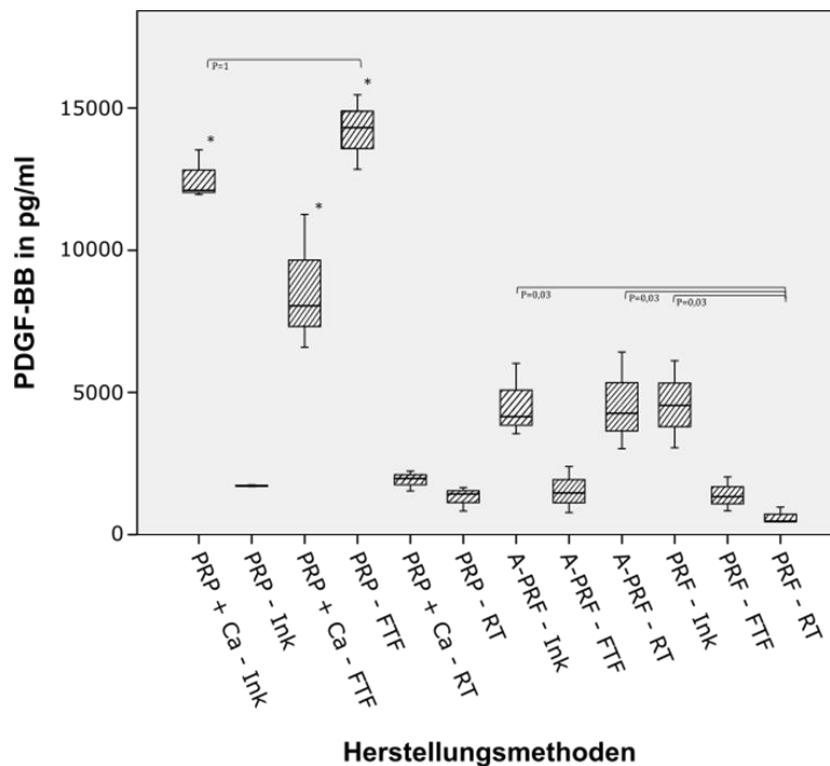


Abbildung 11: PDGF-BB-Anteil in PRP und PRF unter verschiedenen Inkubationsmethoden (* = signifikanter Unterschied zu allen anderen Methoden, außer es ist ein p-Wert angegeben)

3.1.1.3 Freisetzung von TGF- β 1 bei der Herstellung der Thrombozytenderivate

Die höchste Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 ergab sich bei der Inkubationsmethode PRP-FTF (32603.7 ± 8765.7 pg/ml). Es folgten PRP+Ca-FTF (26629.7 ± 5843.1 pg/ml) und PRP+Ca-Ink (23229.6 ± 5277.4 pg/ml). PRP-FTF wies einen signifikanten Unterscheid zu den drei weiteren Herstellungsweisen von PRP auf, die am wenigsten Wachstumsfaktoren beinhalteten. Darunter befanden sich PRP-RT (11259.3 ± 619.3 pg/ml) und PRP-Ink (11670.4 ± 3087.0 pg/ml). Die geringste Anzahl an Wachstumsfaktoren wurde bei der Herstellung von PRP+Ca-RT gemessen (7574.1 ± 2928.3 pg/ml).

In den verschiedenen Inkubationsmethoden der A-PRF und PRF-Gruppen traten keine signifikanten Unterschiede untereinander in der Freisetzung von TGF- β 1 auf: A-PRF-Ink (24900.1 ± 3669.2 pg/ml), A-PRF-FTF (20662.9 ± 5326.4 pg/ml), A-PRF-RT (19163.0 ± 3963.2 pg/ml), PRF-Ink (20055.6 ± 4374.3 pg/ml) und PRF-FTF (16625.9 ± 4988.8 pg/ml). Lediglich die Herstellungsmethode der PRF-RT (4574.1 ± 2542.7 pg/ml), die die niedrigste Konzentration an TGF- β 1 hervorbrachte, zeigte einen signifikanten Unterschied zu PRP+Ca-Ink, PRP+Ca-FTF, PRP-FTF, A-PRF-Ink, A-PRF-FTF, and PRF-Ink. In Abbildung 12 sind die unterschiedlichen Inkubationsmethoden anhand der exprimierten Konzentrationen an TGF- β 1 vergleichend dargestellt.

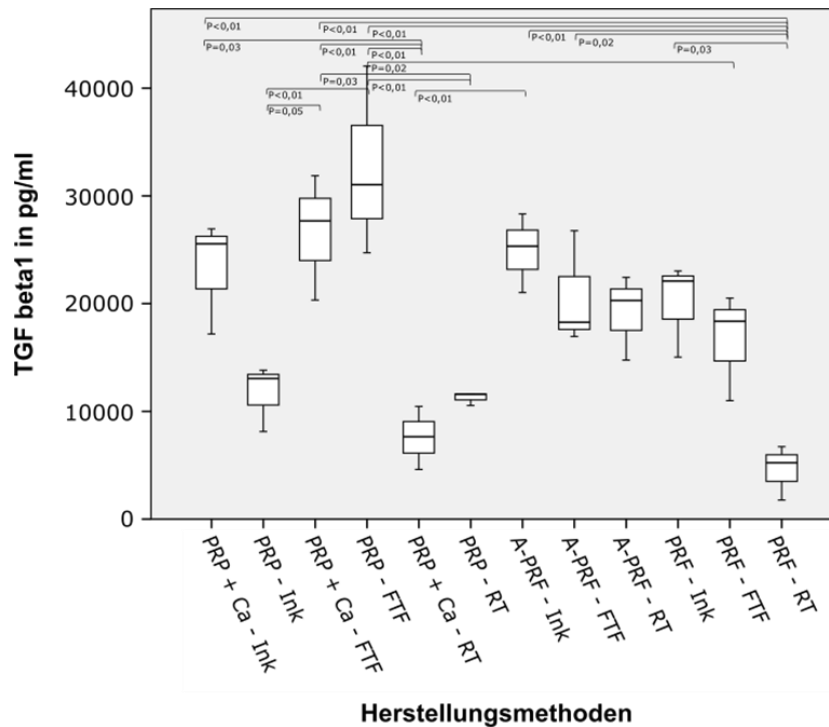


Abbildung 12: TGF- β 1-Anteil in PRP und PRF unter verschiedenen Inkubationsmethoden (* = signifikanter Unterschied zu allen anderen Methoden, außer es ist ein p-Wert angegeben)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen drei ELISA-Tests die höchste Anzahl an Wachstumsfaktoren bei der Freeze-Thaw-Freeze-Methode für PRP (PRP-FTF) gemessen wurde. Hier zeigte sich größtenteils ein signifikanter Unterschied zu den anderen Proben. Dieser Sachverhalt ist durch die drei vorangegangenen Abbildungen nachzuvollziehen. Dies führte dazu, dass in der vorliegenden Arbeit mit der Herstellungsmethode PRP-FTF stellvertretend für die PRP-Ansätze weitergearbeitet wurde. Bei der Herstellung von PRF ging keine Herstellungsmethode mit signifikant mehr Wachstumsfaktoren als die anderen Proben einher. Aufgrund eines am höchsten liegenden Medians wurde sich in diesem Falle entschieden, stellvertretend für die PRF-Ansätze mit der Inkubationsmethode A-PRF-RT weiterzuarbeiten.

3.1.2 RTCA zur Bestimmung der Zellzahlen und Konzentrationen an PRP und PRF

Des Weiteren wurde in den Vorversuchen bestimmt, welche Zellanzahl ausgesät werden sollte, um ein möglichst hohes Zellwachstum bei RTCA- und MTT-Tests zu erreichen. Die Konzentration von PRP und PRF in den jeweiligen Wells spielt zudem eine wichtige Rolle und wurde ebenfalls getestet.

3.1.2.1 Austestung der auszusäenden Zellzahlen

Um die bestmöglichen Umstände für das Zellwachstum in den Hauptversuchen zu erreichen, wurde für jede Zellreihe ein RTCA-Test unter Optimalbedingungen, und wie in Kapitel 2.2.2.3.1 beschrieben, durchgeführt.

Der Zellindex des RTCA-Versuches der Fibroblasten in Bezug auf die Zeit ist in Abbildung 13 verdeutlicht. Nach Ablauf der 72 Stunden ergab hier der Mittelwert der Ansätze mit 5000 Fibroblasten den höchsten Zellindex. Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass bei den Osteoblasten eine Zellzahl von 10000 Zellen den höchsten Zellindex nach 72 Stunden mit sich brachte. Es wurde folglich mit einer Zellzahl von 5000 Fibroblasten und 10000 Osteoblasten weitergearbeitet.

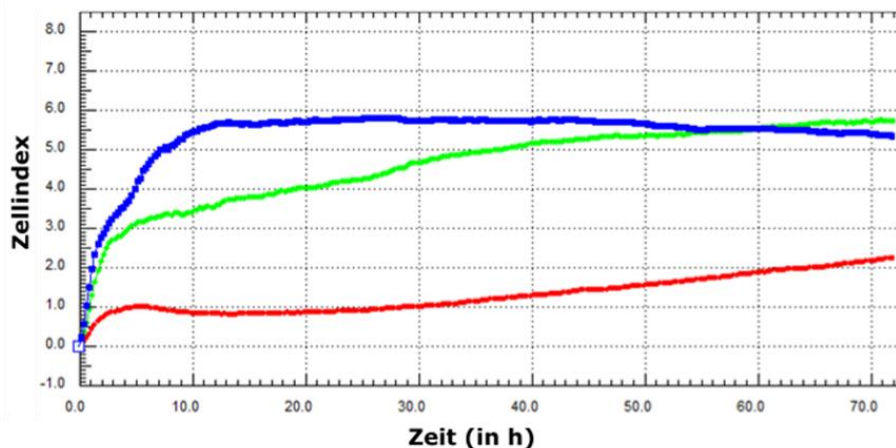


Abbildung 13: Zellindex der Fibroblasten unter Optimalbedingungen in Bezug auf die Zeit (blau = 10000 Zellen, grün = 5000 Zellen, rot = 2000 Zellen)

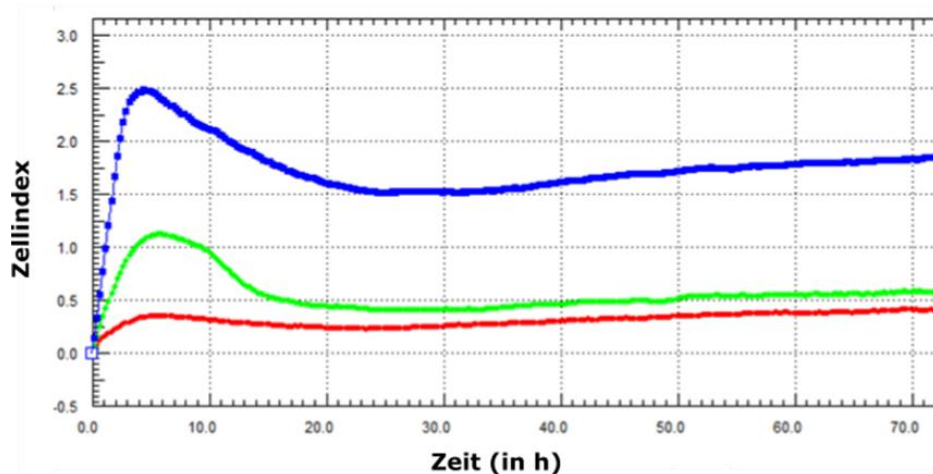


Abbildung 14: Zellindex der Osteoblasten unter Optimalbedingungen in Bezug auf die Zeit (blau = 10000 Zellen, grün = 5000 Zellen, rot = 2000 Zellen)

3.1.3 Austestung der Konzentrationen für PRP und PRF

Zur Komplettierung der Vorversuche wurden daraufhin verschiedene PRP und PRF-Konzentrationen auf ihre Auswirkung auf den Zellindex beim RTCA-Versuch getestet. Beginnend werden die Ergebnisse der PRP-Testung mit beiden Zellreihen besprochen.

Anhand von Abbildung 15 lässt sich zeigen, dass sich der Zellindex der Fibroblasten unter Zugabe von PRP in einer Konzentration von 2,5 % signifikant erhöht darstellte (ZI = 1,25) im Vergleich zu den Ansätzen mit 5 % (ZI = 0,87), 10% (ZI = 0,76) und 50 % (ZI = 0,74) PRP. Der Zellindex der Probe mit einer PRP-Konzentration von 25 % lag mit einem Wert von 1,04 ebenfalls darunter. Auch die Austestung der verschiedenen PRP-Konzentrationen bei den Osteoblasten brachte den höchsten Zellindex (ZI = 2,83) bei einer Konzentration von 2,5 % PRP hervor. Hier bestand eine Signifikanz zu den Ansätzen mit 50 % PRP, bei denen der durchschnittliche Zellindex einen Wert von 1,97 aufwies. In Abbildung 16 lässt sich ebenfalls ablesen, dass die Zellindexe der Proben unter Zugabe von 5 % (ZI = 2,44), 10 % (ZI = 2,77) und 25 % (ZI = 2,45) PRP ebenfalls unter dem Zellindex bei einer Zugabe von 2,5 % PRP lagen.

Der gleiche Versuchsaufbau unter Verwendung von PRF brachte folgende Ergebnisse vor. Der Zellindex der Fibroblasten unter einer PRF-Konzentration von

5 % erwies sich mit einem Wert von 2,36 signifikant als höchster Wert im Vergleich zu den anderen getesteten Proben (2,5%, ZI = 1,18; 10%, ZI = 1,37; 25%, ZI = 1,12; 50%, ZI = 0,71). Auch bei der Testreihe der Osteoblasten wurde unter einer PRF-Konzentration von 5 % der höchste Zellindex mit einem Wert von 3,48 erreicht. Dieser durchschnittliche Wert war signifikant verschieden zu den Versuchsansätzen mit einer Beimpfung der Zellen mit Zellmedium inklusive 25 % PRF (ZI = 2,52) und 50 % PRF (ZI = 1,59). Die PRF-Konzentration von 2,5 % (ZI = 3,02) oder 10 % (ZI = 3,11) siedelten sich ebenfalls unter dem Zellindex unter einer Gabe von 5 % PRF an.

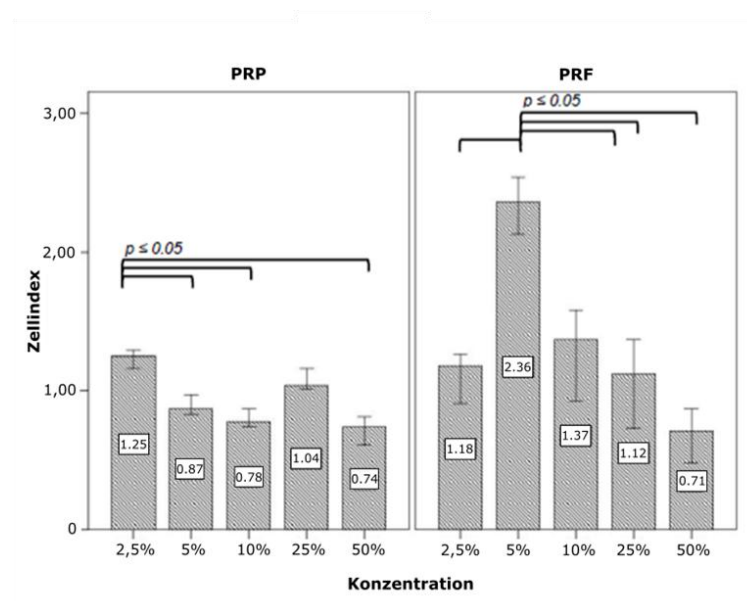


Abbildung 15: Der Effekt von PRP und PRF in verschiedenen Konzentrationen auf den Zellindex (ZI) der Fibroblasten

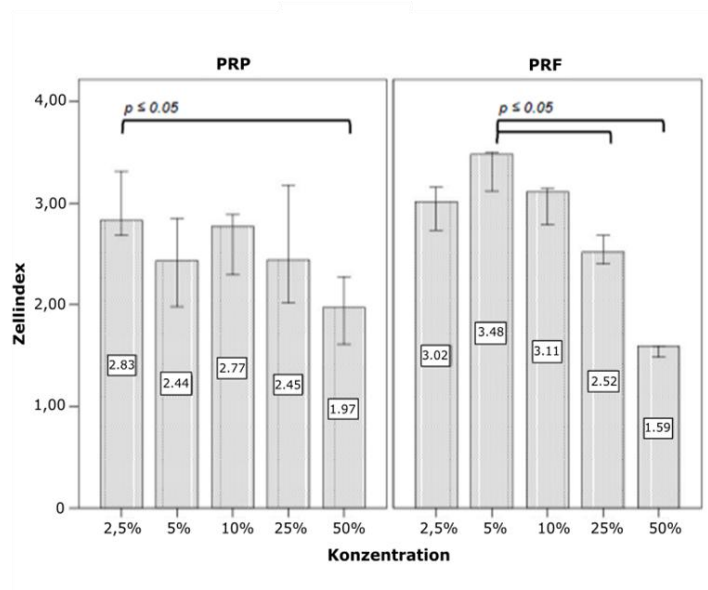


Abbildung 16: Der Effekt von PRP und PRF in verschiedenen Konzentrationen auf den Zellindex (ZI) der Osteoblasten

Zusammengefasst ergab dieser Vorversuch, dass insgesamt die Proliferation der Zellen unter einer Gabe von 2,5 % PRP bzw. 5 % PRF am höchsten ausgefallen ist. Daraus resultierend wurde in den folgenden Hauptversuchen mit diesen Werten weitergearbeitet.

3.2 Hauptversuche

Nach Vervollständigung der Vorversuche wurde mit den Hauptversuchen gestartet. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der RTCA-Tests, Migrationsassays, MTT-Tests und Implantatversuche bearbeitet.

3.2.1 RCTA-Versuch

Die Proliferation der gingivalen Zellen wurde anhand eines RTCA-Versuches getestet. Die Ergebnisse der RTCA-Reihe mit Fibroblasten sind in der folgenden Abbildung 17 und Tabelle 13 (Anhang) dargestellt. In dieser Versuchsreihe induzierte PRF mit einem Zellindex von 4,86 (KI: 4,56 – 5,07) eine signifikante Erhöhung der Proliferation der Fibroblasten nach 72 Stunden verglichen zur Negativkontrolle (1,25; KI: 0,96 – 1,63) und zu den Ansätzen, die PRP enthielten (0,34; KI: 0,00 – 0,67). PRP zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle keinen positiven Effekt auf die Proliferation der Fibroblasten. Unter Zugabe von

Zoledronsäure zur Negativkontrolle trat während der gesamten Zeit ein verringerter Zellindex auf. Nach 72 Stunden lag dieser Zellindex wieder bei 0,00. Eine signifikante Verbesserung dieser Werte schlug sich bei einer gleichzeitigen Gabe von Zoledronsäure und PRF nieder (ZA+PRF = 0,42; KI: 0,06 – 0,88 vs. ZA = 0,00). Zoledronsäure und PRP dagegen unterschieden sich nach 72 Stunden nicht signifikant von der Negativkontrolle und hatten folglich keinen positiven Effekt auf die Proliferation der Fibroblasten (0,09; KI: 0,03 – 0,015).

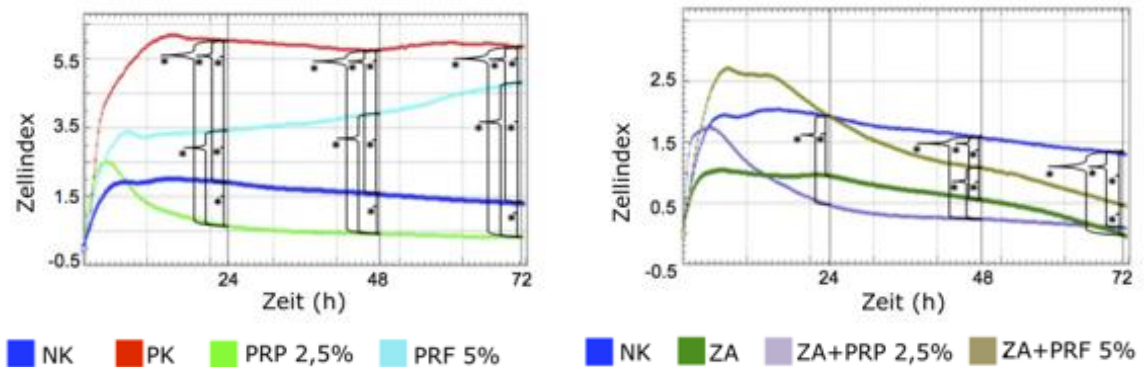


Abbildung 17: Proliferation der Fibroblasten im RTCA-Versuch unter Zugabe von PRP, PRF und ZA

Bei der gleichen Versuchsreihe mit Osteoblasten stellte sich die mit PRF versetzte Probe mit dem höchsten Zellindex mit einem durchschnittlichen Wert von 1,20 (KI: 0,23 – 2,62) nach 72 Stunden dar. Dieser Wert unterschied sich signifikant von der Negativkontrolle (0,24; KI: 0,00 – 1,06) und dem Zusatz von PRP (0,15; KI: 0,00 – 0,42). Die Positivkontrolle lag mit einem Zellindex von 0,98 (KI: 0,08 – 1,13) ebenfalls unter dem Wert von PRF, allerdings bestand hier keine Signifikanz. Unter alleiniger Bisphosphonatgabe lag eine signifikante Reduktion der Osteoblastenproliferation im Vergleich zur Positivkontrolle während des gesamten Zeitraumes vor (ZA = 0,00 vs. PK = 0,08 – 1,13 nach 72 Stunden; $p \leq 0,05$). Eine Zugabe von PRP oder PRF zu Bisphosphonaten ergab nach 72 Stunden keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle. Alle diese drei Ansätze wiesen einen Zellindex mit einem Wert von 0,00 nach 72 Stunden auf. Die genauen Werte aller Ansätze zu jedem Zeitpunkt sind Tabelle 14 (Anhang) zu entnehmen. Abbildung 18 zeigt die unterschiedlichen Verläufe der einzelnen Proben anhand eines graphischen Diagrammes.

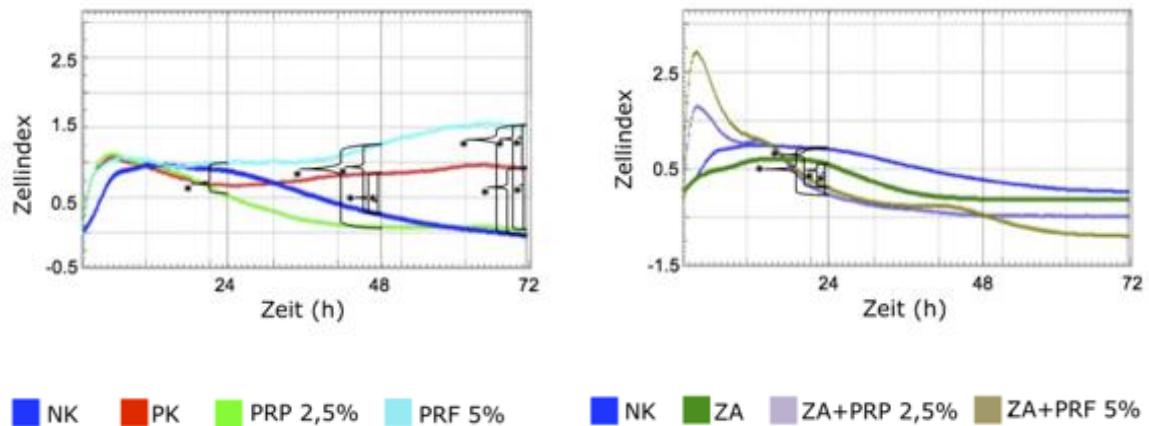


Abbildung 18: Proliferation der Osteoblasten im RTCA-Versuch unter Zugabe von PRP, PRF und ZA

3.2.2 Migrationsassay

Der folgende Abschnitt beschreibt die Ergebnisse der Migrationsassays mit Fibroblasten und Osteoblasten.

Die vorliegende Abbildung 19 zeigt die mikroskopischen Bilder der verschiedenen Ansätze beim Wachstum der Fibroblasten. Bei der Positivkontrolle entstand ein Verschluss der zellfreien Lücke innerhalb von 72 Stunden (96,3 %; KI: 65,8 – 100,00). Unter Reduktion des fetalen Rinderserums auf 1 % als Negativkontrolle konnte ein Verschluss der Lücke von lediglich 12,7 % (KI: 6,0 – 22,6) beobachtet werden. Aus Abbildung 19 und Tabelle 15 (Anhang) kann man entnehmen, dass die Beimpfung der Fibroblasten mit PRP im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen zu einer signifikanten Zunahme der Schließung der Lücke führte ($p \leq 0,05$). Bereits innerhalb von 48 Stunden konnte eine 100 prozentige Konfluenz innerhalb des Wells erreicht werden. Die Stimulation der Fibroblasten durch PRF zeigte ebenfalls nach 48 Stunden einen signifikanten Anstieg der Migration (97,6 %; KI: 73,8 – 100,0; $p \leq 0,05$) im Vergleich zu den positiven und negativen Kontrollgruppen (77,4 %; KI: 60,0 – 95,0 und 13,1 %; KI: 8,5 – 19,6). Ein sichtbarer Verschluss der Lücke trat innerhalb von 72 Stunden auf. Nach alleiniger Zugabe von Zoledronsäure ließ sich keine Zellmigration nachweisen, wobei zudem das Absterben von Zellen festgestellt werden konnte. Bei gleichzeitiger Gabe von Zoledronsäure mit Stimulation durch die

Thrombozytenderivate PRP und PRF wurde zu jedem gemessenen Zeitpunkt eine signifikante Zunahme der Migration im Vergleich zur alleinigen Gabe von Zoledronsäure bemerkt. Beispielsweise ergab eine gleichzeitige Gabe von PRP und Zoledronsäure nach 72 Stunden eine Zellkonfluenz von 100 %, die Zugabe von PRF zu Zoledronsäure 77,8 % (KI: 76,5 – 79,8). Tabelle 15 (Anhang) ist zu jedem Ansatz zu entnehmen, zu wie viel Prozent der Steg zwischen den Zellen durch die wachsenden Fibroblasten verschlossen wurde.

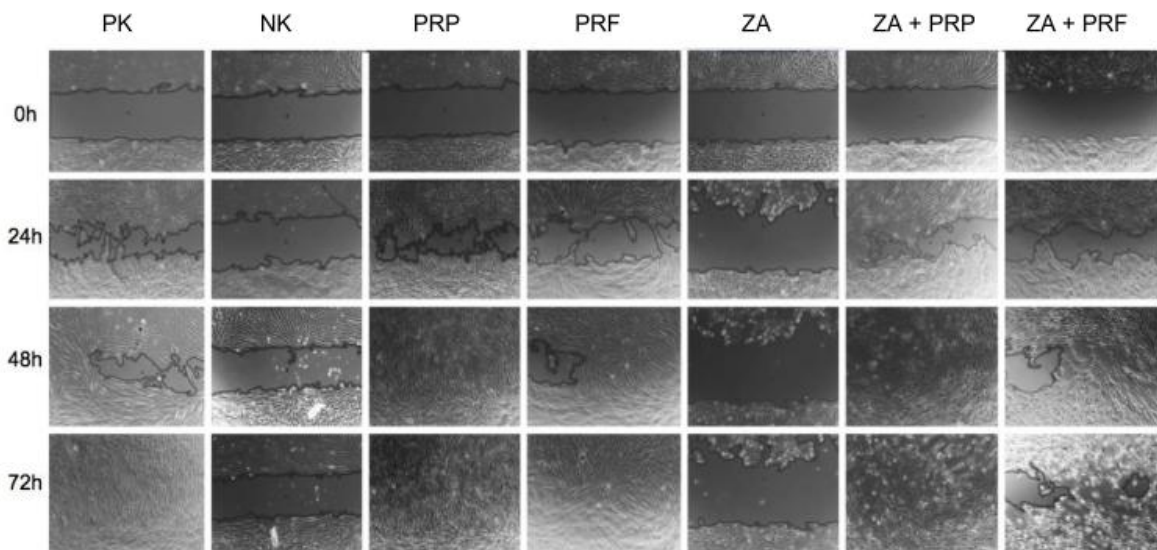


Abbildung 19: Migrationsassay der Fibroblasten. Dargestellt sind beispielhafte Mikroskopien zu jedem Ansatz in Bezug auf die Zeit.

Bei dem Migrationsversuch mit den Osteoblasten wurde festgestellt, dass sich nur unter alleiniger Gabe von PRF nach 72 Stunden eine vollständige Schließung der Lücke zwischen den Zellen ergab. Auch die Positivkontrolle erbrachte zu keinem Zeitpunkt eine Zellkonfluenz von 100 % (60,4 %; KI: 8,6 – 100,0; 50,5 %; KI: 16,9 – 91,4 und 44,4 %; KI: 0,0 – 100,0). Nach 24 Stunden zeigte sich die Negativkontrolle noch mit einer Zellkonfluenz von 16,9 % (KI: 0,0 – 35,8), während im Laufe der Zeit immer mehr Zellen abstarben und keine weitere Zellmigration beobachtet werden konnte. Unter Zugabe von PRP zur Negativkontrolle zeigte sich nach 24 Stunden eine Zellkonfluenz von 67,5 % (KI: 26,7 – 94,5). Diese nahm im weiteren Verlauf der Zeit gleichermaßen ab (47,9 %; KI: 0,0 – 94,3 und 40,6 %; KI: 0,0 – 90,9). Die durchschnittliche Konfluenz der Osteoblasten unter alleiniger

Gabe von Bisphosphonaten lag nach 24 Stunden bei 17,7 % (KI: 0,0 – 45,2) und nach 48 Stunden bereits bei 0,0 %. Im Vergleich dazu zeigte die gleichzeitige Gabe von Bisphosphonaten und PRP eine Konfluenz von durchschnittlich 52 % (KI: 47,9 – 58,4) nach 24 Stunden. Die Migration der Osteoblasten unter Zoledronsäure wurde des Weiteren durch die Zugabe von PRF verbessert. Hierbei war nach 24 Stunden eine Zellkonfluenz von 37,9 % (KI: 17,4 – 63,6) zu erkennen. In Abbildung 20 sind beispielhafte mikroskopische Bilder jedes Ansatzes nach 0, 24, 48 und 72 Stunden verdeutlicht. Die genauen Werte zu jedem Ansatz und bei jedem gemessenen Zeitpunkt sind der Tabelle 16 (Anhang) zu entnehmen.

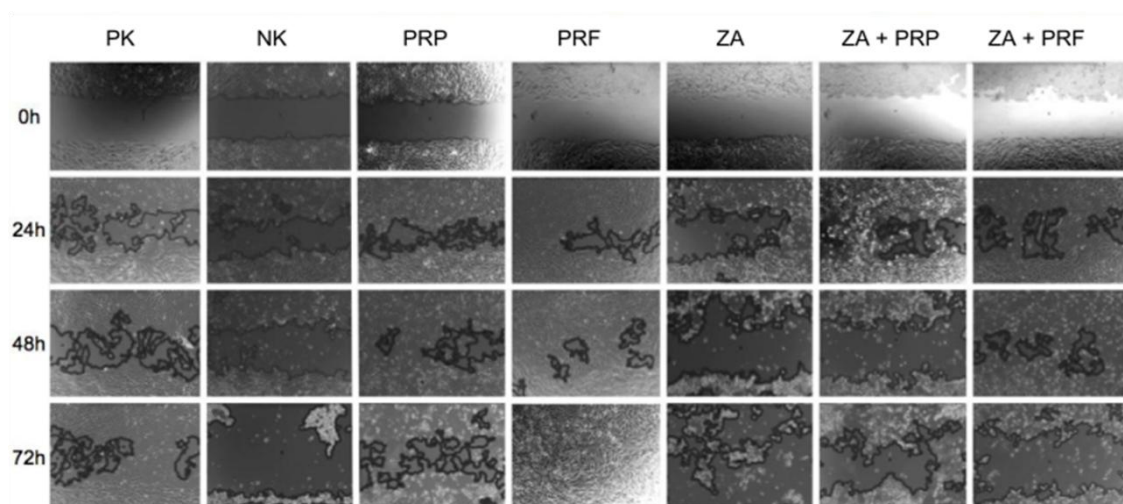


Abbildung 20: Migrationsassay der Osteoblasten. Dargestellt sind beispielhafte Mikroskopien zu jedem Ansatz in Bezug auf die Zeit.

3.2.3 MTT-Test

Durch verschiedene MTT-Tests wurde die Lebensfähigkeit der Fibroblasten und Osteoblasten getestet. Die Ansätze der Positivkontrolle, PRP und PRF zeigten beim MTT-Test einen vergleichbaren Effekt auf die Lebensfähigkeit der Fibroblasten während des gesamten Versuches. Wie in Abbildung 21 und Tabelle 17 (Anhang) zu finden ist, bestand bei allen genannten drei Proben ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle (55,0 %; KI: 44,0 – 67,0 % nach 24 Stunden). Die Zugabe von Bisphosphonaten erzeugte einen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen (67,0 %; KI: 60,0 – 89,0 % nach 24 Stunden). Unter einer gleichzeitigen Gabe von PRF und Bisphosphonaten konnte nach 24 Stunden

ein höherer Wert erkannt werden als bei alleiniger Gabe von Bisphosphonaten (ZA+PRF = 89,0 %; KI: 82,0 – 133,0 % vs. ZA = 67,0 %; KI: 60,0 – 89,0 %). Die Ansätze mit PRP dagegen ergaben keinen Unterschied der Lebensfähigkeit der Fibroblasten zur Negativkontrolle. Im Laufe der Zeit dominierte der zytotoxische Effekt in allen drei Proben, die Bisphosphonat enthielten. Die genauen Werte jedes Ansatzes sind Tabelle 17 (Anhang) zu entnehmen.

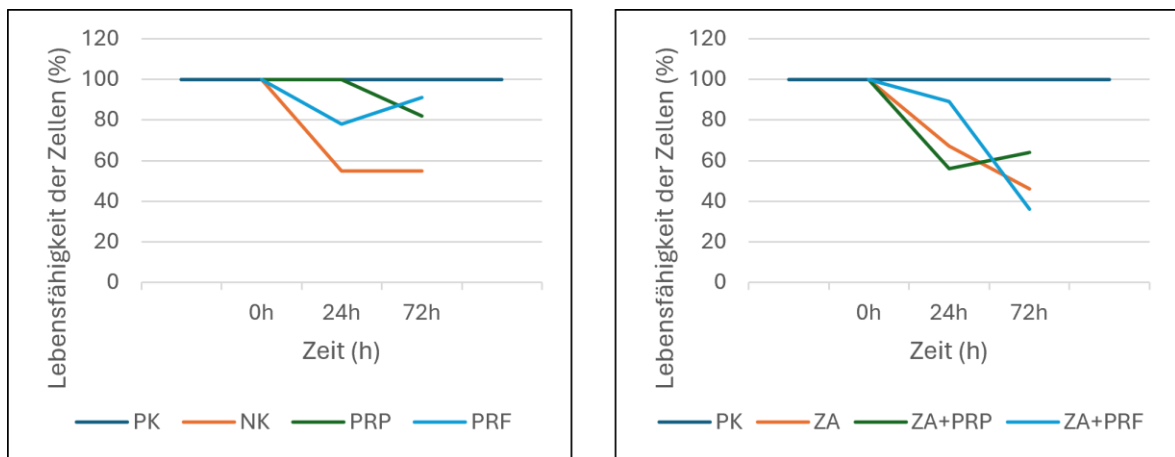


Abbildung 21: MTT-Test der Fibroblasten. Die Positivkontrolle wurde als 100 % definiert.

Im äquivalenten Versuch mit Osteoblasten erwiesen sich die Positivkontrolle, PRP (120,0 %; KI: 102,0 – 127,0 % nach 24 Stunden) und PRF (94,0 %; KI: 93,0 – 113,0 % nach 24 Stunden) ebenfalls als ähnliche Induktoren der Lebensfähigkeit während der gesamten Zeit. Nach 72 Stunden konnte erkannt werden, dass die Negativkontrolle einen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Osteoblasten hat. Mit einem Wert von 38,0 % (KI: 38,0 – 46,0) herrschte ein signifikanter Unterschied zu den drei erstgenannten Ansätzen vor. Unter Einwirkung der Bisphosphonate, einmal mit PRP und einmal mit PRF, bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Proben untereinander. Nach 72 Stunden dominierte auch beim Osteoblastenversuch der zytotoxische Effekt der Bisphosphonate (ZA = 16,0 %, KI: 12,0 – 18,0 %; ZA+PRP = 8,0 %, KI: 8,0 – 14,0 %; ZA+PRF = 14,0 %, KI: 12,0 – 14,0 %). Abbildung 22 und Tabelle 18 zeigen die genauen Werte jedes Ansatzes.

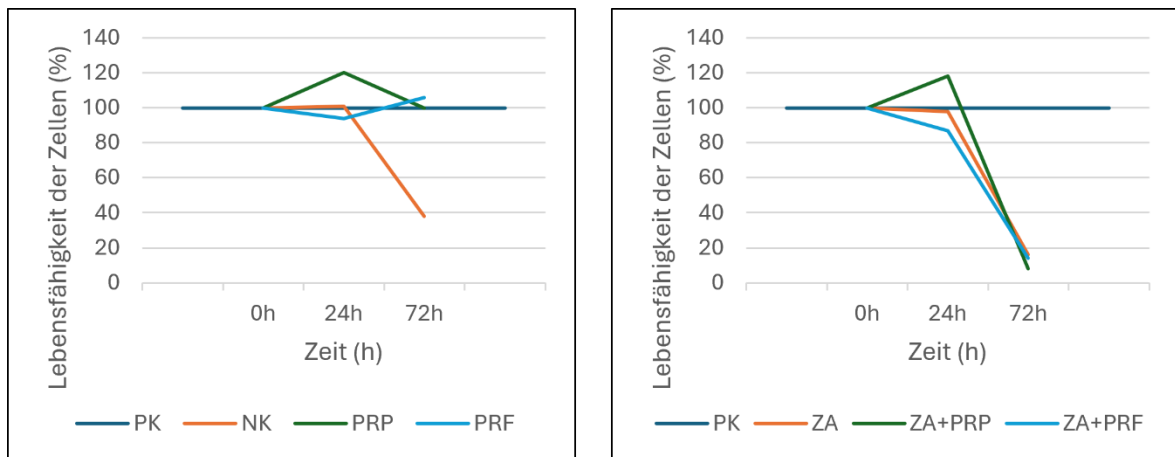


Abbildung 22: MTT-Test der Osteoblasten. Die Positivkontrolle wurde als 100% definiert.

3.2.4 Implantatversuch

Nach der experimentellen Untersuchung der Zelleigenschaften auf Migration und Proliferation wurden Zahnimplantate mit Osteoblasten beimpft. Unter der Zugabe verschiedener Ansätze mit PRP, PRF und Bisphosphonaten wurde die Osteoblastenanhaftung an den Zahnimplantaten und die Morphologie der Zellen unter dem Elektronenmikroskop untersucht.

3.2.4.1 Wash-Assay

Im Wash-Assay zeigte die Positivkontrolle mit durchschnittlich $52,8 \pm 3,5 \times 10^3$ angehafteten Osteoblasten an einem Implantat die höchste gemessene Zellzahl. Unter Gabe von Bisphosphonaten wurden mit $8,4 \pm 1,8 \times 10^3$ Zellen die wenigsten angehafteten Osteoblasten von den Implantaten gewaschen. PRF verursachte eine Anhaftung von $26 \pm 2 \times 10^3$ Osteoblasten und lag somit signifikant über der Negativkontrolle und der Zoledronsäure. Bei der Gabe von PRP wurden $29,6 \pm 7,2 \times 10^3$ Zellen von den Implantaten gewaschen. Ein positiver Effekt prägte sich bei der Zugabe von PRP und PRF zu den Ansätzen mit Zoledronsäure im Vergleich zu einer alleinigen Nutzung von Zoledronsäure aus. (ZA: $8,4 \pm 1,8 \times 10^3$ Zellen; ZA+PRP: $30,4 \pm 5,6 \times 10^3$ Zellen ($p = 0,01$); ZA+PRF: $19,6 \pm 3,6 \times 10^3$ Zellen).
Abbildung 23 Abbildung 23: Wash-Assay der Osteoblasten nach 24 Stundenenthält die grafische Darstellung aller Ansätze im Vergleich zueinander.

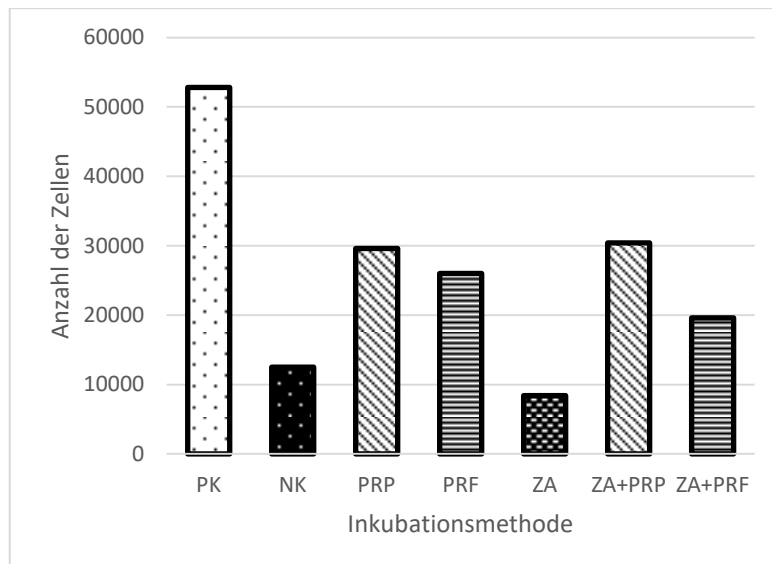


Abbildung 23: Wash-Assay der Osteoblasten nach 24 Stunden

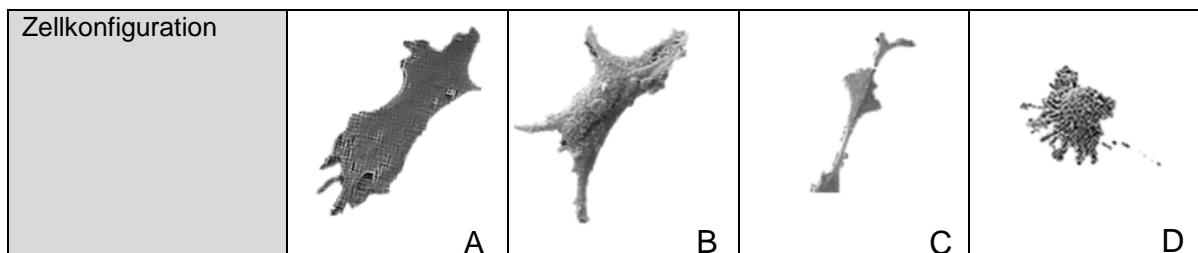
3.2.4.2 Elektronenmikroskopie

Die Struktur der Osteoblasten auf den Implantaten wurde mithilfe eines Elektronenmikroskops semiquantitativ ausgewertet. Dabei wurden die Parameter Zellgröße, Zell-Zell-Adhäsion, Zelloberfläche, Anzahl und Länge der Filopodien bedacht und für jeden Ansatz in Tabelle 9 aufgelistet. Die größte Zellgröße konnte bei der Positivkontrolle gefunden werden. Dahingegen zeigten sich die kleinsten Zellen bei der Negativkontrolle und ZA+PRP. Eine Zell-Zell-Interaktion wurde bei den Implantaten beobachtet, die mit PRP und PRF behandelt wurden. Des Weiteren trat eine vermehrte Zell-Zell-Interaktion bei der Zugabe von PRF zu Bisphosphonaten auf. Bei den restlichen Proben zeigte sich keine erkennbare Interaktion zwischen den an den Implantaten angehafteten Zellen. Die verschiedenen Ansätze brachten außerdem unterschiedliche Zelloberflächen hervor. Während die Positivkontrolle zu flachen Zellen mit einer glatten Oberfläche führte, entstanden bei der Negativkontrolle zylindrische Zellen mit einer rauen Oberfläche, wie in Tabelle 9 und Abbildung 24 angeführt. Unter Zugabe von PRP und PRF prägten sich flachere Zellen mit einer ebenfalls rauen Oberfläche aus. Diese raue Oberfläche wurde unter anderen durch viele kleine, sphärische Blasen verschiedener Größe hervorgerufen, wie in Abbildung 24 zu erkennen ist. Unter PRP-Einfluss entstanden zudem die Zellen mit den längsten Filopodien. Osteoblasten, die unter Bisphosphonaten an die Implantate gewachsen waren,

stellten sich im Kontrast dazu sphärisch und rund dar mit einer verringerten Länge der Filopodien. Die Zugabe von PRF zu Bisphosphonaten wirkte sich lediglich auf die Zell-Zell-Interaktion positiv aus.

Tabelle 9: Semiquantitative Auswertung der Osteoblasten in der Rasterelektronenmikroskopie, bezogen auf die Größe der Zelle, die Zell-Zellinteraktion, die Zelloberfläche und die Anzahl und Länge der Filopodien (0 = keinen sichtbaren Effekt, + = wenig Effekt, ++ = mittlerer Effekt, +++ = hoher Effekt)

	Größe der Zelle	Zell-Zell-Interaktion	Zelloberfläche	Anzahl der Filopodien	Länge der Filopodien
Positivkontrolle (PK)	+++	0	flach, glatt (A)	++	++
Negativkontrolle (NK)	+	0	zylindrisch, rau (C)	++	++
PRP	++	+	flach, rau (B)	+++	++
PRF	++	+	flach, rau (B)	++	+
Bisphosphonat (ZA)	++	0	sphärisch, rau (D)	+	++
Bisphosphonat + PRP (ZA+PRP)	+	0	sphärisch, rau (D)	+	+
Bisphosphonat + PRF (ZA+PRF)	++	+	sphärisch, rau (D)	+	+



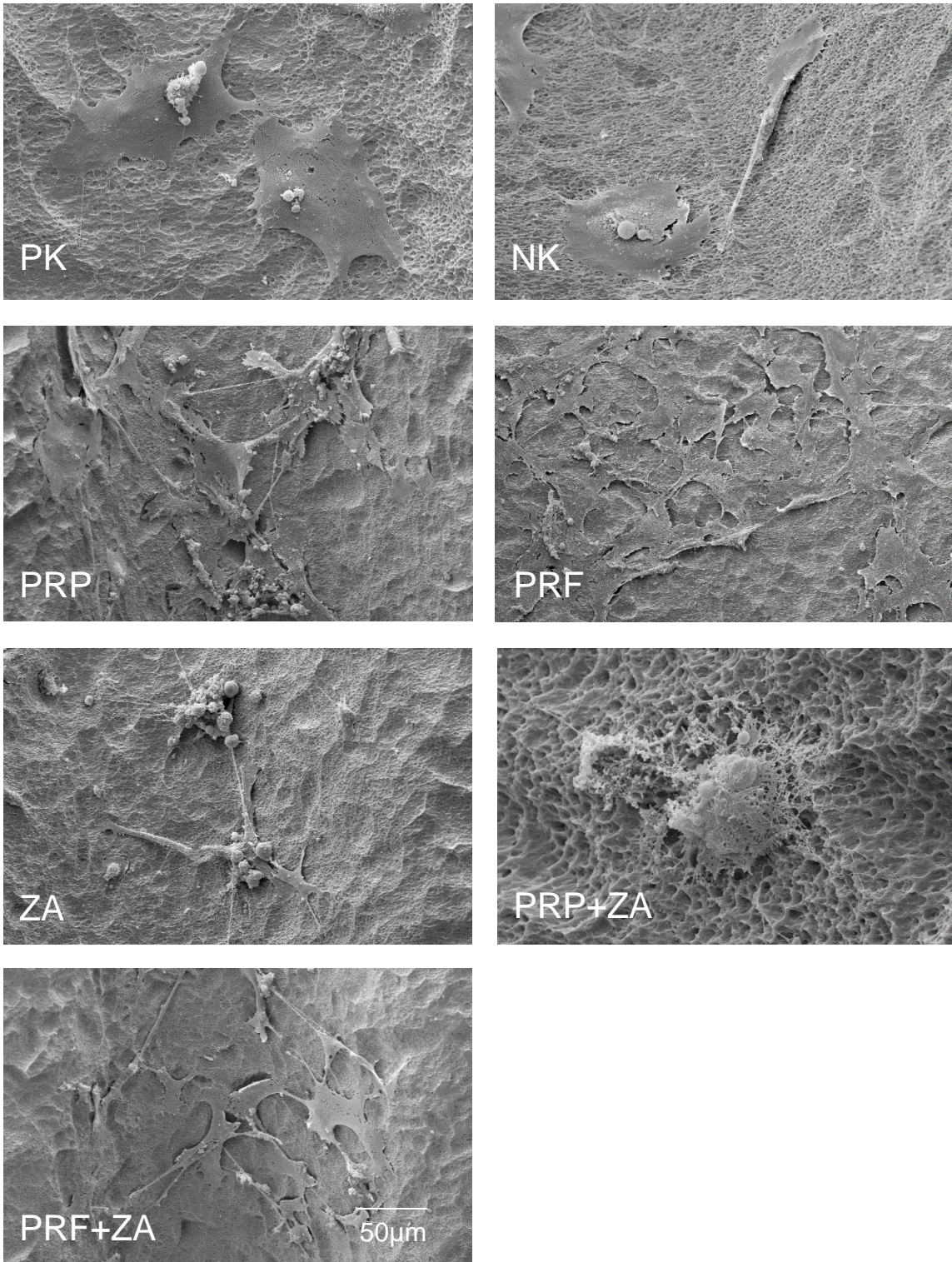


Abbildung 24: Elektronenmikroskopie der Osteoblasten auf den enossalen Implantaten in den verschiedenen experimentellen Ansätzen

4 Diskussion

In der folgenden Diskussion werden zunächst die unterschiedlichen Inkubationsmethoden mit der jeweiligen Expression von Wachstumsfaktoren diskutiert. Die Wirkung der Thrombozytenderivate PRP und PRF auf mit Bisphosphonat behandelte Zellen wird im Folgenden begutachtet. Hierbei wird zunächst auf die Migration und Proliferation der gingivalen Zellen eingegangen. Des Weiteren wird die Anhaftung der Zellen an enossale Implantate besprochen. Es werden die Vor- und Nachteile der Nutzung von PRP und PRF dargestellt. Abschließend wird diskutiert, ob die in dieser Arbeit untersuchten Thrombozytenkonzentrate in die Behandlungsstrategie der BRONJ miteinbezogen werden sollten.

Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass Teile der vorliegenden Diskussion bereits veröffentlicht wurden in Steller et al. (2018, 2019a, 2019b).

4.1 Ausschüttung von Wachstumsfaktoren bei den verschiedenen Inkubationsmethoden zur Herstellung von PRP und PRF

Marx et al. (1998) sind als Vorreiter der PRP-Herstellung bekannt. In ihrer Versuchsreihe von 1998 konnten sie eine Erhöhung der Thrombozytenkonzentration in PRP auf 338 % nachweisen. Zudem konnten sie bereits einen erhöhten Anteil an den Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- β in PRP darstellen. PDGF und TGF- β sind hier als wichtige Faktoren für die Wundheilung zu nennen (Werner & Grose, 2003). Eine Erhöhung des VEGF-Levels wurde in PRP ebenso bereits nachgewiesen (Banks et al., 1998).

In dieser Arbeit wurden als Erstes verschiedene Aktivierungs- und Inkubationsmethoden der Thrombozytenderivate PRP und PRF auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren getestet. Außer der Zugabe von Calcium waren keine Substratzusätze erforderlich.

Der Vergleich zu anderen Studien legt nahe, dass die Methode der PRP oder PRF-Herstellung einen maßgeblichen Anteil an der Höhe der exprimierten Wachstumsfaktoren ausmacht (Zimmermann et al., 2003). Einige vorausgegangene Arbeiten beschrieben verschiedene Methoden zur Herstellung dieser Thrombozytenderivate (Amable et al., 2013; Choukroun et al., 2000; Dohan

et al., 2006; Ghanaati et al., 2014; Glovinski et al., 2016; Kobayashi, Y., 2016; Parrish et al., 2016; Wasterlain et al., 2012).

Eine einheitliche Inkubationsmethode gab es bis dato nicht. Folglich wurden in dieser Arbeit jeweils sechs Inkubationsmethoden für die Bereitung von PRP und PRF miteinander verglichen, um den Vorschlag für ein einheitliches Protokoll zu schaffen. Zur Herstellung der PRP-Reihe wurden gepoolte Thrombozytenkonzentrate aus der krankenhauseigenen Blutspendebank genutzt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten VEGF und PDGF eine signifikante Erhöhung bei den Proben mit PRP-FTF, PRP+Ca-Ink und PRP+Ca-FTF im Vergleich zu allen Proben mit PRF und A-PRF. Generell fiel auf, dass die gemessenen Konzentrationen an Wachstumsfaktoren bei den PRP-Proben im Vergleich zu den PRF- und A-PRF-Ansätzen höher ausfielen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Kobayashi et al., die diesen Sachverhalt in ihrer Studie ebenfalls darstellen konnten (Kobayashi, E. et al., 2016). Folglich kann PRP geeigneter für eine schnelle Bereitstellung an Wachstumsfaktoren sein.

Es gibt verschiedene Gründe, die zu einer erhöhten Messung der Wachstumsfaktoren führen können. Erstens wurden bei der Herstellung von PRP gepoolte Thrombozytenkonzentrate genutzt. Bei dieser Methode ist sichergestellt, dass genügend Thrombozyten zur Chemotaxis oder Freigabe der Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Eine routinemäßige Herstellung in den Blutbanken gewährleistet ein Endprodukt mit einem Thrombozytengehalt von $\geq 2 \times 10^{11}$ /Einheit (Bundesärztekammer, 2023). Bei einer durchschnittlichen Menge von 200 ml bis 350 ml pro Konzentrat ergibt dies eine Thrombozytenanzahl von aufgerundet 6×10^8 /ml bis zu 10^9 /ml (Schrezenmeier et al., 2010). Durch eine Vorschrift der Bundesärztekammer muss es bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten auch zu einer Leukozytendepletion kommen (Bundesärztekammer, 2023). Damit ist gewährleistet, dass die entzündungsfördernden Leukozyten lediglich zu einem geringen Anteil in den fertigen PRP-Ansätzen vorliegen. Im Gegensatz dazu konnten Choukroun und Ghanaati (2017) bei der PRF-Herstellung je nach Zentrifugationskraft einen Thrombozytengehalt von ca. 10^5 /ml bis $7 \cdot 10^5$ /ml erzielen. Hier sind folglich weniger Thrombozyten als in den PRP-Proben enthalten.

Als weiteren Grund für die Messung einer höheren Expression der Wachstumsfaktoren ist die Aktivierungsmethode der Thrombozyten zu sehen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von PRP durch den Freeze-Thaw-Freeze-Zyklus oder durch Calcium zu einer höheren Freisetzung der Wachstumsfaktoren führt als die Herstellungstechniken PRP-Ink und PRP-RT. Die erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF bei der Durchführung eines Freeze-Thaw-Freeze-Zyklus deckt sich mit den Erkenntnissen von Sell et al. (2011). Sie beschrieben in ihrer Studie bereits einen Vorteil zu den gängigen Aktivierungen durch Thrombin oder CaCl_2 . Auch anhand der Studie von Huber et al. (2016) wird gezeigt, dass eine Zugabe von Thrombin nicht erforderlich ist. Denn die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zeigte bei den Proben mit Thrombinzugabe und ohne Thrombinzugabe in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied. Eine Vermeidung der Zugabe von Thrombin oder CaCl_2 erleichtert ferner die Handhabung und macht die Herstellung kostengünstiger. Die vorliegende Studie stellt dar, dass der Freeze-Thaw-Freeze-Zyklus zur Aktivierung ausreichend ist.

Eine dritte mögliche Erklärung für die verringerte Expression von Wachstumsfaktoren in PRF im Vergleich zu PRP wäre, dass Leukozyten, wie sie in PRF enthalten sind, entzündungsfördernd wirken (Choukroun & Ghanaati, 2017). Diese könnten sich negativ auf den Effekt der entzündungslindernden Wachstumsfaktoren, die bei der Herstellung von PRP und PRF anfallen, auswirken. Bei der Erzeugung von PRF als Blutderivat aus Spenderblut könnte es im Vergleich zu der Herstellungsmethode mit PRP zu einer erhöhten Anwesenheit von Leukozyten kommen, welche durch ihre Entzündungsförderung eine Chemotaxis der Wachstumsfaktoren verhindern, da bei der Herstellung von PRF keine Leukozytendepletion verwendet wird. Yin et al. (2016) konnten in ihrer in vitro Studie ebenfalls darstellen, dass leukozytenreiches PRP im Vergleich zu leukozytenarmen PRP einen verringerten Effekt auf die Knochenreparatur hat. Zhou et al. (2015) teilten diese Meinung in ihrem Paper über einen ähnlichen in vitro Versuch mit einem Vergleich über leukozytenarmes und –reiches PRP. Die Nutzung von Leukozyten würde besonders zur Anwesenheit von katabolen, inflammatorischen Zellen führen, wohingegen ein Fehlen von Leukozyten eher anabole Zellen bedingt. Hierbei ist zu unterscheiden, welcher Effekt abschließend

überwiegt. Als Beispiel wird eine überschießende Reaktion des anabolen Effektes mit starker Narbenbildung bei dem Gebrauch von leukozytenarmen PRP genannt, sodass gegebenenfalls auch vom leukozytenreichen PRP Gebrauch gemacht werden sollte. Die endgültige Stellung zur Auswirkung der Leukozyten scheint noch nicht getroffen. Giusti et al. (2018) haben in ihrer in vitro Studie keinen signifikanten Unterschied in der Ausbildung von Wachstumsfaktoren mit oder ohne Anwesenheit von Leukozyten darstellen können.

Kobayashi, E. et al. (2016) konnten zudem in ihrer Studie zum Vergleich der Expression von Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Herstellungsmethoden ebenfalls feststellen, dass PRF zwar eine niedrigere Dosis an Wachstumsfaktoren absondert, dies allerdings sehr konstant geschieht. Dies deckt sich auch mit den Erkenntnissen von He et al. (2009) in ihrer Studie über die Wirkung von PRP und PRF auf Osteoblasten von Ratten. Auch die Kurvenverläufe in den RTCA-Tests mit PRP in der vorliegenden Arbeit schienen einen schnellen Peak als Ausdruck der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren zu haben, dieser nahm dann aber zeitnah ab. Laut Foster et al. (2009) erfolgt die Freisetzung der ersten 70 % der gespeicherten Wachstumsfaktoren in PRP in den ersten zehn Minuten und bis zu 100 % in der ersten Stunde. Es muss sich die Frage gestellt werden, ob diese Zeit nicht bereits bei der Herstellung erreicht ist und die Wachstumsfaktoren nicht den gewünschten Wirkungsort erreichen. Insgesamt sind somit PRP mit seiner schnellen Bereitstellung von Wachstumsfaktoren als auch PRF mit seiner konstanten Bereitstellung relevant für weitere Forschungen.

Durch Zentrifugation des entnommenen Vollblutes entstehen bei der Herstellung von PRF drei Schichten. Als oberste Schicht stellt sich das Blutplasma dar, in der sich unter anderem die Gerinnungsfaktoren befinden. Die mittlere Schicht stellt der sogenannte Buffy Coat als Zwischenschicht dar. In dieser Schicht sind die Leukozyten und Thrombozyten enthalten. (Dohan et al., 2006) Die unterste Schicht repräsentieren die Erythrozyten. Es stellte sich als schwierig heraus, die genaue Trennung zwischen verschiedenen Schichten zu treffen. Ferner stellt sich die Frage, ob eine Wirkung mit oder ohne Buffy Coat effektiver wäre. Denn im Buffy Coat befinden sich sowohl Wachstumsfaktoren exprimierende Thrombozyten als auch entzündungshemmende Leukozyten.

Yin et al. (2017) haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass die Kontamination mit Buffy Coat eher keine größere Auswirkung auf den Gehalt an Wachstumsfaktoren hat, sondern die Zentrifugationskraft die ausschlaggebende Größe ist.

Unter diesem Aspekt lässt sich die Herstellung von PRF und A-PRF vergleichen. Eine schonendere Zentrifugation bei der A-PRF-Herstellung induziert eine verringerte Zerstörung von Thrombozyten, sodass eine erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren gemessen werden konnte. Die Erhöhung war allerdings nicht signifikant im Vergleich zu den Werten bei PRF. Ghanaati et al. (2014) und Kobayashi, E. et al. (2016) haben in ihren Arbeiten ebenfalls gezeigt, dass A-PRF unter schonenderer Zentrifugation zu erhöhten Wachstumsfaktoren führt.

Bei der Exprimierung von VEGF, TGF- β 1 und PDGF-BB zeigten sich bei den Ansätzen der A-PRF Herstellung allerdings keine nennenswerten Unterschiede. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Herstellungsmethode der A-PRF-Proben keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren hat oder dass die angewandten Thrombozytenaktivierungen nicht ausreichend waren, um Wachstumsfaktoren freizusetzen.

Unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren liegt TGF- β 1 in der höchsten Konzentration vor. Diese Erkenntnis deckt sich mit der Studie von Weibrich et al. (2003), die die höchsten Konzentrationen an Wachstumsfaktoren ebenfalls in TGF- β 1 fanden. Auch die ermittelten PDGF-BB-Spiegel (0,5 – 14 ng/ml) und VEGF-Spiegel (0,03 - 0,7 ng/ml) sind vergleichbar mit denen von Banks et al. (1998; VEGF 0,03 - 0,5 ng/ml), Martineau et al. (2004; PDGF-BB $5,9 \pm 2.0$ ng/ml) und Kobayashi, Y. et al. (2016; PDGF-BB 0,3 – 15 ng/ml und VEGF 0,03 – 1 ng/ml).

In der vorliegenden Arbeit wurde sich für die Hauptversuche für das Weiterarbeiten mit PRP-FTF und A-PRF-Ink entschieden. PRP-FTF zeigte hierbei bei allen drei gemessenen Wachstumsfaktoren den höchsten Anteil und hebt sich signifikant gegen den Großteil der anderen Proben ab. Die Wahl des erfolgversprechendsten PRF stellte sich schwierig dar, da sich die Werte ähnelten. Es wurde sich für A-PRF-Ink entschieden, da diese Methode im Vergleich zu den anderen Herstellungsmethoden für PRF durchschnittlich den höchsten Anteil an Wachstumsfaktoren zeigte.

4.2 Die Wirkung der Konzentration der Thrombozytenderivate

Choi et al. (2005) konnten in ihrer Studie in vitro zeigen, dass die Konzentration des PRP ausschlaggebend für die therapeutische Wirkung ist. Sie stellten eine Konzentration von 0,5 - 5 % PRP als passend dar. Ein darüberhinausgehender Anteil an PRP führte zu einer Unterdrückung der Proliferation und Überlebensfähigkeit der von ihnen getesteten Alveolarknochenzellen. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit getesteten PRP-Konzentrationen überein. Aus der RTCA-Methode der Vorversuche in der vorliegenden Arbeit lässt sich ableiten, dass eine Konzentration von über 5 % PRP in der Probe zu einer verringerten Impedanz führte. Die Impedanz gibt Auskunft über die Proliferation, Adhäsion und Funktionsfähigkeit der Zellen. Für die Folgeversuche wurde sich aufgrund der am höchsten gemessenen Impedanz für eine PRP-Konzentration von 2,5 % entschieden. Für die Konzentration an PRF und A-PRF konnten ähnliche Werte dargestellt werden. Bagio et al. (2019) stellten in ihrer Studie ebenfalls dar, dass eine Konzentration von 1 % bis 5 % von PRF ideal ist. Damit von einer Vergleichbarkeit ausgegangen werden kann, wurde eine Konzentration von höchstens 5 % gewählt.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt liegt in der Variabilität der Wachstumsfaktoren im Blut der jeweiligen Spender bei der Herstellung von PRF und A-PRF. Es wurde bereits über eine größere Spanne zwischen der unteren und oberen Wachstumsfaktorausprägung zwischen verschiedenen Spendern berichtet (Kobayashi, E. et al., 2016). Weibrich et al. (2002) konnten in ihrer in vitro Studie zum Gehalt an Wachstumsfaktoren in PRP je nach Alter, Geschlecht und Thrombozytenzahl allerdings keine signifikanten Unterschiede feststellen.

4.3 Die Wirkung von PRP und PRF auf die Migration und Proliferation auf mit Bisphosphonat behandelte Zellen

Im folgenden Abschnitt werden die Wirkung von PRP und PRF auf die mit Bisphosphonat behandelten Zellen diskutiert. Hierbei werden besonders die Ergebnisse der Migration und Proliferation berücksichtigt.

Wie bereits erwartet lag unter der alleinigen Bisphosphonattherapie eine Reduktion der Osteoblastenproliferation und -migration vor, da die Osteoblasten als Hauptangriffspunkt der Bisphosphonatwirkung gelten (Bartl et al., 2006, S.66-68). Auch die Proliferation der Fibroblasten war unter Bisphosphonattherapie gemindert. Dies wurde auch in vergleichbaren bekannten Studien demonstriert (Huang et al., 2015; Jung et al., 2018).

Aus den Ergebnissen der Migrationsassays kann man weiterhin entnehmen, dass beide Zellreihen unter dem Einfluss von Bisphosphonaten durch Zugabe sowohl von PRP als auch von PRF eine verbesserte Migration aufweisen.

Die Zugabe von PRF zu dem Einfluss von Bisphosphonaten zeigte allerdings besonders in der Versuchsreihe der Fibroblasten eine Besserung der Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Osteoblastenproliferation zeigte sich dagegen nur in der Anfangsphase verbessert und nahm im zeitlichen Verlauf ab. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen von Wang et al. (2018), die in ihrer früheren Studie ebenfalls eine höhere Migration und Proliferation von Osteoblasten von PRF im Vergleich zu PRP darstellen konnten.

Vorangegangene weitere Studien stellten die verringerte Auswirkung von PRP auf die Knochenregeneration ebenfalls dar (He et al., 2009; Schlegel et al., 2004). Die Migration von Fibroblasten dagegen wurde durch PRP gefördert. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den Studienergebnissen von Kobayashi, E. et al. (2017), die eine verbesserte Expression der extrazellulären Matrix in Fibroblasten dargestellt haben. Dass PRF einen erhöhten Wirkungsgrad auf das Weichteilgewebe und somit die Fibroblasten hat, wurde bereits in der Literatur aufgegriffen. Besonders der Aufbau einer Fibrinmatrix wird durch das PRF gestärkt. (Pavlovic et al., 2021)

Es gibt einige weitere Studien, die den positiven Effekt auf das Wachstum und die Migration von Fibroblasten im Sinne von Weichteilgewebe sowohl beim Gebrauch von PRP als auch PRF detektieren konnten (Cáceres et al., 2008; Wang et al., 2018).

In den RTCA-Versuchen wurde anfangs immer ein Anstieg des Zellindex gemessen. Dieser könnte durch die Zelladhäsion an den Kammern hervorgerufen werden. Darauffolgend wurde in den Versuchsansätzen des PRF ein stetiger Anstieg der Osteoblasten- und Fibroblastenproliferation gemessen. PRP dagegen erzeugte einen Peak in den RTCA-Versuchen, danach sank die Proliferation langsam. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Migrationsassays. Es spiegelt die schnelle, aber nicht stetige Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wider.

Bei den RTCA-Versuchen kann ebenfalls wieder gemessen werden, dass Bisphosphonate die Proliferation der Zellen stark vermindern. Bei der Zugabe von PRF zu den mit Bisphosphonat behandelten Zellen wird dieser Effekt verringert und die Proliferation der Zellen zeigt sich somit erhöht. Dies lässt schließen, dass PRF die Proliferation der vorliegenden Zellen stärker als PRP fördert. Dies deckt sich mit den Studienergebnissen von Wang et al. (2018).

Diese vorliegenden Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass PRP und PRF die Wundheilung in unter Bisphosphonattherapie stehenden Patienten mit Vorliegen einer BRONJ fördern. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint PRF dabei PRP überlegen zu sein.

4.4 Die Anhaftung von Osteoblasten an enossale Implantate unter Bisphosphonattherapie und dem Einfluss von PRP und PRF

Während des Vorliegens einer BRONJ als gehäuft auftretende Nebenwirkung der Bisphosphonattherapie muss es öfter zum Einsatz von enossalen Implantaten kommen. So scheint es sinnvoll, eine Versuchsreihe zum Anhaftungsvermögen der gingivalen Zellen an eingesetzte Implantate durchzuführen. In der hier vorliegenden Versuchsreihe wurde der Einfluss von PRP und PRF auf dieses Anhaftungsvermögen unter Bisphosphonattherapie untersucht.

Interessant sind besonders die mikroskopischen Darstellungen der Zellen. In bekannten Studien wurden bereits unterschiedliche Formen und Kontaktmuster

definiert, die den Grad der Adhäsion darstellen könnten (Curtis, 1964; Schwartz & Boyan, 1994; Witkowski & Brighton, 1971). Diese wurden auf die vorliegende Arbeit übertragen. Es werden vier Stadien der Zelladhäsion differenziert: Kontakt über Filopodien, Ausdehnung der Filopodien, Ausbreitung des Zytoplasmas, vollständige Ausbreitung zu einer runden oder polygonalen Form (Anselme, 2000; Curtis, 1964; Rajaraman et al., 1974).

In der vorliegenden Arbeit lässt sich eine Veränderung des Zellaussehens in den unterschiedlichen Ansätzen detektieren. Durch die Thrombozytenderivate bilden die Zellen eine erhöhte Länge von Filopodien aus, wodurch von einer Zellausbreitung und Verankerung an der entsprechenden Oberfläche ausgegangen werden kann (Das et al., 2009; Witkowski & Brighton, 1971). Die zudem detektierte erhöhte Zell-Zell-Interaktion der Osteoblasten unter Einwirkung der Thrombozytenderivate spricht zusätzlich für eine verstärkte Adhäsion der Osteoblasten an den Implantaten. Auch Wang et al. (2017) haben bereits in einer Studie gezeigt, dass PRP und PRF die Osseointegration von Zahnimplantaten fördern.

Unter alleiniger Bisphosphonattherapie erscheinen die Zellen sphärisch und mit verringerter Filopodienlänge. Dies sind Zeichen, die gegen eine adäquate Adhäsion der Zellen an die Implantate sprechen. Wie erwartet zeigte sich auch in dieser Versuchsreihe des Wash-Assays die niedrigste Zellzahl unter alleiniger Bisphosphonattherapie. Die Zellen präsentieren sich folglich apoptotisch und stehen nicht für ein adäquates Anwachsen zur Verfügung.

Bei gleichzeitiger Zugabe der Thrombozytenderivate zu den mit Bisphosphonat beimpften Zellen konnte eine verbesserte Anhaftung der Zellen an die Implantate festgestellt werden. Vorliegenden Studien lässt sich entnehmen, dass Wachstumsfaktoren auch die Oberflächenantigene der Osteoblasten aktivieren und sich somit positiv auf deren Oberflächenadhäsionen auswirken können (García-Martínez et al., 2012).

Die Zellen scheinen folglich unter dem Einfluss von Thrombozytenderivaten besser an die Implantate anhaften zu können und wirken dadurch positiv auf das Anwachsen der Implantate in der Gingiva. Die Thrombozytenderivate könnten den negativen Einfluss der Bisphosphonate auf die gingivalen Zellen verringern.

Folglich ist der Gebrauch von Thrombozytenderivaten bei der Nutzung von endossalen Implantaten naheliegend.

4.5 Die Vor- und Nachteile der Nutzung von PRP gegenüber PRF

Bis hierher wurden bereits viele Ergebnisse des Einflusses von PRP und PRF in Bezug auf gingivale Zellen und den Gebrauch von Bisphosphonaten diskutiert. Im folgenden Abschnitt wird auf die Vor- und Nachteile der Nutzung von PRP vs. PRF eingegangen.

Ein Vorteil für den Gebrauch des PRP wäre, dass durch das Vorhandensein von Thrombozytenkonzentraten keine Blutabnahme des Patienten vor Nutzung erfolgen muss. Man könnte auf die Thrombozytenkonzentrate der Blutbank zurückgreifen und spontan handeln. Der Herstellung der Thrombozytenkonzentrate sind strenge Richtlinien auferlegt, sodass man immer eine ähnliche Ausgangssituation hat (Bundesärztekammer, 2023). Auf der anderen Seite muss beachtet werden, dass die Gabe von Spendermaterial potenziell selten auftretende Nebenwirkungen wie anaphylaktische Reaktionen und Fieber bis hin zu bakteriellen Infektionen auslösen kann (Kiefel, 2008). Bis jetzt sind solche Reaktionen allerdings nur bei systemischer Gabe bekannt. Es ist nicht erforscht, ob derartige Reaktionen auch bei topischer Gabe auftreten können. Bis dato sind solche Fälle nicht bekannt. Zudem würde man sich beim Gebrauch von PRP der wertvollen Thrombozytenkonzentrate aus der Blutbank bedienen müssen, die eventuell anderweitig benötigt werden.

PRF dagegen verfügt über ein Fibringerüst, das die Wachstumsfaktoren vor Proteolyse schützt, sodass diese länger vorhanden sind und wirken können (Lundquist et al., 2008). Ein Vorteil wäre auch, dass das Blut dem Patienten selbst abgenommen werden kann und wie oben genannt keine Thrombozytenkonzentrate aus der Blutbank genutzt werden müssen. Auf der anderen Seite kann dies auch bei sehr kranken, blutarmen Patienten ein limitierender Faktor sein. Als autologes Spendermaterial ist PRF eher als nebenwirkungsarm anzusehen.

4.6 Die Stellung von Thrombozytenkonzentraten in der Behandlungsstrategie der BRONJ

Die Behandlung der BRONJ verfolgt stadienabhängig unterschiedliche Behandlungsansätze. Diese basieren auf dem Vorschlag einer Stadieneinteilung der BRONJ durch die AAOMS (Ruggiero et al., 2014). Zur Anwendung kommen je nach Ausmaß der Klinik konservative wie auch chirurgische Maßnahmen. Bis dato werden Antibiotikatherapie, desinfizierende Mundspülungen und eine ausreichende Schmerztherapie als konservative Mittel empfohlen. Die chirurgische Sanierung in höheren Stadien liegt in der möglichst vollständigen Entfernung des nekrotischen Areals und einer darauffolgenden plastischen Deckung unter Antibiotikatherapie. (Schiegnitz et al., 2017)

In den letzten Jahren wird in der Kiefer- und Gesichtschirurgie ein besonderes Augenmerk auf die Forschung der Anwendung von Thrombozytenderivaten gelegt. Einige Studien belegen dabei bereits die Verbesserung der Osteogenese und der generellen Wundheilung durch PRP und PRF. Sarkarat et al. (2014) setzen in ihrer Studie sechs Ratten unter Bisphosphonattherapie und zogen danach den ersten Molaren des Unterkiefers. Nach klinischer Bestätigung der Osteonekrose behandelten sie die Testgruppe mit lokaler Gabe von PRP. In der Epithelisierung und Angiogenese konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe dargestellt werden. Allerdings stellte sich eine signifikante Verbesserung der Vitalität des Knochens nach Behandlung mit PRP dar.

In Bezug auf die BRONJ wurden die Thrombozytenderivate auch in einigen Studien in vivo mit sehr kleinen Probandenzahlen bereits eingesetzt.

Mozzati et al. (2012) konnten in ihrer klinischen Studie positive Ergebnisse bei einer chirurgischen Sanierung der BRONJ unter der Nutzung von wachstumsfaktorreichem Plasma erzielen. Auch Torres et al. (2008) bestätigten die Besserung der Symptome durch den Einsatz von PRP bei Behandlung der BRONJ in ihrem Case Report. Acht Patienten mit vorliegender BRONJ waren in die von Bocanegra-Pérez et al. (2012) durchgeführten Studie eingespannt. Unter PRP-Gabe wurde ein chirurgisches Débridement durchgeführt. Alle Patienten zeigten eine klinische Verbesserung, auch in Folgeuntersuchungen.

All diese Studien beweisen, dass der Einsatz von Thrombozytenderivaten ein großes Potenzial für eine verbesserte Heilung der BRONJ mit sich bringt. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die genannten Aspekte und zeigt ebenfalls die Vorteile der unterschiedlichen Proben auf.

5 Fazit

Im Folgenden werden die Kernkomponenten der vorliegenden Dissertation zusammengefasst und ein Ausblick auf mögliche folgende Arbeiten gestellt.

5.1 Zusammenfassung

Die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (BRONJ) gilt als schwerwiegende Nebenwirkung der Therapie mit Bisphosphonaten, welche bei knochenresorptiven Erkrankungen wie beispielsweise Osteoporose und Knochenmetastasen eingesetzt werden. Die Therapie der BRONJ gilt als komplex und ist noch nicht zufriedenstellend erforscht. Es stellt sich die Frage, ob sich thrombozytenreiches Plasma (PRP) und thrombozytenreiches Fibrin (PRF) aufgrund eines erhöhten Anteils an Wachstumsfaktoren positiv auf die Zellheilung oder das Anwachsen von notwendigen Zahnimplantaten auswirken und dadurch der Ausbildung und Ausprägung einer BRONJ entgegenwirken. Dieser Hypothese wird in der vorliegenden Arbeit nachgegangen.

Zunächst wurden verschiedene Inkubationsmethoden des PRP und PRF in Bezug auf ihren Gehalt an Wachstumsfaktoren in ELISA-Tests verglichen und die Ansätze mit dem höchsten Gehalt für die weiteren Versuche ausgewählt. Als Vertreter der gingivalen Zellen wurden Osteoblasten und Fibroblasten auf ihre Migration und Proliferation unter Zugabe dieser ausgewählten Ansätze von PRP, PRF und Bisphosphonaten getestet. Zur Auswertung wurden Migrationsassays, RTCA und MTT-Tests genutzt, um die Migration und Proliferation der Zellen zu untersuchen. Im nächsten Schritt erfolgte die Beimpfung der enossalen Implantate aus Titan mit Osteoblasten, PRP, PRF und Bisphosphonaten in verschiedenen Ansätzen. Mithilfe eines Wash-Assays wurden die jeweils anhaftenden Osteoblasten gezählt. Die Auswertung der an den Zahnimplantaten angehafteten Zellen bezüglich ihrer Zellmorphologie erfolgte durch eine Rasterelektronenmikroskopie.

Im Migrationsassay zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Verschlusses der zellfreien Zone der Osteoblasten bei der Beimpfung mit PRP und PRF im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Thrombozytenderivate minderten ebenso den negativen Effekt von Bisphosphonaten auf beide Zelllinien. Des Weiteren

verbesserten sich auch die Lebensfähigkeit und Proliferation der Zellen innerhalb der ersten 24 h. Besonders PRF reduzierte den negativen Effekt von Bisphosphonaten auf die Zellproliferation. PRF förderte die Migration der Fibroblasten stärker als die der Osteoblasten. PRP hatte hingegen einen geringeren Effekt auf die Migration der Osteoblasten. Die verminderte Osteoblastenanhaftung an die Implantatoberflächen durch den Einsatz von Bisphosphonaten wurde durch die Verwendung von PRP und PRF gesteigert. In der Rasterelektronenmikroskopie zeigte sich eine verbesserte Zellmorphologie.

Es konnte gezeigt werden, dass Bisphosphonate die Migration und Proliferation gingivaler Zellen reduzieren und die Osteoblastenadhäsion auf Zahnimplantatoberflächen verringern. Die Nutzung von PRP und PRF zeigte positive Auswirkungen auf das Verhalten von Osteoblasten und Fibroblasten unter Bisphosphonateinfluss und erhöhte gleichzeitig die Adhäsion von mit Bisphosphonaten behandelten Osteoblasten auf Implantatoberflächen. Folglich kann eine Behandlung mit PRP und PRF eine positive Auswirkung auf die Therapie der BRONJ haben. Die Thrombozytenderivate können aufgrund der gesteigerten Knochenanlagerung die Nutzung von endossalen Implantaten bei einer BRONJ verbessern. PRF hatte dabei eine größere Auswirkung als PRP.

5.2 Ausblick

In weiterführenden Arbeiten könnten die Konzentrationen von PRP und PRF differenzierter titriert werden. Die Signifikanz in den niedrigen Konzentrationen zeigt eine große Ähnlichkeit, sodass sich die Frage stellt, ob eine Titration noch signifikantere Unterschiede darstellen würde. Für eine endgültigere Vergleichbarkeit kann in Folgeversuchen eine gleiche Konzentration von PRP und PRF gewählt werden.

Des Weiteren zeigte die Herstellungsmethode des Freeze-Thaw-Freeze-Zyklus bei der Herstellung von PRP die signifikant höchste Expressierung an Wachstumsfaktoren und wurde somit für die weiteren Versuche verwendet. Bei der Herstellung von PRF wurde sich für A-PRF-Ink entschieden, da diese Methode im Vergleich zu den anderen Herstellungsmethoden für PRF durchschnittlich den höchsten Anteil an Wachstumsfaktoren zeigte. Dies war allerdings nicht signifikant und sollte in weiteren Studien genauer miteinander verglichen werden.

Erforderlich ist weiterhin eine detaillierte Untersuchung der Beschaffenheit der genutzten Implantate. So können optimale Bedingungen beim Nutzen von PRP und PRF während des Gebrauches der Implantate bei der BRONJ geschaffen werden. Es konnte bereits dargestellt werden, dass eine Zelladhäsion auf Titanimplantaten besser erfolgte als auf glatten Oberflächen (Lumbrikanonda & Sammons, 2001). Somit ist die Wahl der in dieser Versuchsreihe genutzten Titanimplantate bereits eine gute Grundlage für gelungene in vitro Ergebnisse.

Besondere Herausforderungen stellen nun in vivo Studien dar, die untersuchen, welche Kosten-Nutzen-Relation bei der klinischen Anwendung von PRP und PRF bei notwendiger Implantation von endossalen Implantaten bei Patienten mit BRONJ besteht.

Folgend kann der definitive klinische Vorteil einer topischen Anwendung von PRP und PRF im Rahmen von kontrollierten multizentrischen Studien mit hoher Patientenzahl effektiv und zuverlässig evaluiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Id, M.H., Açil, Y., Gottschalk, J., Kreusch, T. (2006). Bisphosphonatassoziierte Osteonekrose des Kiefers. *Mund Kiefer GesichtsChir.* 10: 73-81.
- ACEA Biosciences, Inc. (2013). RTCA DP Instrument Operator´s Manual. San Diego. <https://studylib.net/doc/18500951/rtca-sp-instrument-operator-s-manual> (Zugriff am 20.10.2025).
- Amable, P.R., Carias, R.B.V., Teixeira, M.V.T., da Cruz Pacheco, I., Corrêa do Amaral, R.J.F., Granjeiro, J.M., Borojevic, R. (2013). Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 4 (3): 67.
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 91 (1): 4-15.
- Anselme, K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 21 (7): 667-81.
- Bagio, D.A., Julianto, I., Suprastiwi, E., Margono, A. (2019). Ideal Concentration of Advanced-Platelet Rich Fibrin (A-PFR) Conditioned Media for Human Dental Pulp Stem Cells Differentiation. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* 19 (1): 1-9.
- Banks, R.E., Forbes, M.A., Kinsey, S.E., Stanley, A., Ingham, E., Walters, C., Selby, P J. (1998). Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer.* 77(6): 956-964.
- Bartl, R., von Tresckow, E., Bartl, C. (2006). Bisphosphonat-Manual. Wirkungen-Indikationen-Strategien. *Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Blair, P. und Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 23(4): 177-189.
- Bocanegra-Pérez, S., Vicente-Barrero, M., Knezevic, M., Castellano-Navarro, J. M., Rodríguez-Bocanegra, E., Rodríguez-Millares, J., Pérez-Plasencia, D., Ramos-Macías, A. (2012). Use of platelet-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 41(11): 1410-1415.
- Boonen, S., Sellmeyer, D. E., Lippuner, K., Orlov-Morozov, A., Abrams, K., Mesenbrink, P., Eriksen, E. F., Miller, P. D. (2008). Renal safety of annual zoledronic acid infusions in osteoporotic postmenopausal women. *Kidney Int.* 74(5): 641-648.

- Brunette, D. M. und Chehroudi, B. (1999). The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng.* 121(1): 49-57.
- Bundesärztekammer. (2023). Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie). https://www.wbbaek.de/fileadmin/user_upload/BAEK/Themen/Medizin_und_Ethik/Richtlinie-Haemotherapie-2023_neu2.pdf (Zugriff am 20.10.2025).
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C.; Schallmoser, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials.* 76: 371-387.
- Cáceres, M., Hidalgo, R., Sanz, A., Martínez, J., Riera, P., Smith, P. C. (2008). Effect of Platelet-Rich Plasma on Cell Adhesion, Cell Migration, and Myofibroblastic Differentiation in Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol.* 79(4): 714-720.
- Choi, B.-H., Zhu, S.-J., Kim, B.-Y., Huh, J.-Y., Lee, S.-H., Jung, J.-H. (2005). Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 34(4): 420-424.
- Choukroun, J., Adda, F., Schoeffler, C., Vervelle, A. (2000). Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie* 42: 55-62.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.-O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., Dohan, D. M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101(3): 299-303.
- Choukroun, J. und Ghanaati, S. (2017). 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.* 44(1): 87-95.
- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P. C., Pan, Y.-C. E., Olander, J. V., Connolly, D. T., Stern, D. (1990). Vascular Permeability Factor: A Tumor-derived Polypeptide that Induces Endothelial Cell and Monocyte Procoagulant Activity, and Promotes Monocyte Migration. *J Exp Med.* 172(6): 1535-1545.

- Coleman, R. E., Winter, M.C., Cameron, D., Bell, R., Dodwell, D., Keane, M. M., Gil, M., Ritchie, D., Passos-Coelho, J. L., Wheatley, D., Burkinshaw, R., Marshall, S. J., Thorpe, H. (2010). The effects of adding zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy on tumour response: exploratory evidence for direct anti-tumour activity in breast cancer. *Br J Cancer*. 120(7): 1099-1105.
- Colucci, S., Minielli, V., Zambonin, G., Cirulli, N., Mori, G., Serra, M., Patella, V., Zambonin Zallone, A., Grano, M. (1998). Alendronate Reduces Adhesion of Human Osteoclast-like Cells to Bone and Bone Protein-Coated Surfaces. *Calcif Tissue Int*. 63(3): 230-235.
- Corrado, A, Neve, A., Maruotti, N., Gaudio, A., Marucci, A., Cantatore, F. P. (2010). Dose-dependent metabolic effect of zoledronate on primary human osteoblastic cell cultures. *Clin Exp Rheumatol*. 28(6): 873-879.
- Curtis, A.S. (1964). The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. A Study by Interference Reflection Microscopy. *J Cell Biol* 20(2): 199-215.
- Das, K., Bose, S., Bandyopadhyay, A. (2009). TiO₂ nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell-materials interaction. *J Biomed Mater Res A*. 90(1): 225-237.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., Gogly, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 101(3): 37-44.
- Dohan Ehrenfest, D. M., Diss, A., Odin, G., Doglioli, P., Hippolyte, M.-P., Charrier, J.-B. (2009a). In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 108(3): 341-352.
- Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., Albrektsson, T. (2009b). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 27(3): 158-167.
- Ferrara, N. und Davis-Smyth, T. (1997). The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocri Rev*. 18(1): 4-25.
- Fleisch, H., Graham, R., Russell, G., Francis, M. D. (1969). Diphosphonates Inhibit Formation of Calcium Phosphate Crystals in vitro and Pathological Calcification in vivo. *Science*. 165 (3899): 1262-1264.
- Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B., Rodeo, S. A. (2009). Platelet-Rich Plasma: From Basic Science to Clinical Applications. *Am J Sports Med*. 37(11): 2259-2272.

- Fredriksson, L., Li, H., Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(4): 197-204.
- Freiberger, J. J., Padilla-Burgos, R., McGraw, T., Suliman, H. B., Kraft, K. H.; Stolp, B. W.; Moon, R. E.; Piantadosi, C. A. (2012). What Is the Role of Hyperbaric Oxygen in the Management of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Randomized Controlled Trial of Hyperbaric Oxygen as an Adjunct to Surgery and Antibiotics. *J Oral and Maxillofac Surg.* 70(7): 1573-1583.
- Frost, H. M. (1969). Tetracycline-based Histological Analysis of Bone Remodeling. *Calcif Tissue Res.* 3(3): 211-237.
- García-Martínez, O., Reyes-Botella, C., Díaz-Rodríguez, L., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Vallecillo-Capilla, M. F., Ruiz, C. (2012). Effect of platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its clinical impact. *J Oral Maxillofac Surg.* 70(7): 1558-1564.
- Gerard, D. A., Carlson, E. R., Gotcher, J. E., Pickett, D. O. (2014). Early Inhibitory Effects of Zoledronic Acid in Tooth Extraction Sockets in Dogs Are Negated by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein. *J Oral and Maxillofac Surg.* 72(1): 61-66.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M.; Barnes, G. L.; Graves, D. T.; Einhorn, T. A. (2003). Fracture Healing as a Post-Natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation. *J Cell Biochem.* 88(5): 873-884.
- Ghanaati, S., Booms, P., Orlowska, A., Kubesch, A., Lorenz, J., Rutkowski, J., Landes, C., Sader, R.; Kirkpatrick, C. J.; Choukroun, J. (2014). Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. *J Oral Implantol.* 40(6): 679-689.
- Giusti, I., Di Francesco, M., D'ascenzo, S., Palumbo, P., Rughetti, A., Dell'orso, L., Varasano, P. A., Pressanti, G. L., Dolo, V. (2018). Leukocyte depletion does not affect the in vitro healing ability of platelet rich plasma. *Exp Ther Med.* 15(4): 4029-4038.
- Glovinski, P. V., Herly, M., Mathiasen, A. B., Svalgaard, J. D., Borup, R., Talman, M.-L. M., Elberg, J. J., Kølle, S.-F. T., Drzewiecki, K. T., Fischer-Nielsen, A. (2016). Overcoming the bottleneck of platelet lysate supply in large-scale clinical expansion of adipose-derived stem cells: A comparison of fresh versus three types of platelet lysates from outdated buffy coat-derived platelet concentrates. *Cytotherapie.* 19(2): 222-234.
- Green, J. R. (2005). Zoledronic acid: pharmacologic profile of a potent bisphosphonate. *J Org Chem.* 69(10): 2439-2448.

- Hansen, T., Kunkel, M., Weber, A., Kirkpatrick, C. J. (2006) Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates - histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med.* 35(3): 155-160.
- He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y.; Wu, H. (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 108(5): 707-713.
- Heldin, C.-H. und Westermark, B. (1999). Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol Rev.* 79(4): 1283-1316.
- Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F., Karsdal, M. A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone.* 44(6): 1026-1033.
- Hexal AG. (2024). Fachinformation Zoledronsäure HEXAL® 4 mg/5 ml. https://hexal-de.cms.sandoz.com/sites/default/files/pim_assets/doc_de-de_24121010391.pdf (Zugriff am 20.10.2025).
- Huang, K.-C., Cheng, C.-C., Chuang, P.-Y., Yang, T.-Y. (2015). The effects of zoledronate on the survival and function of human osteoblast-like cells. *BMC Musculoskelet Disord.* 16(1): 355
- Huber, S. C., Cunha, J. L., Montalvão, S. A. L., da Silva, L. Q., Paffaro, A. U., da Silva, F. A. R., Rodrigues, B. L., Lana, J. F. S. D., Annichino-Bizzacchi, J. M. (2016). In vitro study of the role of thrombin in platelet rich plasma (PRP) preparation: utility for gel formation and impact in growth factors release. *J Stem Cells Regen Med.* 12(1): 2-9.
- Hughes, D. E., Wright, K. R., Uy, H. L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G. D., Mundy, G. R., Boyce, B. F. (1995). Bisphosphonates Promote Apoptosis in Murine Osteoclasts In Vitro and In Vivo. *J Bone and Miner Res.* 10(10): 1478-1487.
- Ibidi GmbH. (2019). ibidi Application Guide. Wound Healing and Migration Assays. https://ibidi.com/img/cms/resources/AG/FL_AG_033_Wound_Healing_150dpi.pdf (Zugriff am 20.10.2025).
- Ibidi GmbH. (2021). Instructions Culture-Insert 2 Well. https://ibidi.com/img/cms/products/labware/open_removable/E_8XXXX_CI_2Well/IN_8XXXX_CultureInsert_2Well.pdf (Zugriff am 20.10.2025).

- Jung, J., Park, J. S., Righesso, L., Pabst, A. M., Al-Nawas, B., Kwon, Y.-D., Walter, C. (2018). Effects of an oral bisphosphonate and three intravenous bisphosphonates on several cell types in vitro. *Clin Oral Investig.* 22(7): 2527-2534.
- Kakudo, N., Minakata, T., Mitsu, T., Kushida, S., Notodihardjo, F. Z., Kusumoto, K. (2008). Proliferation-Promoting Effect of Platelet-Rich Plasma on Human Adipose-Derived Stem Cells and Human Dermal Fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 122(5): 1352-1360.
- Kiefel, Volker. (2008). Reactions Induced by Platelet Transfusions. *Transfus Med Hemother.* 35(5): 354–358.
- Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., Miron, R. J. (2016). Comparative release of growth factors from PRP, PRF and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 20(9): 2353-2360.
- Kobayashi, E., Fujioka-Kobayashi, M., Sculean, A., Chappuis, V., Buser, D., Schaller, B., Dóri, F., Miron, R. J. (2017). Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral Health.* 17(1): 1-10.
- Kobayashi, Y., Saita, Y., Nishio, H., Ikeda, H., Takazawa, Y., Nagao, M., Takaku, T., Komatsu, N., Kaneko, K. (2016). Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci.* 21(5): 683-689.
- Landesberg, R., Cozin, M., Cremers, S., Woo, V., Kousteni, S., Sinha, S., Garrett-Sinha, L., Raghavan, S. (2008). Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* 66(5): 839-847.
- Lee, C. Y. S., David, T., Nishime, M. (2007). Use of Platelet-Rich Plasma in the Management of Oral Bisphosphonate-Associated Osteonekrosis of the Jaw: A Report of 2 Cases. *J Oral Implantol.* 33(6): 371-382.
- Li, E. C. und Davis, L. E. (2003). Zoledronic Acid: A New Parenteral Bisphosphonate. *Clin Ther* 25(11): 2669-2708.
- Lumbikanonda, N. und Sammons, R. (2001). Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 16(5): 627-636.
- Lundquist, R., Dziegiel, M. H. und Ågren, M. S. (2008). Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen.* 16(3): 356-363..

- Martineau, I., Lacoste, E., Gagnon, G. (2004). Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: Kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials*. 25(18): 4489–4502.
- Marx, R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral and Maxillofac Surg*. 61(9): 1115-1117.
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod*. 85(6): 638-646.
- Marx, R. E., Fortin, M., Broumand, V. (2005). Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 63(11): 1567-1575.
- Meheux, C. J., McCulloch, P. C., Lintner, D. M., Varner, K. E.; Harris, J. D. (2016). Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Arthroscopy*. 32(3): 495-505.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2): 55-63.
- Mozzati, M., Arata, V., Giacomello, M., Del Fabbro, M., Gallesio, G. (2015). Failure risk estimates after dental implants placement associated with plasma rich in growth factor-Endoret in osteoporotic women under bisphosphonate therapy. *J Craniofac Surg*. 26(3): 749-755.
- Mozzati, M., Gallesio, G., Arata, V., Pol, R., Scoletta, M. (2012). Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a report of 32 cases. *Oral Oncol*. 48(5): 469-474.
- Mücke, T., Koschinski, J., Deppe, H., Wagenpfeil, S., Pautke, C., Mitchell, D. A., Wolff, K.-D., Hölzle, F. (2011). Outcome of treatment and parameters influencing recurrence in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Cancer Res Clin Oncol*. 137(5): 907-913.
- Otto, S., Hafner, S., Mast, G., Tischer, T., Volkmer, E., Schieker, M., Stürzenbaum, S. R., von Tresckow, E., Kolk, A., Ehrenfeld, M., Pautke, C. (2010). Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: Is pH the Missing Part in the Pathogenesis Puzzle? *J Oral and Maxillofac Surg*. 68(5): 1158-1161.

- Otto, S., Schreyer, C., Hafner, S., Mast, G., Ehrenfeld, M., Stürzenbaum, S., Pautke, C. (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - Characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg.* 40(4): 303-309.
- Parrish, W. R., Roides, B., Hwang, J., Mafilios, M., Story, B., Bhattacharyya, S. (2016). Normal platelet function in platelet concentrates requires non-platelet cells: a comparative in vitro evaluation of leucocyte-rich (type 1a) and leucocyte-poor (type 3b) platelet concentrates. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2(1): e000071.
- Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V., Trandafilovic, M., Stojanovic, P. (2021). Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Med (Wars)* 16(1): 446-454.
- Pazianas, M., Compston, J. Huang, C. L.-H. (2010). Atrial Fibrillation and Bisphosphonate Therapy. *J Bone Miner Res* 25(1): 2-10.
- R&D Systems, Inc. (2019a). Quantikine ELISA Human PDGF-BB Immunoassay. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dbb00.pdf?v=20210406> (Zugriff am 20.10.2025).
- R&D Systems, Inc. (2019b). Quantikine ELISA Human TGF- β 1 Immunoassay. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/db100b.pdf?v=20210406> (Zugriff am 20.10.2025).
- R&D Systems, Inc. (2019c). Quantikine ELISA Human VEGF Immunoassay. <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dve00.pdf?v=20210406> (Zugriff am 20.10.2025).
- Rajaraman, R., Rounds, D. E., Yen, S. P., Rembaum, A. (1974). A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res.* 88(2): 327-339.
- Ravosa, M. J., Ning, J., Liu, Y., Stack, M. S. (2011). Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 56(5): 491-498.
- Riddle, R. C. und Clemens, T. L. (2017). Bone Cell Bioenergetics and Skeletal Energy Homeostasis. *Physiol Rev.* 97(2): 667-698.
- Roberts, T. T. und Rosenbaum, A. J. (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics - The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* 8(4): 114-124.

- Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Assael, L. A.; Landesberg, R.; Marx, R. E.; Mehrotra, B. (2009). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw — 2009 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 67(5): 2-12.
- Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Fantasia, J., Goodday, R., Aghaloo, T., Mehrotra, B., O’Ryan, F. (2014). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw — 2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg.* 72(10): 1938-1956.
- Russell, R. G. G., Watts, N. B., Ebetino, F. H., Rogers, M. J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 19(6): 733-759.
- Saag, K., Lindsay, R., Kriegman, A., Beamer, E., Zhou, W. (2007). A single zoledronic acid infusion reduces bone resorption markers more rapidly than weekly oral alendronate in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone* 40(5): 1238-1243.
- Santini, D., Vincenzi, B., Dicuonzo, G., Avvisati, G., Massacesi, C., Battistoni, F., Gavasci, M., Rocci, L., Tirindelli, M. C., Altomare, V., Tocchini, M., Bonsignori, M., Tonini, G. (2003). Zoledronic Acid Induces Significant and Long-Lasting Modifications of Circulating Angiogenic Factors in Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 9(8): 2893-2897.
- Sarkarat, F., Motamedi, M. H. K., Jahanbani, J., Sepehri, D., Kahali, R., Nematollahi, Z. (2014). Platelet-Rich Plasma in Treatment of Zoledronic Acid-Induced Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws. *Trauma Mon.* 19(2): e17196.
- Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D. D., Golub, E., Rodan, G. A. (1991). Bisphosphonate Action. Alendronate Localization in Rat Bone and Effects on Osteoclast Ultrastructure. *J Clin Invest.* 88(6): 2095-2105.
- Schiegnitz, E., Al-Nawas, B., Hoefert, S., Otto, S., Pautke, C., Ristow, O., Voss, P., Grötz, K. A. (2017). S3-Leitlinie Antiresorptiva-assoziierte Kiefernekrosen (AR-ONJ). AWMF Registernummer: 007-091.
- Schlegel, K.A., Donath, K., Rupprecht, S., Falk, S., Zimmermann, R., Felszeghy, E., Wiltfang, J. (2004). De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 25(23): 5387–5393.

- Schrezenmeier, H., Müller, M. M. und Seifried, E. (2010). Thrombozyten-Transfusionen: Aktuelle Aspekte und Kommentar zu Kapitel 2 „Thrombozytenkonzentrate“ der Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der Bundesärztekammer 2008. *Hämotherapie* 14: 16-23.
- Schwartz, Z. und Boyan, B. D. (1994). Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* 56(3): 340–347.
- Sell, S. A., Wolfe, P. S., Ericksen, J. J., Simpson, D. G., Bowlin, G. L. (2011). Incorporating Platelet-Rich Plasma into Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part A* 17(21-22): 2723-2737.
- Shen, J., Li, S., Chen, D. (2014). TGF- β signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res.* 2: 14002.
- Sims, N. A. und Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 19(5): 444-451.
- Steller, D., Herbst, N., Pries, R., Juhl, D., Hakim, S. G. (2018). Impact of incubation method on the release of growth factors in Non-Ca²⁺-activated PRP, Ca²⁺-activated PRP, PRF and A-PRF. *J Craniomaxillofac Surg.* 47(2): 365-372.
- Steller, D., Herbst, N., Pries, R., Juhl, D., Hakim, S. G. (2019a). Positive impact of Platelet-rich plasma and Platelet-rich fibrin on viability, migration and proliferation of osteoblasts and fibroblasts treated with zoledronic acid. *Sci Rep.* 9: 1-11.
- Steller, D., Herbst, N., Pries, R., Juhl, D., Klinger, M., Hakim, S. G. (2019b). Impacts of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma on primary osteoblast adhesion onto titanium implants in a bisphosphonate in-vitro model. *J Oral Pathol Med.* 48(10): 943-950.
- Stumpe, M. R., Chandra, R. K., Yunus, F., Samant, S. (2009). Incidence and risk factors of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws. *Head Neck* 31(2): 202-206.
- Torres, J., Tamimi, F., García, I., Cebrian, J. L., López-Cabarcos, E., Lopez, A. (2008). Management of atrophic maxilla in severe osteoporosis treated with bisphosphonates: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106(5): 668-672.
- Ulfig, N. (2005). Kurzlehrbuch Histologie. 2., korrigierte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

- Vescovi, P., Merigo, E., Manfredi, M., Meleti, M., Fornaini, C., Bonanini, M., Rocca, J. P., Nammour, S. (2008). Nd:YAG Laser Biostimulation in the Treatment of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaw: Clinical Experience in 28 Cases. *Photomed Laser Surg.* 26(1): 37-46.
- Wang, X., Zhang, Y., Choukroun, J., Ghanaati, S., Miron, R. J. (2017). Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. *Int J Mol Sci.* 18(2): 331.
- Wang, X., Zhang, Y., Choukroun, J., Ghanaati, S., Miron, R. J. (2018). Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets* 29(1): 48-55.
- Wasterlain, A. S., Braun, H. J., Dragoo, J. L. (2012). Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma. *Oper Tech Orthop.* 22(1): 33-42.
- Wehrhan, F., Hyckel, P., Guentsch, A., Nkenke, E., Stockmann, P., Schlegel, K. A., Neukam, F. W., Amann, K. (2011). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw is linked to suppressed TGF β 1-signaling and increased Galectin-3 expression: A histological study on biopsies. *J Transl Med.* 9: 102.
- Weibrich, G., Kleis, W. K. G.; Hafner, G., Hitzler, W. E. (2002). Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 30(2): 97-102.
- Weibrich, G., Kleis, W. K. G., Hafner, G., Hitzler, W. E.; Wagner, W. (2003). Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Impl Res.* 14(3): 357–362.
- Werner, S. und Grose, R. (2003). Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev.* 83(3): 835-870.
- Witkowski, J. A. und Brighton, W. D. (1971). *Stages of spreading of human diploid cells on glass surfaces.* *Exp Cell Res.* 68(2): 372-80.
- Woo, S.-B., Hellstein, J. W., Kalmar, J. R. (2006). Systematic Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. *Ann of Intern Med.* 144(10): 753-761.
- Wood, J., Bonjean, K., Ruetz, S., Bellahcène, A., Devy, L., Foidart, J. M., Castronovo, V., Green, J. R. (2002). Novel Antiangiogenic Effects of the Bisphosphonate Compound Zoledronic Acid. *J Pharmacol and Exp Ther.* 302(3): 1055-1061.

- Yin, W., Qi, X., Zhang, Y., Sheng, J., Xu, Z., Tao, S., Xie, X., Li, X., Zhang, C. (2016). Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte- and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects. *J Transl Med.* 14(1): 73.
- Yin, W., Xu, H., Sheng, J., Zhu, Z., Jin, D., Hsu, P., Xie, X., Zhang, C. (2017). Optimization of pure platelet rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single donor model. *Exp Ther Med.* 14(3): 2060-2070.
- Zhou, Y., Zhang, J., Wu, H., Hogan, M. V., Wang, James H.-C. (2015). The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Res Ther.* 6(1): 173.
- Zimmermann, R., Arnold, D., Strasser, E., Ringwald, J., Schlegel, A., Wiltfang, J., Eckstein, R. (2003). Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 85(4): 283-289.

7 Anhang

7.1 Wertetabellen des Ergebnisteils

Tabelle 10: VEGF-Anteil in PRP und PRF unter verschiedenen Inkubationsmethoden (vgl. Kapitel 3.1.1.1)

VEGF	Durchschnitt (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)
PRP+Ca – Ink.	412,30	75,70
PRP – Ink.	101,56	16,64
PRP+Ca – FTF	630,27	43,96
PRP – FTF	753,85	39,70
PRP+Ca – RT	118,96	13,01
PRP – RT	109,75	19,37
A-PRF – Ink	163,13	59,75
A-PRF – FTF	135,15	42,10
A-PRF – RT	132,06	39,15
PRF – Ink.	165,27	68,35
PRF – FTF	67,89	28,06
PRF – RT	33,25	20,02

Tabelle 11: PDGF-BB-Anteil in PRP und PRF unter verschiedenen Inkubationsmethoden (vgl. Kapitel 3.1.1.2)

PDGF-BB	Durchschnitt (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)
PRP+Ca – Ink.	12533,33	869,18
PRP – Ink.	1717,73	30,06
PRP+Ca – FTF	8631,07	2390,89
PRP – FTF	14208,87	1313,12
PRP+Ca – RT	1913,40	353,84
PRP – RT	1302,20	427,21
A-PRF – Ink	4571,07	1290,18
A-PRF – FTF	1677,80	636,83
A-PRF – RT	4568,87	1720,04
PRF – Ink.	4568,93	1530,21
PRF – FTF	1397,80	599,20
PRF – RT	628,87	292,56

Tabelle 12: TGF- β 1-Anteil in PRP und PRF unter verschiedenen Inkubationsmethoden (vgl. Kapitel 3.1.1.3)

TGF- β 1	Durchschnitt (pg/ml)	Standardabweichung (pg/ml)
PRP+Ca – Ink.	23229,60	5277,37
PRP – Ink.	11670,40	3087,02
PRP+Ca – FTF	26629,67	5843,14
PRP – FTF	32603,67	8765,74
PRP+Ca – RT	7574,07	2928,33
PRP – RT	11259,27	619,32
A-PRF – Ink	24900,07	3669,24
A-PRF – FTF	20662,93	5326,42
A-PRF – RT	19163,00	3963,17
PRF – Ink.	20055,60	4374,32
PRF – FTF	16625,93	4988,80
PRF – RT	4574,07	2542,74

Tabelle 13: Zellproliferation der Fibroblasten im RTCA nach 24h, 48h und 72h (KI = Konfidenzintervall von 95%; die Werte sind die Mediane des Zellindex durch die Messung des RTCA; vgl. Kapitel 3.2.1)

RTCA - Fibroblasten	24h	48h	72h
PK	6,03 (KI: 5,91-6,14)	5,77 (KI: 5,32-6,21)	5,83 (KI: 5,20-6,49)
NK	1,89 (KI: 1,55-2,24)	1,54 (KI: 1,16-1,94)	1,25 (KI: 0,96-1,63)
PRP	0,63 (KI: 0,51-0,73)	0,43 (KI: 0,12-0,72)	0,34 (KI: 0,00-0,67)
PRF	3,66 (KI: 2,21-4,72)	3,95 (KI: 3,80-4,17)	4,86 (KI: 4,56-5,07)
ZA	0,95 (KI: 0,83-1,04)	0,53 (KI: 0,45-0,63)	0,0 \pm 0,0
ZA+PRP	0,42 (KI: 0,32-0,57)	0,23 (KI: 0,14-0,34)	0,09 (KI: 0,03-0,15)
ZA+PRF	1,86 (KI: 1,08-2,67)	0,96 (KI: 0,39-1,73)	0,42 (KI: 0,06-0,88)

Tabelle 14: Zellproliferation der Osteoblasten im RTCA nach 24h, 48h und 72h (KI = Konfidenzintervall von 95%; die Werte sind die Mediane des Zellindex durch die Messung des RTCA, vgl. Kapitel 3.2.1)

RTCA - Osteoblasten	24h	48h	72h
PK	0,69 (KI: 0,47-0,86)	0,87 (KI: 0,68-1,00)	0,98 (KI: 0,80-1,13)
NK	0,92 (KI: 0,59-1,14)	0,23 (KI: 0,19-0,29)	0,24 (KI: 0,00-1,06)
PRP	0,49 (KI: 0,42-0,56)	0,09 (KI: 0,01-0,16)	0,15 (KI: 0,00-0,42)
PRF	0,86 (KI: 0,17-1,75)	1,01 (KI: 0,34-2,03)	1,20 (KI: 0,23-2,62)
ZA	0,47 (KI: 0,29-0,75)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
ZA+PRP	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
ZA+PRF	0,06 (KI: 0,0-0,28)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Tabelle 15: Migrationsassay der Fibroblasten unter Benutzung des Scratch Assay . Angegeben ist der Mittelwert des prozentualen Verschlusses mit Konfidenzintervall (* = signifikantes Ergebnis verglichen mit der Negativkontrolle; vgl. Kapitel 3.2.2)

Migrationsassay - Fibroblasten	24h	48h	72h
PK	38,2 (KI: 16,1-59,0)*	77,4 (KI: 60,0-95,0)*	96,3 (KI:65,8-100,0)*
NK	1,5 (KI: 0,0-15,7)	13,1 (KI:8,5-19,6)	12,7 (KI:6,0-22,6)
PRP	76,7 (KI: 66,2-93,3)*	100,0*	100,0*
PRF	29,6 (KI: 0,0-48,8)*	97,6 (KI: 73,6-100,0)*	100,0*
ZA	0,0	0,0	0,0
ZA+PRP	45,1 (KI: 20,7-79,4)*	100,0*	100,0*
ZA+PRF	39,9 (KI: 15,7-62,5)*	82,1 (KI: 67,6-94,2)*	77,8 (76,5-79,8)*

Tabelle 16: Migrationsassay der Osteoblasten unter Benutzung des Scratch Assay . Angegeben ist der Mittelwert des prozentualen Verschlusses mit Konfidenzintervall (* = signifikantes Ergebnis verglichen mit der Negativkontrolle; vgl. Kapitel 3.2.2)

Migrationsassay - Osteoblasten	24h	48h	72h
PK	60,4 (KI: 8,6-100,0)*	50,5 (KI: 16,9-91,4)*	44,4 (KI: 0,0-100,0)*
NK	16,9 (KI: 0,0-35,8)	0,0	0,0
PRP	67,5 (KI: 26,7-94,5)*	47,9 (KI: 0,0-94-3)*	40,6 (KI: 0,0-90,9)
PRF	49,5 (KI: 42,6-57,2)*	91,1 (73,4-100,0)*	100,0*
ZA	17,7 (KI: 0,0-45,2)	0,0	0,0
ZA+PRP	52,0 (KI: 47,9-58,4)*	14,8 (KI: 0,0-61,5)	0,1 (KI: 0,0-4,6)
ZA+PRF	37,9 (KI: 17,4-63,6)*	67,4 (KI: 59,7-72,5)*	0,1 (KI: 0,0-16,8)

Tabelle 17: MTT-Tests bei Fibroblasten nach 24 und 72 Stunden . (* = signifikantes Ergebnis verglichen mit der Positivkontrolle; vgl. Kapitel 3.2.3)

Migrationsassay - Fibroblasten	24h	72h
NK	55,0 (KI: 44,0-67,0)*	55,0 (KI: 46,0-67,0)*
PRP	100,0	82,0 (KI: 73,0-89,0)*
PRF	78,0 (KI: 73,0-89,0)*	91,0 (KI: 82,0-122,0)
ZA	67,0 (KI: 60,0-89,0)*	46,0 (KI: 46,0-56,0)*
ZA+PRP	56,0 (KI: 44,0-73,0)*	64,0 (KI: 55,0-76,0)*
ZA+PRF	89,0 (KI: 82,0-133,0)	36,0 (KI: 20,0-73,0)*

Tabelle 18: MTT-Tests bei Osteoblasten nach 24 und 72 Stunden. (* = signifikantes Ergebnis verglichen mit der Positivkontrolle, vgl. Kapitel 3.2.3)

Migrationsassay - Osteoblasten	24h	72h
NK	100,7 (KI: 75,0-120,0)	38,0 (KI: 38,0-46,0)
PRP	120,0 (KI: 102,0-127,0)	100,0 (KI: 92,0-122,0)
PRF	94,0 (KI: 93,0-113,0)	106,0 (KI: 94,0-112,0)
ZA	98,0 (KI: 77,0-104,0)	16,0 (KI: 12,0-18,0)
ZA+PRP	118,0 (KI: 92,0-134,0)	8,0 (KI: 8,0-14,0)
ZA+PRF	87,0 (KI: 77,0-98,0)	14,0 (KI: 12,0-14,0)

7.2 Ethikantrag



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Hakim
Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Sieg,
Direktor der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-348

Datum: 11. Dezember 2017

Sitzung der Ethik-Kommission am 05. Januar 2017

Antragsteller: Herr Dr. Hakim

Titel: In-vitro Studie zum Einfluss des PRF (Platelet Rich Fibrin)/ PRP (Platelet Rich Plasma) auf die Zell-Biomaterial-, Zell-Zell-Adhäsion von oralem Plattenepithel und Osteoblasten bei Bisphosphonat-induzierter Osteonekrose des Kiefers

Sehr geehrter Herr Dr. Hakim,
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Über Art und Dauer der Aufbewahrung, den Zeitpunkt der Vernichtung des Biomaterials ist aufzuklären. Weiterhin ist zu beschreiben, welche Analysen mit der Blutprobe vorgesehen sind. Werden die Studiendaten pseudonymisiert oder anonymisiert gehalten? Die Information in der Studieninformation und der Einwilligung sind hierzu widersprüchlich.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.
Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.
Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.drks.de). Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
 Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
 Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
 Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
 Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)
 Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)
 Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

Frau Martini (Caritas)
 Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
 Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
 Hr. Prof. Dr. Rehm-Sutter (MGWF)

Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
 Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen Dank aussprechen, die mich auf dem Entstehungsweg dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Samer Hakim für die ausgezeichnete Betreuung während meines Projektes. Danke für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, die steten Ideen und Verbesserungsvorschläge und deine Geduld.

Direkt daran anschließend möchte ich meinen Dank an die herausragende Unterstützung durch Herrn Dr. Dr. Daniel Steller unterstreichen, der mir während der gesamten Versuchsreihe ein präsender Ansprechpartner war. Danke für deine stetigen Bemühungen, die Dissertation und unsere Veröffentlichungen weiter voranzutreiben.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Ralph Pries und seiner tollen Forschungsgruppe des HNO Labors des UKSH Lübecks bedanken. In eurem Labor habt ihr mich als Kollegin aufgenommen, auch wenn ich meine Doktorarbeit nicht für euer Fach geschrieben habe. Ihr habt mir stets hilfreich zur Seite gestanden.

Desweiteren möchte ich mich bei allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern des UKSH Lübeck bedanken, die an der Durchführung meiner Arbeit beteiligt waren. Mein Dank gilt Herrn Klinger und seinem Team der Anatomie für die Durchführung der Elektronenmikroskopie, sowie Herrn Juhl und seinem Team der Transfusionsmedizin für die Bereitstellung der Thrombozytenkonzentrate.

Im Folgenden möchte ich mich bei allen Leuten bedanken, die mir im nicht wissenschaftlichen Kontext auf meinem Lebensweg während der Doktorarbeit geholfen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei meinen Eltern Heike Heß und Volker Herbst für die Schaffung eines sorgenfreien Lebens, die tolle Kindheit und die Möglichkeit, Medizin zu studieren. Bei euch, meinem lieben Bruder Bastian und euren

Ehepartnern Frank Heß und Ellen Herbst weiß ich stets meine Heimat und erhalte alle Unterstützung, die ich benötige.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann David Herbst für die stete Unterstützung in allen Lebenslagen, die Durchsicht der Dissertation und die Hilfe bei technischen Fragen. Danke, dass du mir stets den benötigten Raum gegeben hast und immer für mich da bist!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Freunden rund um die Oase bedanken, die mein Leben jeden Tag bereichern und mich während meines Studiums und meiner Dissertation stetig menschlich unterstützt haben. Hervorheben möchte ich meine Freundin und Trauzeugin Celine Hoene für die tolle Freundschaft und unsere arbeitsreiche Woche in Schweden, ohne die ich diese Dissertation nicht fertiggestellt hätte.