

**Aus der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Tübingen**

**Abteilung Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik mit Propädeutik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Weber**

**Sektion für Medizinische Werkstoffkunde und Technologie
Leiter: Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer**

**In-vitro-Untersuchungen zur Zellstimulation
durch Thrombozytenkonzentrate (PRP)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**Vorgelegt von
Gabriela Aida Seher
aus Gura Humorului, Rumänien**

2004

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter

Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

2. Berichterstatter

Professor Dr. S. Reinert

1	Einleitung	4
1.1	Allgemeines	4
1.2	Allgemeines über PRP	5
1.3	Geschichtliches zu PRP	5
1.4	Bestandteile von PRP	8
1.4.1	<i>Thrombozyten</i>	<i>9</i>
1.4.2	<i>Wachstumsfaktoren</i>	<i>9</i>
1.4.3	<i>Calcium (Faktor IV des Gerinnungssystems)</i>	<i>12</i>
1.4.4	<i>Thrombin</i>	<i>13</i>
1.5	PRP und seine Rolle in der Wundheilung	14
1.6	Osteokonduktion und Osteoinduktion	15
1.7	Themenstellung	18
1.8	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien und Geräte	21
2.1.1	<i>Allgemeine Zellkultur- Materialien und Geräte</i>	<i>21</i>
2.1.2	<i>Materialien und Geräte für die Versuche mit Calcium und Thrombin</i>	<i>22</i>
2.1.3	<i>Materialien und Geräte für die Versuche mit PRP-Überstand</i>	<i>22</i>
2.1.4	<i>Materialien und Geräte für die Versuche mit Membraneinsätzen</i>	<i>23</i>
2.1.5	<i>Materialien für BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Proliferationstest: ..</i>	<i>23</i>
2.1.6	<i>Materialien für die Erstellung der Calcein/EB-Farblösung:.....</i>	<i>24</i>
2.1.7	<i>Materialien und Geräte für die DNA-Isolierung</i>	<i>24</i>
2.2	Methoden	25
2.2.1	<i>XTT Test</i>	<i>25</i>
2.2.2	<i>PRP-Herstellung mit der Curasan Methode</i>	<i>26</i>
2.2.3	<i>BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Proliferationstest</i>	<i>27</i>
2.2.4	<i>Die Thrombozytapherese</i>	<i>27</i>
2.2.5	<i>Fluoreszenzmikroskopische Vital-Färbung</i>	<i>28</i>
2.2.6	<i>DNA-Isolierung</i>	<i>30</i>

2.3	Versuchsdurchführung	31
2.3.1	<i>Zellversorgung und Zellbestimmung</i>	31
2.3.2	<i>Einfluss von Calcium auf die Zellproliferation</i>	32
2.3.3	<i>Wachstumsversuche mit Thrombin.....</i>	36
2.3.4	<i>Versuche mit angereicherten Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand)</i> <i>37</i>	
2.3.5	<i>Versuche mit vollständiger PRP-Präparation in Membraneinsätzen</i>	38
2.3.6	<i>Versuche mit MC3T3-E1-Präosteoblasten, die in PRP als Matrix</i> <i>eingebettet sind.....</i>	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Ergebnisse der Versuche mit Calcium.....	43
3.1.1	<i>Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration</i> <i>auf MC3T3-Präosteoblasten</i>	44
3.1.2	<i>Einfluss einer langzeitigen (24-48h) Erhöhung der Ca-</i> <i>Ionenkonzentration auf MC3T3-Präosteoblasten.....</i>	48
3.1.3	<i>Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration</i> <i>auf SAOS-2-Osteoblasten.....</i>	51
3.1.4	<i>Einfluss einer langzeitigen (24-48h) Erhöhung der Ca-</i> <i>Ionenkonzentration auf SAOS-2-Osteoblasten</i>	54
3.2	Ergebnisse der Versuche mit Thrombin	57
3.2.1	<i>Ergebnisse nach 24h Einwirkung von Thrombin auf MC3T3-E1-</i> <i>Präosteoblasten in Basalmedium.....</i>	57
3.2.2	<i>Ergebnisse nach 24h Einwirkung von Thrombin auf MC3T3-E1-</i> <i>Präosteoblasten in Vollmedium.....</i>	58
3.3	Ergebnisse der Versuche mit angereicherten Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand)	60
3.3.1	<i>Einfluss von 40% PRP-Überstand auf die Zellproliferation</i>	60
3.3.2	<i>Einfluss von 20% PRP-Überstand auf die Zellproliferation</i>	61
3.3.3	<i>Einfluss von 5% PRP-Überstand auf die Zellproliferation</i>	63

3.4	Ergebnisse der Versuche mit vollständiger PRP-Präparation in Membraneinsätzen.....	64
3.5	Ergebnisse der Versuche mit MC3T3-E1-Präosteoblasten, die in PRP als Matrix eingebettet sind.....	67
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	69
4	Diskussion	72
4.1	Diskussion der Versuche	72
4.1.1	<i>Einfluss von Calcium auf MC3T3-E1-Präosteoblasten und SAOS-2-Osteoblasten</i>	<i>73</i>
4.1.2	<i>Einfluss von Thrombin auf MC3T3-E1-Präosteoblasten</i>	<i>75</i>
4.1.3	<i>Einfluss von angereicherten Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand) auf MC3T3-E1-Präosteoblasten.....</i>	<i>76</i>
4.1.4	<i>Untersuchungen mit vollständiger PRP-Präparation in Membraneinsätzen.....</i>	<i>78</i>
4.1.5	<i>Untersuchungen mit MC3T3-E1-Präosteoblasten, die in PRP als Matrix eingebettet sind</i>	<i>80</i>
4.2	Schlussfolgerung.....	81
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis	86
7	Anhang.....	98
7.1	Skizze: Sanchez A, Sheridan P, Kupp L. Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. <i>The International Journal of Oral & Maxillofac. Impl.</i> 2003,18(1): 93-103.....	98
7.2	Photos: PRP Herstellung nach Curasan Methode	99
7.3	Danksagung	100
7.4	Tabellarischer Lebenslauf.....	101

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Auf den verschiedenen Gebieten der Medizin, wie Orthopädie, Oralchirurgie oder Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, wird immer häufiger versucht, eine beschleunigte Regeneration von Knochengewebe zu erreichen. Das Ziel ist die Verkürzung der Behandlung und entsprechend die Entlastung der Patienten. Daher arbeiten Ärzte zusammen mit Wissenschaftlern an der Entwicklung von Methoden, welche die Knocheninduktion, die Knochenkonduktion, die Osteointegration und die Beschleunigung der Wundheilung im Ganzen optimieren.

In der heutigen Zahnmedizin gehört die Versorgung der Patienten mit Implantaten zur Routine. Allerdings beläuft sich die Behandlungsdauer auf bis zu zwölf Monate, abhängig davon, wie schnell ein Implantat mechanisch belastet werden kann. Eine Methode zur Beschleunigung der Knochenwundheilung würde für Implantatpatienten eine dramatische Verkürzung der Behandlungsdauer bedeuten.

Verschiedene aktuell diskutierte Methoden zur Stimulierung der Knochenregeneration basieren auf den Einsatz biologischer Faktoren. Eine dieser Methode ist der Einsatz von Thrombozytenkonzentraten, oder Platelet Rich Plasma, kurz „PRP“.

PRP wird heute klinisch und in der Zahnarztpraxis -„chair side“- bereits verwendet, der Einsatz ist jedoch weder wissenschaftlich gerechtfertigt noch kontraindiziert. Aufgrund der Vielfalt verschiedener Methoden zur Herstellung von PRP, die auf dem Markt existieren, sind *in vivo* Studien zur Wirkung aller PRP-Preparationen sehr aufwändig. Durch Etablierung geeigneter *in vitro* Systeme sollte man die Wirkung von PRP einfacher untersuchen können und gleichzeitig eine Optimierung verschiedener Herstellungsmethoden erreichen. Die vorgestellte Arbeit dokumentiert die Wirkung von PRP in verschiedenen *in vitro* Versuchssystemen.

1.2 Allgemeines über PRP

PRP ist ein autologes Produkt, welches aus mit Thrombozyten angereichertem Plasma besteht. Die Thrombozytenkonzentration beträgt in Mittel 1-2,5 Mio. Thrombozyten/ μ l Plasma. Sie kann allerdings bis auf 4 Mio. ansteigen [19]. Diese Thrombozyten enthalten in ihren Alpha-Granula verschiedene Wachstumsfaktoren, die wichtig für die Wundheilung sind [36,83]. Die Wachstumsfaktoren werden von den Zellen über spezifische Rezeptoren erkannt. Dadurch können die Faktoren die Rekrutierung, die Migration, die Chemotaxis und die Proliferation der Zellen beeinflussen [32].

PRP wird durch verschiedene Zentrifugationsverfahren direkt aus dem mit Zitrat versetztem Vollblut der zu behandelnden Patienten hergestellt. Unmittelbar vor dem Einbringen in die Wunde wird PRP durch Zugabe von Aktivatoren zum Gerinnen gebracht. Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert und so die Wachstumsfaktoren freigesetzt. Als Aktivatoren des Thrombozytenkonzentrates werden Calcium und Thrombin oder nur Calcium allein (besonders in Europa) eingesetzt.

Die Frage, ob eine Erhöhung der Konzentration an Wachstumsfaktoren, wie sie in Thrombozytenkonzentraten erreicht werden können, möglicherweise eine Beschleunigung der Wundheilung verursachen, wird aktuell diskutiert.

1.3 Geschichtliches zu PRP

In den 60er Jahren wurden von Schulte et al. einige Artikel und ein Buch publiziert, in denen sie zum ersten Mal über die Verwendung von autologen Blutprodukte zum Fördern der Knochen-Regeneration sprachen. Damals hatten Schulte et al.

autologes Blut und, wenige Jahren später, zentrifugiertes autologes Blut therapeutisch für die Füllung von Zysten benutzt [84,85].

Erst 1996 wurde von Yamamoto et al. wieder von der Benutzung autologer Blutprodukte als Gewebekleber für die Blutstillung berichtet [111].

Ein Jahr später (1997) veröffentlichten sowohl Whitman et al. [108] als auch Green [31] Verfahren zur Herstellung von PRP. Green stellte PRP als Alternative zum „fibrin glue“ vor. Whitman et al. sprachen schon über die Beschleunigung von Weichgewebe- und Knochen-Regeneration durch Fibrin und in PRP enthaltene Wachstumsfaktoren.

Als 1998 Marx et al. [63] eine erste klinische Studie über die Anwendung von PRP an Patienten veröffentlichten, provozierten sie eine breite Diskussion über den Einsatz von PRP zur Wundheilung. Sie hatten in der Studie 88 Patienten behandelt, welche eine Unterkieferrekonstruktion mit autologen Knochentransplantaten erhalten hatten. Bei der Hälfte der Patienten wurde in der Behandlung PRP eingesetzt, die andere Hälfte, bei der kein PRP eingesetzt wurde, diente als Kontrolle. Die Auswertung der Knochendichte wurde nach sechs Monaten mittels Panoramaschichtaufnahmen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Steigerung der Knochendichte von 19% in der mit PRP behandelten Gruppe.

Ein Jahr später, 1999, spricht auch der spanische Zahnarzt Anitua in einem ersten Artikel über ein Thrombozytenkonzentrat das er „platelet rich in growth factors“, kurz PRGF, nennt [4]. Das ist bei Anitua der Anfang einer ganzen Reihe von Versuchen mit PRGF. Anitua ist der heute bekannteste Anwender von PRP in der Oralchirurgie in Europa. So wie auch Marx, behauptet Anitua durch den Einsatz von PRP eine Beschleunigung der Wundheilung und der Regeneration des Knochengewebes erreicht zu haben. Im Gegensatz zu Marx jedoch untersucht Anitua den Effekt von PRP auch in Tierversuchen [5] und recherchiert auch die Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren aus PRP auf die Wundheilung [6].

Obwohl seit der ersten in der Literatur häufig zitierte Publikation von Marx inzwischen 5 Jahre vergangen sind, existieren in der Literatur bisher kaum belastbare klinische Studien, die die von Marx für den Einsatz von PRP propagierten Effekte durch „harte“ klinische Daten bestätigen.

Um den mit der Durchführung klinischer Studien verbundenen hohen Aufwand zu umgehen, wird daher auch vermehrt versucht, *in vitro* Belege für die propagierte stimulierende Wirkung von PRP zu finden.

Weibrich et al. [103] untersuchten *in vitro* den Effekt von reinen, gewaschenen Thrombozyten auf osteoblastenähnliche Zellen. Sie stellten eine Steigerung der Proliferation bis zu einer bestimmten Konzentration der Thrombozyten fest. Bei höheren Konzentrationen wurde dagegen eine Hemmung der Proliferation festgestellt. Die Relevanz dieser Ergebnisse ist noch diskutierbar, denn die Versuche reproduzierten nicht die *in vivo* existierenden Bedingungen. Hinzu kommt, dass die Autoren in den Versuchen einen Schritt ausgelassen haben, der bei der Anwendung in der Praxis notwendig ist, nämlich die Aktivierung von PRP durch Calcium mit oder ohne Thrombin. Weibrich et al. vergleichen auch verschiedene Methoden zur Herstellung von PRP [102,104-107].

Davies et al. erforschen intensiv die Schnittstelle zwischen Implantat und Knochengewebe. Da das Implantat als erstes mit dem Blut des Patienten in Berührung kommt, soll das Thrombozytenkonzentrat eine wichtige Rolle in der Osteoinduktion und Osteokonduktion spielen. Davies schreibt die Schlüsselrolle der Implantat-Integration allerdings nicht PRP (allein) zu, sondern der Fibrinmatrix, in der sich auch die Thrombozyten befinden (Abb. 1) [17, 25].

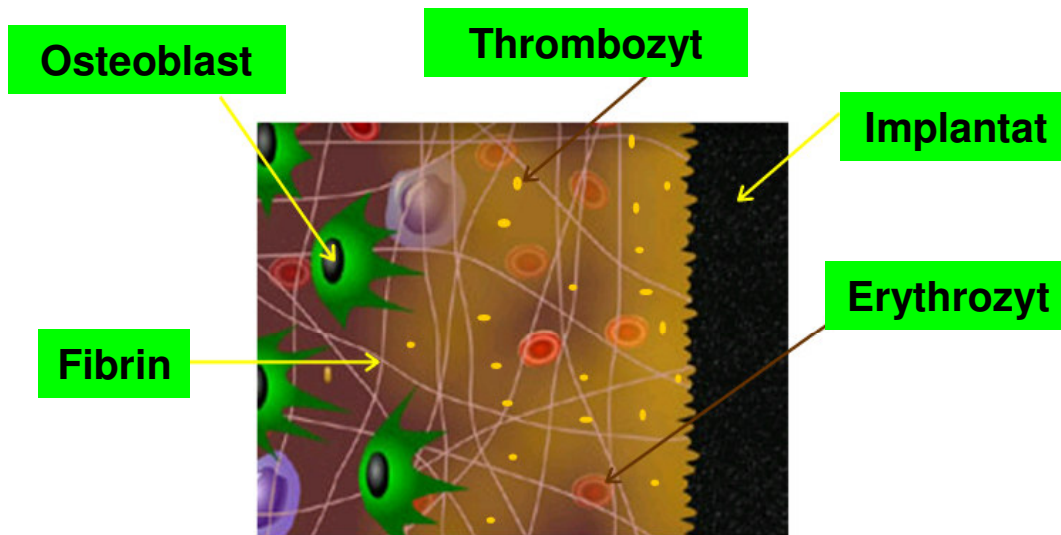


Abb. 1. Fibrinmatrix und aktivierte Thrombozyten nach J. E. Davies

Heute ist die Anwendung von PRP ein hoch aktuelles Thema auch in der Orthopädie, in der Oralchirurgie und in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Ärzte und Biologen sind gleichermaßen an wissenschaftlichen Daten interessiert, die den Effekt von PRP belegen und quantifizieren, um damit die Realisierbarkeit von in vivo Anwendungen von PRP abzuschätzen.

1.4 Bestandteile von PRP

PRP ist zurzeit unter verschiedenen Begriffen bekannt, wie zum Beispiel PRGF (platelet rich in growth factors) bei Anitua [4] oder cPRP (concentrated Platelet Rich Plasma) bei Dugrillon [19]. Entsprechend groß ist die Vielfalt der Verfahren zur Herstellung von PRP. In allen Fällen handelt es sich jedoch um ein mehr oder weniger bezüglich der Trombozyten angereichertes Plasma, das mittels Calcium oder mittels Calcium und Thrombin zum Gerinnen gebracht wird.

1.4.1 *Thrombozyten*

Die Konzentration der Thrombozyten beträgt beim erwachsenen Menschen 200.000-400.000/ μ l Blut. Thrombozyten sind kernlose, linsenförmige Zellbestandteile mit einem Durchmesser von 2-4 μ m, die dennoch einen intensiven Atmungsstoffwechsel aufweisen. Ihre Funktion besteht darin, nach einer Verletzung der Gefäßwand, zusammen mit dem gebildeten Fibrin, ein Gerinnsel zu bilden und dadurch die Wunde zu schließen [24].

Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakariozyten gebildet. Die Plasmamembran der Thrombozyten enthält verschiedene Glykoproteine, die als spezifische Membranrezeptoren für Fibrinogen und Fibronektin dienen.

In den Alpha-Granula der Thrombozyten, welche sich im Plättchenzentrum befinden, werden zahlreiche Plasmaproteine, die Blutgerinnungsfaktoren V und VII sowie eine Reihe verschiedener Wachstumsfaktoren (siehe unten) gespeichert.

1.4.2 *Wachstumsfaktoren*

Thrombozyten verfügen über eine hohe Tendenz, sich an die Basalmembrankollagene anzuheften. Im Fall einer Verletzung heften sich die Thrombozyten an den Rand der Blutgefäßöffnung und schließen diese innerhalb von Minuten. Die Adhäsionsreaktion löst eine Formveränderung der Thrombozyten und ihre Aggregation aus [21,43]. Gleichzeitig kommt es zu einer Stimulation des Stoffwechsels der Thrombozyten und zur Sekretion von Wachstumsfaktoren [8,18].

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren, die aus den Thrombozyten freigesetzt werden, und welche die Regeneration des Gewebes beeinflussen, sind:

- Transforming Growth Factor- β (TGF- β),
- Platelet Derived Growth Factor (PDGF),

- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF),
- Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I),
- Epidermal Growth Factor (EGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Interleukin-1 (IL-1).

TGF-β

Transforming Growth Factor - β (TGF-β) ist ein Cytokin, das in einer latenten Form produziert wird. In dieser Form hat TGF-β eine Halbwertszeit von 90 Minuten. Nach seiner enzymatischen Aktivierung reduziert sich die Halbwertszeit auf bis zu 2min.[6].

TGF-β stimuliert die Chemotaxis von Leukozyten und Fibroblasten und beeinflusst gleichzeitig Proliferation, Migration oder Differenzierung von verschiedenen Zelltypen [26,29,39,40,47,91]. An der Knochen-remodellierung und in der Frakturheilung ist TGF-β1, durch die Regulation der Aktivität von Osteoblasten, Osteoklasten, Chondrozyten und mesenchymalen Zellen direkt beteiligt [14,15,44,67,69,70]

Der Effekt von TGF-β1, wie auch der anderen Wachstumsfaktoren, ist allerdings dosisabhängig: in hohen Dosen kann TGF-β einen hemmenden Effekt auf die Knochenbildung provozieren [25,30].

In PRP kann die TGF-β1 Konzentration, je nach Herstellungsmethode, Werte bis zu 1020ng/ml erreichen.

Deshalb kann man heute nicht mit Sicherheit sagen, ob der Effekt von TGF-β1 bei der Verwendung von PRP positiv oder negativ ist.

PDGF

Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ist ein Glykoprotein bestehend aus zwei Polypeptidketten einer der Formen A oder B, und folgend aus drei Isoformen: AA, BB und AB. PDGF ist der erste Wachstumsfaktor, welcher in dem Alpha-Granula der Trombozyten entdeckt wurde [6,51].

Aus den Trombozyten wird vor allem PDGF-AB freigesetzt [114]. Neben PDGF-AB (65%) werden auch die anderen zwei Isoformen PDGF-BB (23%) und PDGF-AA (12%) in den Alpha-Granula produziert [6].

Eine wichtige Rolle von PDGF ist die Anregung der Proliferation von Osteoblasten. PDGF war der erste Wachstumsfaktor, bei dem eine chemotaktische Wirkung auf sowohl Präosteoblasten und Osteoblasten, als auch auf Fibroblasten nachgewiesen werden konnte [28,41,58,62].

Die Konzentration von PDGF-AB kann in PRP bis zu 314ng/ml betragen [105]. Es gibt nur wenige, sich widersprechende Untersuchungen, die den Effekt dieser Konzentration auf die Knochenzellen untersuchen.

VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor ist ein Protein, welches von Zellen während der Proliferation produziert wird. VEGF hat unterschiedliche biologische Funktionen, wie die Erhöhung der Permeabilität von Gefäßen oder die Stimulierung der Angiogenese [6,40,55].

IGF-I

Insulin-like Growth Factor - I wird hauptsächlich von Osteoblasten produziert und ist in der Knochenmatrix quantitativ der am häufigsten angetroffene Wachstumsfaktor [90,92].

IGF-I beeinflusst die Osteoblastenproliferation positiv, stimuliert also die Knochenbildung (besonders bei einer Knochenfraktur) und die Bildung von Kollagen Typ I [60,61,93,113]. Nach Bastian hat IGF-I in Serum eine Halbwertszeit von 3min. [9]. In PRP kann die Konzentration von IGF-I bis 91ng/ml betragen [104].

EGF, bFGF, IL-1

Epidermal Growth Factor (EGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Interleukin-1 (IL-1) sind andere Wachstumsfaktoren, die aus den aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Wundheilung durch die Förderung der Proliferation von Osteoblasten, Fibroblasten (bFGF) und Keratinozyten (bFGF). EGF stimuliert gleichzeitig die Mitose von Fibroblasten und Keratinozyten und beschleunigt dadurch die Wundheilung [12,55,57,58,82,98].

1.4.3 *Calcium (Faktor IV des Gerinnungssystems)*

Calcium existiert im Körper zu 99% (ca. 1,5Kg) als Apatit im Skelettsystem. Die Knochenminerale stellen ein Reservoir dar, aus welchem Calcium mobilisiert, und in welchem überschüssigen Calcium abgegeben werden kann. Das Skelettsystem ist in der Lage, durch Osteoblasten und Osteoklasten das Calciumniveau fein zu regulieren [22,100]. Die Konstanz des Calciumspiegels im Blut und in den Körperflüssigkeiten setzt eine wirksame Regulation der Resorption, der Verteilung und der Ausscheidung von Calcium voraus [101].

Die Gesamt-Calciumkonzentration im Blut beträgt 9-11mg/100ml (2,25-2,75mmol/l). Während der osteoklastischen Resorption kann die Calciumkonzentration Werte bis 50mmol/l erreichen [33]. Nur das freie Calcium-Ion ist biologisch aktiv. Es ist in der Lage, sowohl die Zellmembrane zu stabilisieren, als auch durch Ionenkanäle in die Zellen einzudringen [20].

Calcium spielt im Blutgerinnungssystem eine entscheidende Rolle: nur in seiner Anwesenheit wird das Thrombin gebunden. Darüber hinaus findet die Degranulation von Thrombozyten, bzw. die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Alpha-Granula, ebenfalls nur in Gegenwart von Calcium statt. Die Rolle von Calcium in der Wundheilung wird auch debattiert [54]. Das extrazelluläre Calcium kann in höheren Konzentrationen die Aktivität der Osteoblasten und Osteoclasten beeinflussen [35,45,59].

Für die Gerinnungsauslösung von PRP wird, je nach Methode, eine 5 oder 10%ige Calciumlösung benutzt, um das durch die Zugabe von Antikoagulantien gebundene Calcium zu ersetzen [2,4,48-50,52,53,56,63,105,108,109]. Dadurch kann die Calciumkonzentration lokal auf bis zu 130mmol/l ansteigen.

1.4.4 *Thrombin*

Unter dem Einfluss von Faktor V und Faktor X der Gerinnungskaskade wird das Thrombin durch die Aktivierung von Prothrombin gebildet. Prothrombin wird als Vorstufe von Thrombin in der Leber unter der Mitwirkung von Vitamin K gebildet.

Thrombin (Faktor IIa des Blutgerinnungssystems) ist eine vielseitige, aktive Serinproteinase mit einer zentralen Rolle in der Hemostase [110]. Zu den wichtigsten Funktionen zählen:

- die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin,
- die Aktivierung von Trombozyten [24], sowie
- die Stimulierung der Freisetzung von Serotonin und Prostaglandin.

Die Osteoblasten besitzen Thrombinrezeptoren [1,13,23,42]. Bei bestimmten Konzentrationen kann das Thrombin die Proliferation von Fibroblasten und Osteoblasten stimulieren [23,95-98].

1.5 PRP und seine Rolle in der Wundheilung

Das Knochengewebe gehört zu den Geweben, die zu einer restitutio ad integrum in der Lage sind [77]. Bei einer Verletzung des Knochens setzt, in Abhängigkeit von der Defektgrösse, eine primäre oder eine sekundäre Knochenheilung an.

Die primäre Knochenheilung setzt nur in wenigen Fällen an, nämlich wenn ein lückenloser, enger Kontakt der Fragmentenden einer Knochenfraktur besteht.

Die sekundäre Knochenheilung nach Auffüllung von Knochendefekten ist der Regelfall. Die Bildung des neuen Knochengewebes erfolgt über die Bildung eines Übergangsgewebes - des Kallus.

Die Knochenheilung fängt mit einer Hämatombildung an, gefolgt von der entzündlichen Reaktion. Diese führt zur Aktivierung des Komplementsystems und zum Abräumen von nekrotischem Gewebe. Danach werden die proliferativen und Differenzierungsvorgänge durch Wachstumsfaktoren aus den „aktivierten“ Thrombozyten [7,21,43] und durch die morphogenetischen Knochenproteine (BMPs) gesteuert [70,71,114]. Das Frakturhämatom wird von Gewebszellen in Bindegewebe umgewandelt – in den Bindegewebekallus, welcher durch Kalkeinlagerung verfestigt wird. Dieses Gewebe wird Intermediärkallus oder Osteoid genannt. Der Intermediärkallus wird dann allmählich zu Knochengewebe umgebaut.

In der Frühphase der Knochenheilung sind die Wachstumsfaktoren höchstwahrscheinlich für die Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Zellen, für die Chemotaxis der Leukozyten, aber auch der Makrophagen in die Wunde [18,55,75] zuständig. Nachgewiesen wurde auch, dass die Wachstumsfaktoren (TGF- β , PDGF, VEGF) angiogenetisch sind [71]. Zu diesem Zeitpunkt wird die propagierte positive Wirkung von PRP in der Wundheilung vermutet. Es wird propagiert, dass aktivierte Thrombozytenkonzentrate (PRP) Wachstumsfaktoren freisetzen und dadurch eine Beschleunigung der Wundheilung

gefördert würde [112]. Diese soll auf der Angiogenese und hauptsächlich auf der Proliferation von Vorläuferzellen und Osteoblasten basieren. Aus diesem Grund ist die Anreicherung dieser Faktoren eines der Ziele bei der Herstellung von PRP.

Neben der Stimulation der Bildung von Knochen- und Knorpelzellen aus pluripotenten Vorstufen sind die Wachstumsfaktoren auch für die Stimulation der Angiogenese zuständig. In der Literatur gibt es keine belastbaren Versuche, die dokumentieren, welchen Einfluss PRP auf die Angiogenese hat. Whitmann et al. haben 1997 nur darauf hingewiesen, dass PRP die Regeneration der Weichteildefekten, aber nicht speziell die Angiogenese, stimuliert.

1.6 Osteokonduktion und Osteoinduktion

Nach Davies [17] ist eine schnelle Heilung in der Frühphase der Knochenwunde entscheidend für die Stabilisierung enossaler Implantate. In dieser Phase finden Osteokonduktion und Osteoinduktion statt, von denen die spätere Knochenbildung abhängt.

Osteoinduktion ist definiert als ein Prozess, der die Bildung von Knochengewebe stimuliert. Osteokonduktion wird definiert als Wanderung osteogener Zellen in Richtung Knochendefekt bzw. Implantat oder Knochenersatzmaterial. Diese Migration erfolgt über das Blutkoagulum am Implantatsort. Das Fibrin aus dem Blutkoagulum bildet eine 3D Matrix für diese Migration, die durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Blutzellen, insbesondere aus Thrombozyten, im Koagel beschleunigt werden soll. Die osteokonduktiven Implantatoberflächen binden das Fibringerinnsel und dadurch die osteogenen Zellen. Die entstehende Knochen-Implantat-Oberfläche entsteht eine „Kontaktosteogenese“ (Abb. 2).

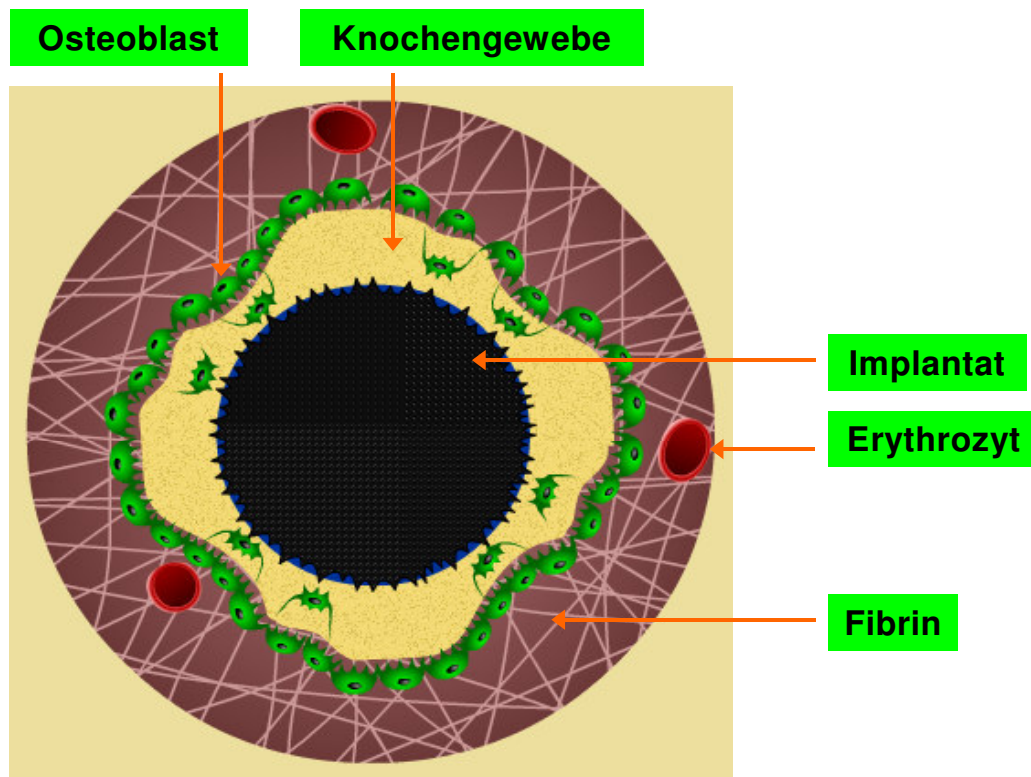


Abb. 2. Kontaktosteogenese nach J. E. Davies

Die sogenannte „Distanzosteogenese“ findet man bei den Implantatoberflächen, die nicht osteokonduktiv sind und wo das Koagulum sich zurückzieht. Der neue Knochen bildet sich auf dem schon existierenden Knochen und in seiner Umgebung, aber nicht auf dem Implantat (Abb. 3) [17].

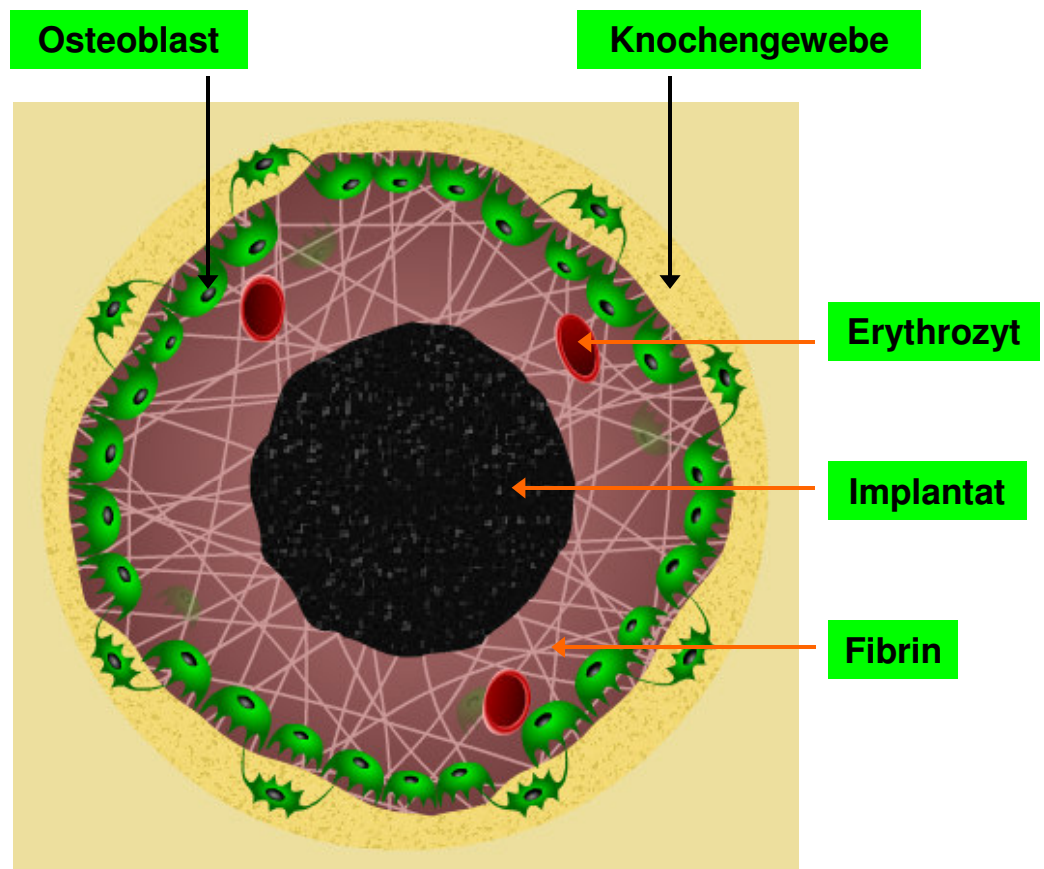


Abb. 3. Distanzosteogenese nach J. E. Davies

Folglich wird heute versucht, Knochenersatzmaterialien und Implantatoberflächen herzustellen, die osteoinduktiv und osteokonduktiv zugleich sind, um eine optimale Anlagerung der osteogenen Zellen gewährleisten zu können [3,68,86,88,89]

In diesem Zusammenhang wird heute propagiert, dass das Einbringen von PRP in die Wunde und alternativ oder zusätzlich das Einbetten des Implantats in PRP vor dem Implantieren eine Beschleunigung der Wundheilung verursacht [6]. Wenn dies

der Fall wäre, könnte man eine Therapie mit sofort belastbaren Implantaten realisieren.

1.7 Themenstellung

In der Fachliteratur und auf Symposien, die das Thema PRP behandeln, werden Reihen von Fallberichten über den erfolgreichen Einsatz von PRP in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie und in der Implantologie vorgestellt [6,10,11,16,37,46,50,63,64,76,78,80,99,109,110]. Darüber hinaus werden auch neue Anwendungsbereiche für PRP beschrieben, wie zum Beispiel der Einsatz in der plastischen Chirurgie (Marx). Die Autoren behaupten, dass die Wachstumsfaktoren (TGF- β , PDGF, etc.), die aus den aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden, zur Beschleunigung der Regeneration von Knochengewebe beitragen.

Obwohl in der Praxis Thrombozytenkonzentrate (PRP) immer häufiger zur Regeneration von Hartgeweben eingesetzt werden, gibt es bis heute noch wenig belastbare klinische Daten von Untersuchungen, die den Erfolg von PRP unterstützen. Infolge dessen werden vermehrt Versuche zur Reproduktion der Wirkung von PRP in vitro durchgeführt.

Die Fachliteratur berichtet von Versuchen in verschiedenen in vitro Modellsystemen. Diese untersuchen zum einen die Wirkung von nicht mit Calcium mit/ohne thrombinaktivierten Thrombozyten, zum anderen die Wirkung von reinen, nicht aus PRP freigesetzten Wachstumsfaktoren (TGF- β , PDGF) auf osteoblastenähnliche Zellen [103-105].

Von der Wirkung der von Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren wird ebenfalls berichtet. In diesen Versuchssystemen wurden die Thrombozyten allerdings zuerst eingefroren. Die Wachstumsfaktoren wurden durch das darauf folgende Auftauen bzw. Denaturieren der Thrombozyten gewonnen [69,71]. Die

Ergebnisse dieser Versuche sind daher nicht ohne weiteres auf die Anwendung von PRP in vivo übertragbar.

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, die für die Anwendung von PRP propagierte Beschleunigung der Heilvorgänge in Knochengewebe durch in vitro Untersuchungen zu verifizieren, eventuell eine Optimierung der Verfahren zu erreichen.

PRP wird in der Regel so eingesetzt, dass eine möglichst hohe Konzentration von Wachstumsfaktoren erreicht wird [19]. Dennoch zeigen Studien, dass eine zu hohe Wachstumsfaktorkonzentration in der Wunde eher eine Hemmung der Zellproliferation (z.B. Osteoblasten) bewirken kann [30].

Zur Herstellung von PRP steht eine Reihe von Methoden zur Auswahl. Variationen sind sowohl bezüglich des Ausgangsmaterials (Citratblut, EDTA-Blut), bezüglich der zur Anreicherung eingesetzten Methoden (Zellseparator, verschiedene differenzielle Zentrifugationsprotokolle) als auch bezüglich der Gerinnungsauslösenden Zusätze möglich. Als Aktivierungsfaktoren der Gerinnung von PRP werden in der Regel, wie schon bereits erwähnt, Thrombin allein oder zusammen mit Calcium in verschiedenen Konzentrationen benutzt.

Alle genannten Komponenten von PRP können eine Rolle bei der Wirkung von PRP auf das Knochengewebe spielen. Inwiefern jede einzelne Komponente an der propagierten Wirkung von PRP beteiligt ist, ist heute noch nicht bekannt. Deswegen fällt es schwer, Risiko und Nutzen der Therapie mit PRP abzuschätzen.

Bevor PRP in der Praxis breit eingesetzt wird, sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Kann eine stimulierende Wirkung von PRP auf die Zielzellen, z.B. eine Förderung der Proliferation, *in vitro* nachgewiesen werden?
- Kann diese Wirkung einer oder mehreren bestimmten Komponenten der PRP-Präparation zugeordnet werden? Wenn ja, welcher oder welchen?
- Kann die Wirkung von PRP durch Modifikation der Präparation optimiert werden und kann dementsprechend eine Optimierung von Herstellerprotokollen vorgenommen werden?

Um diese Fragen zu beantworten sollten *in vitro* Bioassaysysteme aufgebaut werden, die möglichst getreu der *in vivo* Situation konzipiert sind.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Allgemeine Zellkultur- Materialien und Geräte

Für die Versuche wurden die folgenden gemeinsamen Materialien benutzt:

- SAOS-2-Osteoblasten (human osteogenic sarcoma) (DSMZ Nr. ACC 243)
- MC3T3-E1 mouse embryo / fetus calvaria fibroblasts (Präosteoblasten) (DSMZ Nr. ACC210)
- McCoy's Medium(Sigma Nr. M8403)
- α -MEM Medium (Gibco Nr. 22571-020)
- Trypsin/EDTA (Cascade Biologics Nr. R-001-100)
- 75 cm² Kulturflaschen (Costar Nr. 3376)
- Fetal Calf Serum (FCS) (PAA Nr. A15-773)
- Calcium Chlorid Pure (Serva Nr. 15585)
- Thrombin (Sigma T4648)
- Pipetten
- Pipettenspitzen

Geräte:

- CO₂-Brutschrank (Heraeus)

2.1.2 *Materialien und Geräte für die Versuche mit Calcium und Thrombin*

Materialien:

- 96well-Platten (Costar Nr. 3596)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco BRC)
- XTT-Kit (Boeringer Mannheim Nr. 1465015)
- BrdU-Kit (Boeringer Mannheim Nr. 1647229)

Geräte:

- ELISA-Reader (340 ATTC Fa. SLT Labinstruments GmbH)

2.1.3 *Materialien und Geräte für die Versuche mit PRP-Überstand*

Materialien:

- 96well-Platten (Costar Nr. 3596)
- BrdU-Kit (Boeringer Mannheim Nr. 1647229)

Materialien zur Blutentnahme

- S-Monovetten (10 ml mit 1 ml Citrat) (Fa. Sarstedt)
- Butterfly
- Staubbinde
- Sterile Handschuhe
- Tupfer
- Desinfektionsmittel
- Pflaster

Materialien zur Herstellung des PRP-Überstands

- Handschuhe
- S-Monovetten (Fa. Sarstedt)
- Neutral Monovetten (Fa. Sarstedt)
- Nadeln

- Monovetten Adapter

Geräte:

- Zentrifuge (Biofuge T, Firma Heraeus)
- Zentrifuge (Minifuge 15, Firma Heraeus)
- ELISA-Reader

2.1.4 *Materialien und Geräte für die Versuche mit Membraneinsätzen*

Materialien:

- 24well-Platten (Falcon Nr. 3504)
- B. D. Falcon Cell Culture Insert Companion Plates (24 well plates) (Falcon Nr. 353504)
- Cell Culture Inserts mit Translucent PET Membrane 3 μm Porengrösse, (für 24well-Platten) (Falcon Nr. 3096 50133)
- Thrombo Plus Röhrchen 2 ml (Sarstedt Nr. 51.334)
- Calcein AM (Sigma Nr. C1359)
- Ethidiumbromid (EB) (Sigma Nr. E-8751)

Geräte:

- Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon)
- Kamera (Olympus)

2.1.5 *Materialien für BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Proliferationstest:*

Geräte:

- ELISA-Reader (340 ATTC Fa. SLT Labinstrumente GmbH)
- Mikroskop

2.1.6 *Materialien für die Erstellung der Calcein/EB-Farblösung:*

- Calcein AM (Sigma Nr. C1359)
- Ethidiumbromid (EB) (Sigma Nr. E-8751)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco BRC)
- Reagenzgläser
- Waage
- Vortex

2.1.7 *Materialien und Geräte für die DNA-Isolierung*

Materialien:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Boehringer Mannheim)
- Filter-Tube (Fa. Boehringer Mannheim)
- Auffanggefäße (Fa. Boehringer Mannheim)
- 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße
- Thermometer

Geräte:

- Standard-Tischzentrifuge (Heraeus, Biofuge 15), mit einer Zentrifugalbeschleunigung bis 15000xg
- Wasserbad
- Vortex

2.2 Methoden

Um die Wirkung der aus den PRP-Präparationen freigesetzten Wachstumsfaktoren auf die Zellen beobachten zu können, wurden die folgenden Messmethoden benutzt:

2.2.1 XTT Test

Der XTT Test dient dem Nachweis der Stoffwechselaktivität der Mitochondrien und damit der Lebensfähigkeit der Zelle. Das Messprinzip beruht bei diesem Test auf der Bildung eines Farbstoffs durch mitochondriale Dehydrogenasen. Anschließend wird die Menge des Farbstoffs, der innerhalb eines bestimmten Messzeitraums gebildet wurde, photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers ermittelt. Der XTT Test wurde in dieser Arbeit benutzt um die Wachstumsrate der Zellen zu bestimmen.

Der XTT Test wurde mit Hilfe vorgegebener Kits (XTT Kit, Boeringer Mannheim Nr. 1465015) durchgeführt. Dieses XTT Kit besteht aus:

- XTT Labeling Reagent (Reagenz 1)
- Electron-Coupling Reagent (Reagenz 2)

Testablauf:

Der XTT-Kit wurde zuerst in Reagenzgefäße portioniert (je 2,5ml Reagenz 1 und je 50µl Reagenz 2) und bei -20°C eingefroren. Für den XTT Test wurden 2,5ml Reagenz 1 und 50µl Reagenz 2 aufgetaut und vereinigt (XTT Reagenz).

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde aus jedem Well von den insgesamt 220µl Flüssigkeit 70µl Medium herausgenommen. Dann wurden pro Well 50µl XTT Reagenz zugegeben. Die Farbreaktion in den Wells wurde nach zwei Stunden

Einwirkungszeit bei Raumtemperatur mittels ELISA-Reader gemessen. Für die Messung im ELISA-Reader wurde eine Messwellenlänge von 492nm und eine Referenzlänge von 620nm ausgewählt.

2.2.2 PRP-Herstellung mit der Curasan Methode

Das Curasan PRP-System existiert seit September 1999 auf dem Markt [16]. Somit ist Curasan eine der ersten Firmen, die PRP-Herstellmethoden für den Zahnarzt in der Praxis („chair side“) anbieten. Die Durchführung der PRP-Herstellung ist in vier Schritte unterteilt [siehe Anhang].

1. Durch eine oder mehrere Citrat-Monovetten (CPDA-Monovetten-10ml) wird dem Patienten venöses Blut abgenommen. Um die Abnahme einer größeren Blutmenge ohne hohen Aufwand für den Patienten zu ermöglichen, wird bei der Abnahme ein Butterfly verwendet.
2. Die Monovette wird bei einer niedrigen G-Zahl (900xg) zentrifugiert, um die Erythrozyten und die Leukozyten vom plättchenhaltigen Plasma zu trennen. Das plättchenhaltige Plasma wird nach der Trennung in eine zweite neutrale Monovette überfüllt. Diese Monovette wird bei einer höheren G-Zahl zentrifugiert. Dadurch werden Plättchen von Plasma getrennt. Nach dem Zentrifugieren befinden sich die Thrombozyten als Pellet auf dem Monovettenboden. Der Überstand ist plättchenfreies Plasma (Platelet Poor Plasma – PPP).
3. Nach der Entfernung des Überstandes bleibt in der Monovette nur 300µl Restvolumen Plasma, welches das Pellet beinhaltet. Durch Resuspendieren des Pellets in dem verbleibenden Plasma wird das Thrombozytenkonzentrat (PRP) hergestellt.
4. Im nächsten Schritt wird das Thrombozytenkonzentrat durch Zugabe von Calcium mit/ohne Thrombin zur Gerinnung gebracht und sofort verwendet.

2.2.3 *BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Proliferationstest*

Testprinzip

Der BrdU Proliferationstest ist eine nicht-radioaktive Methode, die zur Quantifizierung des Zellwachstums als Standardtechnik im Labor benutzt wird. Das Testprinzip besteht aus einer Markierung aller im Testzeitraum neu gebildeten Zellen. Dazu wird ein Marker in Form eines „falschen“ DNA-Bausteines (Bromdesoxy-Uridin; BrdU) dem Zellkulturmedium zugefügt (10µl BrdU-Labeling zu 100µl Zellkultur-Medium) und zwischen 2 und 24 Stunden im Medium gelassen. In dieser Zeit wird das Pyrimidinanalog BrdU an Stelle von Thymidin in die DNA aller neu gebildeten Zellen eingebaut. Der Test wurde mittels eines Kits (siehe Materialien) durchgeführt.

Nach der Ablauf der vorgegeben Zeit wird das Zellkulturmedium mit einer Strahlpumpe abgesaugt. Die Zellen auf dem Wellboden werden mit FixDenat Lösung fixiert. Durch FixDenat wird gleichzeitig die DNA der Zellen denaturiert und somit der Zugang für einen gegen BrdU gerichteten, mit Peroxidase gekoppelten Antikörper (Anti-BrdU-POD) geschaffen. Anti-BrdU-POD bindet sich an das Thymidinanalog BrdU und erkennt in die DNA eingebautes BrdU. Anschließend wird die Menge des eingebauten BrdU durch eine nachgeschaltete Peroxidase-Farbreaktion mittels ELISA-Reader bestimmt.

Die Extinktion (die Intensität der Färbung) bildet ein direktes Maß für die Proliferation der Zellen während der Markierungszeit.

2.2.4 *Die Thrombozytapherese*

Eine Methode zur Herstellung von PRP für größere chirurgische Interventionen ist die Thrombozytapherese. Bei der Thrombozytapherese werden die Thrombozyten von Erythrozyten und Leukozyten, in einem Durchlaufverfahren mittels eines

Zellseparators abgetrennt. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass eine größere Menge von Thrombozytenkonzentrat unter minimaler Patientenbelastung hergestellt werden kann.

Für die Thrombozytapherese stehen spezielle Blutabnahmeeinrichtungen, in Kliniken bzw. in Rahmen der Transfusionsmedizin, zur Verfügung. Bei dem Verfahren wird zuerst, wie beim Blutspenden, nach der Hautdesinfektion eine Vene in der Ellenbeuge punktiert. Ein Druckmesser gewährleistet, dass Blutdruckschwankungen sofort registriert und gemeldet werden. Das Blut fließt über eine Pumpe in den Zellseparator. Im Zellseparator wird mittels einer rotierenden Trennkammer ein Teil der Blutplättchen abgetrennt.

Die übrigen Blutbestandteile werden wieder gemischt und über eine zweite Kanüle in der Ellenbeuge des anderen Armes in den Blutkreis des Spenders sofort zurückgegeben. In ständigem Wechsel nimmt der Zellseparator Blut ab oder gibt es zurück. Damit das Blut im Schlauchsystem nicht gerinnt, wird ihm ein Gerinnungs-hemmender Zusatz (Citrat) beigemischt, der innerhalb weniger Minuten im Körper abgebaut wird. Das separierte Blutvolumen beträgt etwa 2,5 bis 4,0 Liter. Die Separation dauert etwa 60 bis 90min..

Für die *in vitro* Versuche, bei welchen grössere Mengen an PRP gebraucht wurden, wurde als Methode zur PRP-Herstellung die Thrombozytapherese gewählt.

2.2.5 *Fluoreszenzmikroskopische Vital-Färbung*

Die Fluoreszenzmikroskopische Vital-Färbung ist eine Methode, durch welche die lebenden von den toten Zellen unterschieden werden können. Für die Methode wird eine Färbelösung hergestellt, die aus Calcein und Ethidiumbromid besteht.

Das Färbeprinzip

Calcein ist ein Fluorogen, welches durch enzymatische Spaltung in einen fluoreszierenden Stoff umgewandelt werden kann. Das apolare Calcein kann die Zellwand durchdringen und wird intrazellulär durch den aktiven enzymatischen Stoffwechsel in polares Calcein umgewandelt. Das polare Calcein hat die Eigenschaft, zu fluoreszieren [34].

In diesem Zustand kann Calcein nicht mehr durch die Zellwand nach außen migrieren und wird intrazellulär akkumuliert. Dadurch kommt es zu einer „Fluorochromasie“ im Zytoplasma, welche unter UV-Anregung durch den Blaufilter eines Fluoreszenzmikroskops zu einer Grünfluoreszenz der gesamten Zelle führt. Tote Zellen können Calcein nicht spalten und produzieren entsprechend keine Fluoreszenz. Somit wird eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen möglich.

Ethidiumbromid (EB) ist ein Fluorochrom, das selbst fluoresziert und dazu benutzt wird, die toten Zellen sichtbar zu machen. EB kann leicht durch die zerstörte Membran toter Zellen eindringen und sich in deren Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) anlagern. Bei der Verwendung eines Grünfilters wird EB zum Fluoreszieren (Rotfluoreszenz) angeregt, so dass die toten Zellen erkennbar werden.

Durch diese Methode konnte man die Proliferation der Zellen in Vergleich zur Kontrolle bestimmen und gleichzeitig die lebenden von den toten Zellen unterscheiden.

Herstellung der Calcein / Ethidiumbromid (EB)-Färbelösung

Für die Herstellung der Färbelösung wurde 1mM Calcein Stammlösung in 1ml Hanks Lösung verdünnt. Die 1,5µg EB wurden in 1ml Phosphate Buffered Saline (PBS) gelöst. Je 50µl Calceinlösung und EB wurden eingefroren und vor dem Versuch aufgetaut. Danach wurden 50µl Calcein Lösung und 50µl EB Lösung in

10ml Hanks Lösung pipettiert. Die Färbelösung wurde mittels eines Vortex gemischt und sofort verwendet.

2.2.6 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung durch Phenol-Extraktion ist eine Methode, die dazu dient, die DNA aus Zellen zu isolieren. Dazu werden Phenol oder ein Gemisch aus Phenol und Chloroform zu den Zellen gegeben, gut gemischt und zentrifugiert. Für die DNA-Isolierung wurde ein High Pure PCR Template Preparation Kit von Fa. Boehringer Mannheim benutzt.

Protokoll zur DNA-Isolierung

Für den guten Ablauf des Testes ist es sehr wichtig, dass alle Schritte unter kontaminationsfreien Bedingungen durchgeführt werden.

Für den Test wurden die MC3T3-Präosteolasten zusammen mit PRP aus der 96-Well Platte in 1,5ml Reaktionsgefäße (Probenröhrchen) transferiert.

1. 200µl Gewebe-Lysepuffer und 40µl Proteinase K-Lösung werden gemischt und in die Probenröhrchen gegeben. Die Probenröhrchen wurden zuerst intensiv durchgemischt (10Sek. Vortex) und dann 10 min. bei 72°C inkubiert.
2. Danach wurden 200µl Bindungspuffer zugegeben und bei 95°C für weitere 5min. inkubiert.
3. Weiter wurden 100µl Isopropanol noch zugefügt und die Mischung erneut im Vortex gerüttelt.
4. Die Filter Tubes wurden in Auffanggefäße eingesetzt, die Mischung in das obere Reservoir pipettiert und anschließend 1 min. bei 6000xg in einer Standardzentrifuge zentrifugiert.

5. Der Durchlauf wurde verworfen, die Filter-Tube wieder in das Auffanggefäß gesetzt, 500µl Hemmstoffentfernungspuffer zupipettiert und noch einmal bei 6000xg zentrifugiert.
6. Daraufhin wurden die Proben zweimal mit je 500µl Waschpuffer gewaschen und wie im Schritt 5 zentrifugiert.
7. Anschließend wurden die Proben bei höchster Geschwindigkeit (15.500xg) zentrifugiert.
8. Zur Elution der DNA wurden 200µl auf 72°C erwärmter Elutions-Puffer zu den Proben gegeben und 1min. bei 6000xg zentrifugiert. Die DNA befindet sich im Eluat.
9. Die isolierte DNA wurde mittels Spektralphotometer – RNA/DNA Rechner GeneQuant gemessen.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Zellversorgung und Zellbestimmung

Für unsere Versuchssysteme wurden als Zellen SAOS-2-Osteoblasten und MC3T3-E1-Präosteolasten benutzt.

Die SAOS-2-Osteoblasten wurden in McCoy's Vollmedium kultiviert. Für die Herstellung des Vollmediums wurde 15% Fetal Calf Serum (FCS), 1% Antibiotika (Penicillin, Streptomycin-P/S) und 1% Glutamin. benutzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zwei mal pro Woche wurden die Zellen 1:3 gesplittet und weiter angeimpft.

Die MC3T3-E1-Zellen wurden in α -MEM Medium mit 15% FCS, 1% Antibiotika (Penicyllin, Streptomycin-P/S) und 1% Glutamin kultiviert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle drei Tage gesplittet. Für die Zellbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt.

Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellkulturen wurden an einem Nikon Lichtmikroskop durchgeführt.

2.3.2 Einfluss von Calcium auf die Zellproliferation

Bei der Vorbereitung von PRP kommen hohe Konzentrationen (bis 130mM) vom Calcium zum Einsatz, die normalerweise *in vivo* eine Hemmung der Zellen verursachen.

Die Wachstumsversuche mit Calcium wurden mit zwei Arten von Zellen (MC3T3-E1-Präosteolasten und SAOS-2-Osteoblasten), welche im vollsupplementierten Medium kultiviert wurden, durchgeführt. Diese Versuche dienten zur Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Calciumkonzentrationen, so wie sie in den PRP-Präparationen eintreten, auf Vorläuferzellen und auf Osteoblasten.

Für diese Versuche wurden 2 verschiedene Calcium-Stammlösungs-Verdünnungsreihen von 10mM bis 1000mM und von 10mM bis 1400mM in folgenden Konzentrationsstufen: 10mM, 50mM, 100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 600mM, 800mM, 1000mM, 1400mM hergestellt und im Verhältniss 1 zu 10 ins Zellkulturmedium zugegeben (s. u.).

Um die Verdünnungseffekte vom Calcium im Körper zu simulieren, wurden drei verschiedene Zeiträume, in den Calcium auf die Zellen einwirken konnte, untersucht: 3, 24 und 48 Stunden. Dazu wurden unter den gleichen Bedingungen zwei Reihen von Versuchen durchgeführt:

- Eine Versuchsreihe, in der die Stoffwechselaktivität der Zellen durch einen XTT-Test nachgewiesen wurde.
- Eine Versuchsreihe, in der die Zellproliferation durch BrdU-Test bestimmt wurde.

Einfluss einer Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration auf MC3T3-Präosteoblasten

In einem ersten Schritt wurde der Effekt von PRP auf die MC3T3-Präosteoblasten beobachtet. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Proliferation, besonders die von Vorläuferzellen, eine sehr wichtige Rolle bei der Beschleunigung der Wundheilung spielen könnte.

Für diese Versuche wurden MC3T3-Präosteoblasten von Passage 10 bis Passage 30 benutzt. Die Numerierung der Passagen erfolgte, nachdem die Zellen aus dem im Labor existierenden N₂-Tank herausgenommen und aufgetaut wurden. Weil die Ca-Konzentration bei der in dieser Arbeit eingesetzten PRP-Herstellungsmethode bis auf etwa 90mM ansteigt, wurde für diese Versuche eine Calcium-Endkonzentration von 1 bis 100mM-Endkonzentration, zusätzlich zu der schon bereits in dem Zellkultur-Medium existierenden Ca⁺⁺-Konzentration (1,8mM) eingesetzt.

5.000 Zellen/well wurden in eine 96well-Platte in 200µl α-MEM Vollmedium für 24h kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch frisches α-MEM Vollmedium ersetzt. Die Ca⁺⁺-Stammlosungen (zwischen 10mM und 1000mM) wurden im Verhältniss 1 zu 10 (20µl Ca⁺⁺-Stammlösung zu 200µl Medium) ins Kulturmedium gebracht. Die Einwirkungszeit der verschiedenen Ca-Konzentrationen betrug jeweils 3, 24 und 48 Stunden.

XTT-Test

Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität erfolgte für alle Zellen einheitlich 24h nach Ca-Zugabe.

Die Einwirkungszeit der erhöhten Ca-Konzentration wurde bei einem Teil der Zellen jedoch auf 3h begrenzt. In diesen Kulturen wurde das Medium mit der erhöhten Ca-Konzentration nach 3h abgesaugt und wieder durch normales Vollmedium ersetzt. Bei den anderen Kulturen blieb die erhöhte Ca-Konzentration für 24h, bis zum Beginn des XTT-Tests, konstant.

Für die Durchführung des XTT-Tests wurden jeweils 70µl Medium aus den Wells genommen und 50µl XTT-Reagenz zugegeben. Nach 2 Stunden Einwirkungszeit wurde die Stoffwechselaktivität mittels ELISA-Reader bestimmt.

BrdU-Test

Die Bestimmung der Zellproliferation wurde für alle Zellen nach 48h nach Ca-Zugabe durchgeführt. Bei einem Teil der Zellen wurde die erhöhte Ca-Konzentration für 3h einwirken gelassen. Nach 3h wurde das Medium mit der erhöhten Ca-Konzentration abgesaugt und frisches Vollmedium zu den Zellkulturen gegeben. Bei den anderen Kulturen blieb die erhöhte Ca-Konzentration für 48h, d. h. bis zum Ende des BrdU-Tests, konstant.

Für den BrdU-Einbau wurde 24h nach der Ca-Zugabe das BrdU-Label, welches in α -MEM Vollmedium gelöst wurde, in die Zellkultur zugegeben (im Verhältniss 1:10) und 24 Stunden einwirken gelassen. Nach 24 Stunden Markierungszeit wurde der BrdU-Test durchgeführt. Die Zellproliferation wurde nach 15min. Peroxidase-Farbereaktion mittels ELISA-Reader bestimmt.

Einfluss einer Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration SAOS-2-Osteoblasten

Zusätzlich wurden die Effekte von Calcium auf SAOS-2-Osteoblasten untersucht. In diesen Versuchen wurden auch die Effekte von noch höheren Ca-Konzentrationen auf Osteoblasten untersucht. Beim Einsatz bestimmter Methoden zur Herstellung von PRP kann die Ca-Konzentration lokal auf bis zu 130mM steigen. Entsprechend wurden für diese Versuchsreihe Ca-Konzentrationen zwischen 1 und 140mM eingesetzt.

Die SAOS-2-Osteoblasten (7500 Zellen/well) wurden in 200µl McCoy's Medium in 96well-Platten für 24 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit frischem Vollmedium gewechselt. Eine Ca⁺⁺-Stammlösung (zwischen 10mM und 1400mM) wurde im Verhältniss 1 zu 10 (20µl Ca⁺⁺-Stammlosung zu 200µl Medium) ins Kulturmedium (mit 0,9mM Ca-Konzentration) gebracht. Die Einwirkungszeit der verschiedenen Ca-Konzentrationen betrug jeweils 3, 24 und 48 Stunden.

XTT-Test

Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität erfolgte für alle Zellen einheitlich nach 24h nach Ca-Zugabe.

Die Einwirkungszeit der erhöhten Ca-Konzentration wurde bei einem Teil der Zellen jedoch auf 3h begrenzt. In diesem Kulturen wurde das Medium mit der erhöhten Ca-Konzentration nach 3h abgesaugt und wieder durch normales Vollmedium ersetzt. Bei den anderen Kulturen blieb die erhöhte Ca-Konzentration für 24h, bis zum Beginn des XTT-Tests, konstant.

Für die Durchführung des XTT-Tests wurden jeweils 70µl Medium aus den wells genommen und 50µl XTT-Reagenz zugegeben. Nach 2 Stunden Einwirkungszeit wurde die Stoffwechselaktivität mittels ELISA-Reader bestimmt.

BrdU-Test

Die Bestimmung der Zellproliferation wurde für alle Zellen 48h nach Ca-Zugabe durchgeführt. Bei einem Teil der Zellen wurde die erhöhte Ca-Konzentration für 3h einwirken gelassen. Nach 3h wurde das Medium mit der erhöhten Ca-Konzentration abgesaugt und frisches Vollmedium zu den Zellkulturen gegeben. Bei den anderen Kulturen blieb die erhöhte Ca-Konzentration für 48h, bis zum Ende des BrdU-Tests, konstant.

Für den BrdU-Einbau wurde 24h nach der Ca-Zugabe das BrdU-Label (in McCoy's Medium gelöst) in die Zellkultur zugegeben (im Verhältniss 1:10) und 24 Stunden einwirken gelassen. Nach 24 Stunden Markierungszeit wurde der BrdU-Test durchgeführt. Die Zellproliferation wurde, nach 15min. Peroxidase-Farbereaktion mittels ELISA-Reader bestimmt.

2.3.3 Wachstumsversuche mit Thrombin

Bei der Aktivierung von PRP wird, je nach Methode, bovines Thrombin in verschiedenen Konzentrationen (zwischen 1000 und 5000U/ml Thrombin) zugesetzt [4,37,50]. Bei der hier eingesetzten Curasan-Methode zur PRP-Herstellung wurden verschiedene Thrombin-Endkonzentrationen (4,5; 18; 36 oder 91U/ml) erreicht. Daher wurde eine Thrombin-Verdünnungsreihe mit Endkonzentrationen zwischen 0,45U/ml und 91U/ml in Zellkultur-Medium hergestellt, welche die in dieser Arbeit eingetretenen Thrombin-Konzentrationen beinhalten.

Für dieses Versuchssystem wurden die gleichen Zellen (MC3T3-E1-Präosteoblasten, 5000 Zellen/well/200µl α -MEM Medium) eingesetzt. Die Zellen wurden für 24h in Vollmedium vorinkubiert. Nach 24h wurde das Medium gewechselt. Eine Gruppe der Zellen bekam Vollmedium, die zweite Gruppe dagegen nur Basalmedium. Beide Gruppen bekamen danach die Thrombin-

Verdünnungsreihe. Als Kontrolle wurden Zellen in Basalmedium und Vollmedium, ohne Zugabe von Thrombin, kultiviert. In den gleichen Tag, nach 2h, wurde das Label für den BrdU-Einbau ins Medium eingebracht. Nach weiteren 24h, erfolgte die Durchführung des BrdU-Tests. Nach ca. 15min. Entwicklung der Peroxidase-Farbereaktion wurde die Vermehrungsrate mittels ELISA-Reader gemessen.

2.3.4 *Versuche mit angereicherten Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand)*

Dieser Versuch wurde über einen Zeitraum von insgesamt drei Tagen durchgeführt.

Am ersten Tag wurden die Zellen (MC3T3-E1-Präosteoblasten) gesplittet, gezählt und 7.500 Zellen/well/200µl α-MEM Vollmedium in eine 96well-Platte angeimpft. Die Zellen wurden 24h bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Am zweiten Tag folgte ein Wechsel des Mediums auf α-MEM Basalmedium ohne FCS mit 1% Glutamin. und 1% P/S. Gleich danach wurde der die Wachstumsfaktoren enthaltende PRP-Überstand zu den Zellkulturen gegeben (Endkonzentrationen: 5%, 20% bzw. 40% PRP-Überstand im Basalmedium).

Herstellung von PRP-Überstand und PPP

Für die Versuche wurden Blutproben von den im Labor arbeitenden Personen entnommen. Das Blut wurde aus der Ellenbeugenvene in CPDA-Monovetten entnommen und sofort verwendet. PRP und PPP wurden mittels der Curasan Methode hergestellt.

Die Thrombozytenkonzentration im Ausgangsblut lag bei unseren Versuchen zwischen 270.000 und 320.000 Thrombozyten/µl, in PRP jedoch bei 950.000-1.000.000 Thrombozyten/µl (ein Anreicherungsfaktor von etwa 3,4).

Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden wird für die PRP-Zubereitung eine 10%-ige CaCl_2 Lösung mit oder ohne 1000 – 5000 U/ml Thrombin benutzt. Für die hier beschriebenen Versuche wurde eine 5%ige CaCl_2 -Lösung mit und ohne 1.000 U/ml von bovinem Thrombin benutzt.

Eine Stunde nach der Aktivierung der Gerinnung wurde PRP mittels der Laborzentrifuge bei 15.000xg (entspricht 18.000rpm) für 15min. zentrifugiert. Der Überstand wurde zu den Zellen gegeben.

Als Kontrolle wurden eingesetzt:

- Zellen mit 5%, 20% bzw. 40% Platelet Poor Plasma (PPP)
- Zellen mit den koagulierenden Agentien der PRP-Präparation (CaCl_2 , Thrombin) in der gleichen Endkonzentrationen wie sie durch das zugegebene PRP erreicht werden
- Zellen ohne Supplemente

Die Zellproliferation wurde nach 24h durch einen BrdU-Test bestimmt. Für den BrdU-Test wurde im gleichen Tag der PRP-Zugabe auch das BrdU-Label (in α -MEM Basalmedium gelöst) im Verhältnis 1 zu 10 zu den Zellkulturen gegeben. Die Einwirkungszeit von PRP wurde auf 24h fegelegt, während das Labelzeitraum 18h betrug.

2.3.5 *Versuche mit vollständiger PRP-Präparation in Membraneinsätzen*

Das Testsystem wurde auf Basis von Multiwell-Kulturplatten und Membraneinsätzen aufgebaut.

Sinn dieses Ansatzes war es, die Gerinnung des Fibrinclots unter simulierten Körperbedingungen bei 37°C in den Membraneinsätzen des Kultursystems durchzuführen. Zusätzlich konnten die Wachstumsfaktoren unmittelbar nach der

Freisetzung aus der α -Granula der Thrombozyten durch die Membraneinsätzen ins Zellkulturmedium in Kontakt mit den Zellen kommen. Weiter wurde die Wirkung der freigesetzten Wachstumsfaktoren auf die Zellen am Boden der Kulturgefäße über einen Zeitraum von 24h untersucht.

In diesen Versuchen wurden MC3T3-Präosteoblasten (18.000 Zellen/well/600 μ l α -MEM Vollmedium) eingesetzt. Nach 24h Wachstumszeit wurde das Medium durch Basalmedium ersetzt und die Membraneinsätze in die Wells eingebracht.

Daraufhin wurden je 200 μ l PRP bzw. PPP in die Membraneinsätze gebracht und anschließend mit 20 μ l Aktivatorlösung aktiviert, die 5% CaCl₂ und 1.000U Thrombin pro 1ml H₂O enthielt. Der Versuch beinhaltete je zwei Parallelproben pro Versuchsgruppe.

Aufgrund des viel größeren Bedarfs an PRP wurden diese Versuche mit Thrombozytenkonzentraten aus der Blutbank durchgeführt (durch Thrombozytapherese hergestellt). PPP wurde durch zusätzliches Zentrifugieren (900g, 10min.) mittels einer Labor-Zentrifuge hergestellt.

Als Kontrolle wurden genommen:

- Zellen, in Basalmedium kultiviert
- Zellen, in Vollmedium kultiviert
- 5%ige Calciumlösung in den Membraneinsätzen
- 1.000 U/ml Thrombinlösung in den Membraneinsätzen

Nach 24h wurden die Membraneinsätze entfernt. Die Zellproliferation wurde durch Vitalfärbung mikroskopisch ausgewertet. Die Thrombozytenzahl wurde zusätzlich mittels Thrombo-Plus Röhrchen bestimmt. Im Durchschnitt lagen die Werte bei 2.000.000 Thrombozyten/ μ l in PRP und 100.000 Thrombozyten/ μ l in PPP.

Nach 24h Einwirkungszeit wurde die Proliferation der MC3T3-Präosteolasten durch Auszählung nach fluoreszenzmikroskopischer Färbung gemessen.

Fluoreszenzanfärbung

Die Zellen in den Wells wurden für 10min. mit 300µl Calcein/EB-Farblösung benetzt und unter dem Mikroskop bei Lichtanregung durch Grün- bzw. Blaufilter dargestellt.

Quantitative Bestimmung und Auswertung der Zellen

Die Wells wurden unter dem Mikroskop unter 100facher Vergrößerung auf Diafilm (Fuji Provia 400) fotografiert. Es wurden mindestens zwei Fotos pro Well gemacht. Um die Zellen zählen zu können, wurden die Dias gescannt und vergrößert. Auf jedem Foto wurden die Zellen gezählt und für die Parallelproben wurde ein Mittelwert gebildet.

Der Versuch wurde wie oben beschrieben insgesamt drei Mal durchgeführt. Die Beeinflussung der Wachstumsrate durch PRP, PPP und Thrombin wurde jeweils gegenüber der Kontrolle (Zellen in Basalmedium) bewertet. Dazu wurde für jeden Versuch die jeweilige mittlere Zellzahl für die Kontrolle als interner Standard des jeweiligen Versuchs gleich 100% gesetzt und alle Werte auf diese Referenz bezogen. Diese Art der Auswertung erlaubt eine Mittelwertbildung und Abschätzung der Messungenauigkeit durch die Berechnung der Standardabweichungen unter Einbeziehung aller Messwerte.

2.3.6 Versuche mit MC3T3-E1-Präosteoblasten, die in PRP als Matrix eingebettet sind

Im klinischen Einsatz wird Knochentransplantat mit PRP gemischt und in die Wunde eingebracht [63]. Dadurch befinden sich die Zellen in unmittelbarem Kontakt mit einer PRP-Matrix und werden direkt von Wachstumsfaktoren beeinflusst.

Im nächsten Schritt wurde daher der Einfluss von PRP auf Zellen beobachtet, die sich in aktiviertem PRP befanden. Das Versuchssystem wurde entwickelt, um der *in vivo* Situation näher zu kommen. Durch das Versuchssystem waren die Zellen den Wachstumsfaktoren unmittelbar ausgesetzt.

Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Zellkonzentrationen durchgeführt: 5.000, 15.000 und 25.000 Zellen/well. Es wurden jeweils zwei Parallelproben eingesetzt. Die Zellen wurden direkt in einer 96 Wellplatte in 200µl PRP kultiviert.

Als Kontrolle wurden die gleiche Anzahl Zellen jeweils in PPP angeimpft. Die PRP- und PPP-Präparationen, die die Zellen beinhalteten, wurden sofort mit 20µl Aktivatorlösung (5% CaCl₂ und 1.000U Thrombin pro 1ml H₂O) zur Gerinnung gebracht. Die Zellen wurden für 48h kultiviert.

Nach 48h wurde das Clot aus jedem well entnommen und in Mikroreaktionsgefäße transferiert. Anschließend wurde die DNA der Zellen durch DNA-Isolierung (siehe Materialien und Methoden Kapitel 2.2.6) bestimmt.

3 Ergebnisse

Der Einfluss von PRP auf die Zellproliferation wurde anhand verschiedener physiologischer Parameter untersucht. Es wurden Untersuchungen zur Beeinflussung der Stoffwechselaktivität (XTT-Test), der DNA-Synthese (BrdU-Einbau), der Zellzahl (mikroskopische Quantifizierung nach Vitalfärbung) und der Proliferation, gemessen an der gebildeten Gesamt-DNA-Menge durchgeführt.

Bei den Untersuchungen wurden Präosteoblasten (MC3T3-Präosteoblasten) und Osteoblasten (SAOS-2- Osteoblasten), die als vermutliche primäre Zielzellen für PRP in vivo gelten können, eingesetzt.

Die für PRP propagierten Effekte werden auf die Freisetzung spezifischer Wachstumsfaktoren aus den α -Granula aktivierter Thrombozyten zurückgeführt.

Um diese spezifischen, durch Wachstumsfaktoren hervorgerufenen Effekte von unspezifischen Stimulationen durch andere Bestandteile der PRP-Präparationen unterscheiden zu können, wurden verschiedene Versuchssysteme aufgebaut. In diesen Versuchen wurden die durch die einzelnen Komponenten bedingten Effekte vergleichend untersucht.

Im Folgenden sind Ergebnisse dargestellt zu:

- Einfluss der bei der Aktivierung von PRP eingesetzten Gerinnungsfaktoren Calcium und Thrombin (Kap. 3.1);
- Einfluss von aus PRP freigesetzten Wachstumsfaktor-Konzentraten (PRP-Überstand) im Vergleich zu PPP (Platelet Poor Plasma) sowie Calcium und Thrombin (Kap. 3.2);

- Einfluss vollständiger PRP-Präparationen, die in Membraneinsätzen koagulieren und so mittelbar in Kontakt mit den Zellen stehen, im Vergleich mit PPP (Kap. 3.3);
- Einfluss von PRP auf Zellen, die unmittelbar in das gelierende PRP als Matrix eingebettet werden, im Vergleich mit PPP (Kap. 3.4).

3.1 Ergebnisse der Versuche mit Calcium

PRP wird in der Regel durch Zugabe von 5% oder 10% Calcium zum Gerinnen gebracht. Dadurch werden Ca-Konzentrationen bis zu 130mM erreicht.

Der Einfluss erhöhter Ca-Konzentrationen auf MC3T3- und SAOS-2-Zellen wurde in Konzentrationsreihen ermittelt. Dabei wurde die im Medium vorliegende Konzentration von 1,8mM bzw. 0,9mM durch Zugabe von zusätzlichem Calcium in Konzentrationen von 1 bis 140mM erhöht.

Um den Verdünnungseffekt im Gewebe zu simulieren wurden zusätzlich zur konstanten Erhöhung der Ca-Konzentration über den gesamten Versuchszeitraum (24 bzw. 48h) auch Versuche zur kurzzeitigen (3h) Erhöhung des Ca-Spiegels in den Zellkulturen durchgeführt.

Bei den Versuchen zum Einfluss von Calcium auf die Zellen wurden jeweils zwei verschiedene biologische Parameter getestet:

1. die mitochondriale Stoffwechselaktivität mit Hilfe des XTT-Tests und
2. die Proliferation, gemessen anhand der DNA-Synthese mittels BrdU-Einbau.

3.1.1 *Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration auf MC3T3-Präosteoblasten*

Die Beeinflussung des Zellwachstums durch Calcium wurde im Vergleich zur Kontrolle (MC3T3-Präosteoblasten in Vollmedium) bewertet. Dazu wurde für jeden Versuch die jeweilige mittlere gemessene OD (optische Dichte) der Kontrolle als interner Referenzwert des jeweiligen Versuchs gleich 100% gesetzt. Alle Werte wurden dann auf diese Referenz bezogen. Diese Art der Auswertung erlaubt eine Mittelwertbildung und eine Abschätzung der Messungenauigkeit über mehrere Versuchsreihen durch die Berechnung der Standardabweichungen unter Einbeziehung aller Messwerte. Dazu wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen (StAbw. für Stichproben: $n-1$) für die jeweils vier Parallelproben in insgesamt drei Versuchen berechnet und als Balkendiagramm dargestellt.

Die Balken geben somit für jede Calciumkonzentration und für die Kontrolle den Mittelwert aller gemessenen Werte ($n=12$) sowie die Standardabweichung wieder.

Abb. 4 zeigt beispielhaft den Einfluss einer Ca-Konzentrationsreihe auf die Zielzellen in einem einzelnen Versuch.

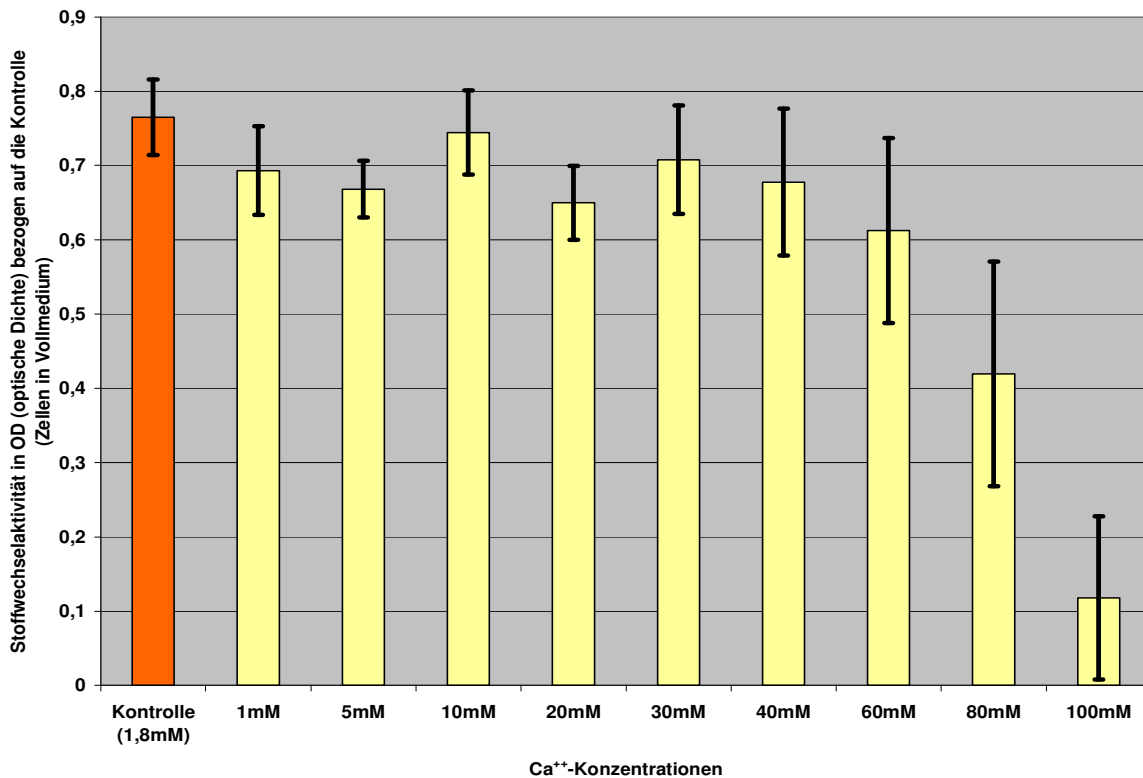


Abb. 4. Einfluss von Ca⁺⁺-Konzentrationsreihen auf die Zielzellen im einen einzelnen Versuch. Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Versuch (4 Parallelproben).

Um die Ergebnisse statistisch abzusichern wurden insgesamt drei unabhängige Versuchsreihen zur Stoffwechsellaktivität mittels XTT-Test durchgeführt. In der Summe zeigte sich nach 3h Ca⁺⁺-Einfluss (bei Ca⁺⁺-Konzentrationen zwischen 1mM und 60mM) eine Hemmung der Stoffwechsellaktivität in Mittel um 20% gegenüber der Kontrolle (Zellen in Vollmedium). Ca⁺⁺-Konzentrationen von 80mM bzw. 100mM bewirkten eine stärkere Hemmung der Stoffwechsellaktivität der Zellen um 41% bzw. 68% (Abb. 5).

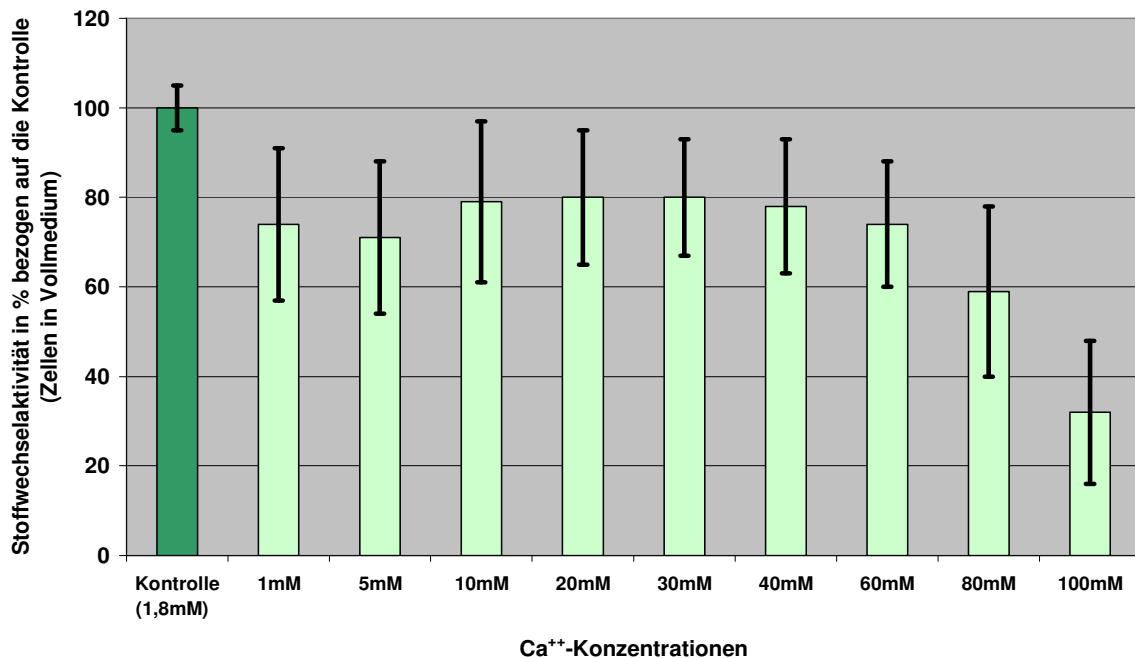


Abb. 5. Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von MC3T3-Präosteoblasten (XTT-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen mit je 4 Parallelproben.

Einfluss auf die Proliferation (BrdU-Einbau)

Es wurden drei unabhängige Versuche zur Zellproliferation mittels BrdU-Einbau durchgeführt.

Abb. 6 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse aller drei Versuche. Nach drei Stunden Einwirkungszeit zeigten die verschiedenen Calciumkonzentrationen praktisch keinen Einfluss auf die Proliferation von MC3T3-E1-Zellen gegenüber der

Kontrolle (Zellen im Vollmedium). Die Abweichungen von der Kontrolle lagen bis auf eine Ausnahme (80mM) unter 10%.

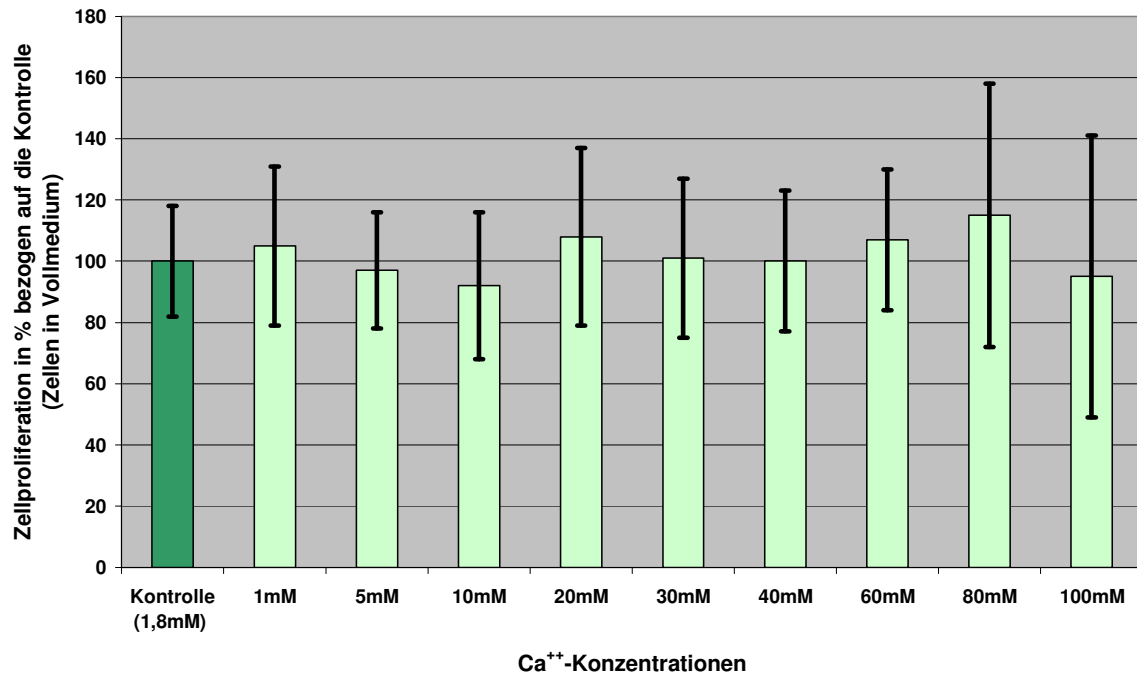


Abb. 6. Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von MC3T3-Präosteoblasten (BrdU-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen mit je vier Parallelproben.

3.1.2 *Einfluss einer langzeitigen (24-48h) Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration auf MC3T3-Präosteoblasten*

Einfluss auf Stoffwechselaktivität (XTT-Test)

Es wurden insgesamt drei unabhängige Versuche zur Stoffwechselaktivität mittels XTT-Test durchgeführt.

Eine Zusammenfassung aller drei Versuche zeigt Abb. 7. Nach 24h Calcium-Einfluss war die Stoffwechselaktivität insgesamt gehemmt. Eine 1mM Calciumkonzentration bewirkte eine Hemmung der Stoffwechselaktivität von 28%. Die Calciumkonzentrationen von 5mM und 10mM verursachten eine Inhibition der Stoffwechselaktivität der Zellen in Mittel von 25%. Ab 20mM bis 100mM Calciumkonzentration nahm die Hemmung progressiv zu. Bei einer Konzentration von 100mM Calcium betrug sie über 90%.

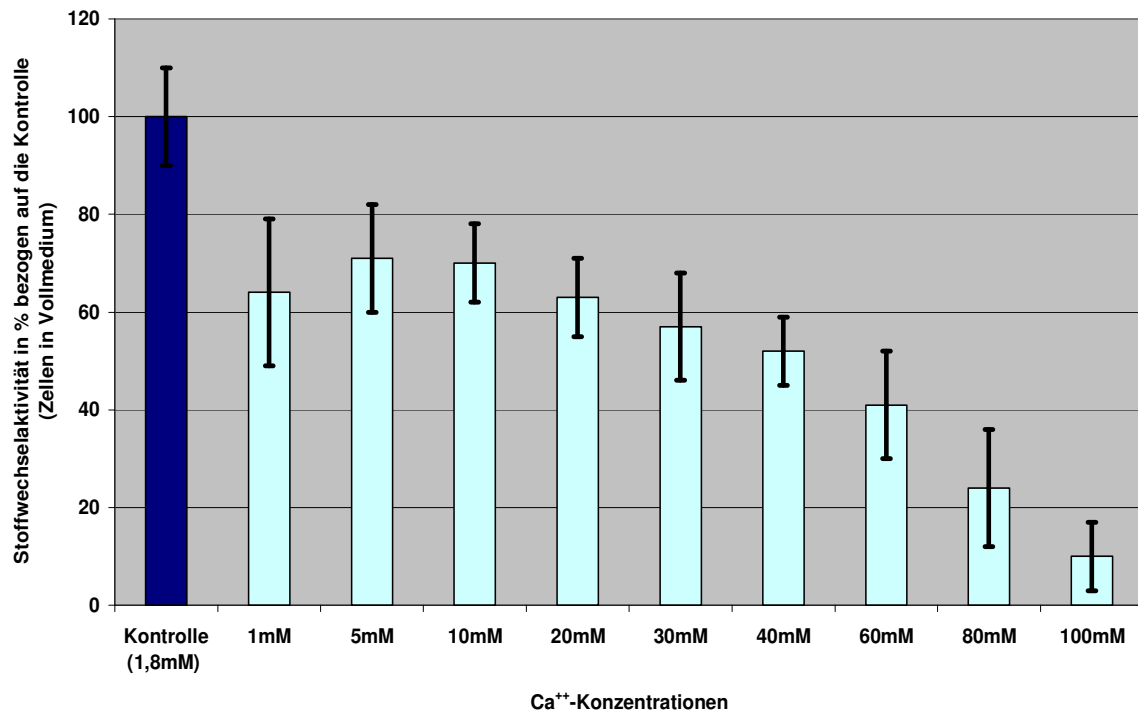


Abb. 7. Einfluss einer langzeitigen (24h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von MC3T3-Präosteoblasten (XTT-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium der Kontrolle existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen mit je vier Parallelproben.

Einfluss auf die Proliferation (BrdU-Einbau)

Es wurden drei unabhängige Versuche zur Zellproliferation mittels BrdU-Einbau durchgeführt.

Alle drei Versuche wurden in der Abb. 8 zusammengefasst. Nach 48h fördert eine Calciumkonzentration zwischen 1mM und 10mM die Stoffwechsellaktivität um ca. 20% im Vergleich mit der Kontrolle (maximale Wirkung von 30% Förderung bei

5mM). Ab 20mM bewirkte die Calcium-Zugabe eine progressive Hemmung der Stoffwechselaktivität der Zellen. Im Bereich 80mM und 100mM war fast keine Aktivität der Zellen mehr sichtbar, die Hemmung der Stoffwechselaktivität der Zellen lag bei 100mM im Bereich von 90 % verglichen mit der Kontrolle.

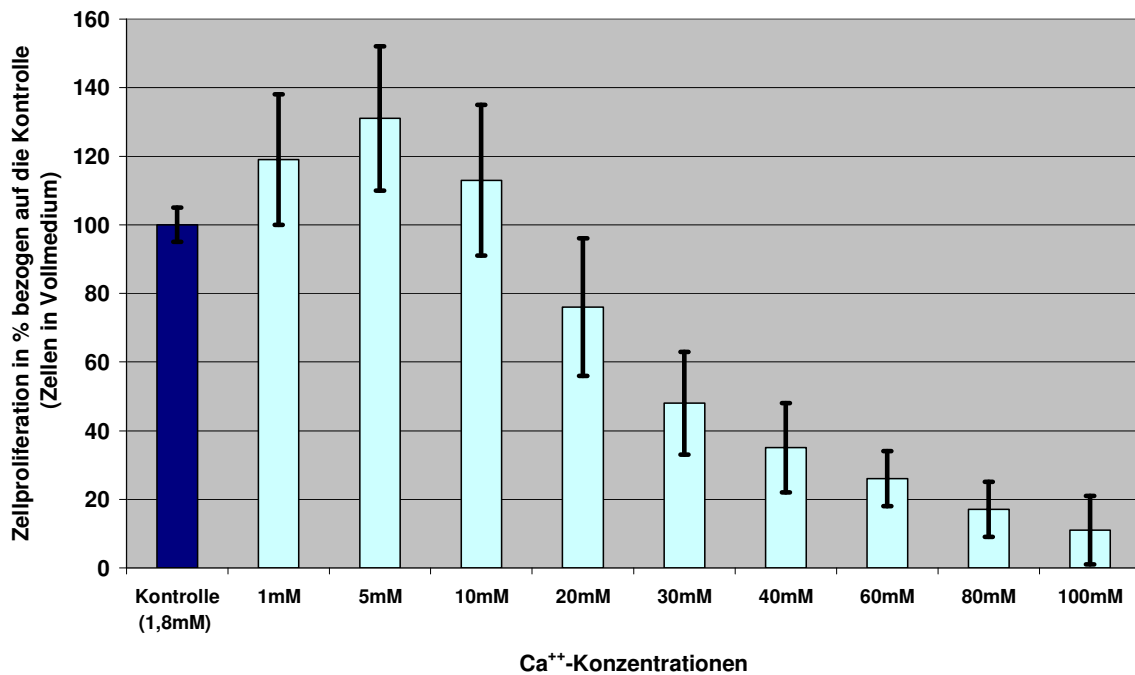


Abb. 8. Einfluss einer langzeitigen (48h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Konzentrationen im Kulturmedium auf das Wachstum von MC3T3-Osteoblasten (BrdU-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium der Kontrolle existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Versuchen mit je vier Parallelproben.

3.1.3 *Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration auf SAOS-2-Osteoblasten*

Einfluss auf Stoffwechselaktivität (XTT-Test)

Bei den Versuchen mit SAOS-2-Osteoblasten wurde die Calciumkonzentration bis zu 140mM erhöht.

Es wurden insgesamt vier Versuche zur Stoffwechselaktivität mittels XTT-Test durchgeführt.

Die Abb. 9 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse aller vier Versuche. Nach 3h hatte die Calcium-Verdünnungsreihe einen starken hemmenden Effekt auf die Stoffwechselaktivität der SAOS-2-Osteoblasten. Unter dem Einfluss vom Calcium (zwischen 1mM und 40mM Konzentration) sank die Stoffwechselaktivität der Zellen um etwa 60% (bei 40mM nur 56%) verglichen mit der Kontrolle. Ab 60mM Calciumkonzentration nahm die Stoffwechselaktivität progressiv ab. Bei einer 140mM Calciumkonzentration betrug die Hemmung 98%.

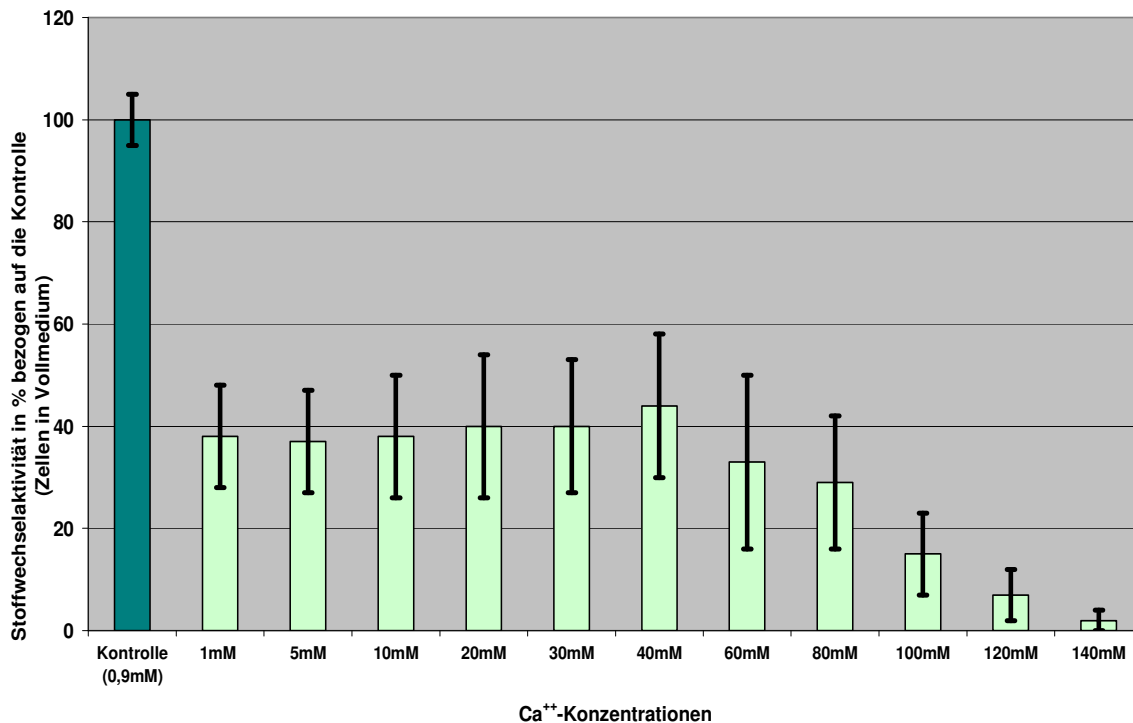


Abb. 9. Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von SAOS-2-Osteoblasten (XTT-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium der Kontrolle existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Versuche mit je vier Parallelproben.

Einfluss auf die Proliferation (BrdU-Einbau)

Es wurden fünf unabhängige Versuche zur Zellproliferation mittels BrdU-Einbau durchgeführt.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche wird in Abb. 10 dargestellt. Nach 3h Einfluss bewirkten die Calciumkonzentrationen zwischen 1mM und 80mM

eine Steigerung der Zellproliferation von etwa 10% bezogen auf die Kontrolle. Die 100mM Calciumkonzentration verursachte eine leichte Hemmung (von 4%) in der Zellproliferation. Die folgenden Calcium-Verdünnungen von 120mM und 140mM bewirkten eine stärkere Hemmung des Zellwachstums (24% bzw. 58%) im Vergleich mit der Kontrolle.

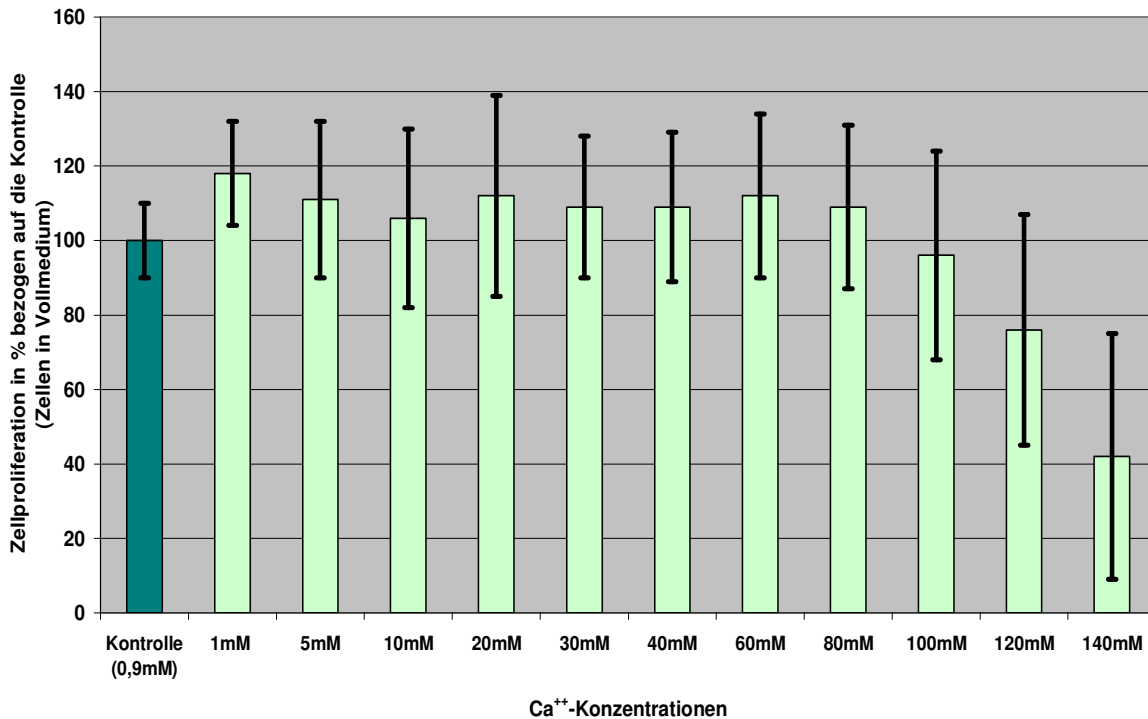


Abb. 10. Einfluss einer kurzzeitigen (3h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von SAOS-2-Osteoblasten (BrdU-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium der Kontrolle existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf Versuche mit je vier Parallelproben.

3.1.4 *Einfluss einer langzeitigen (24-48h) Erhöhung der Ca-Ionenkonzentration auf SAOS-2-Osteoblasten*

Einfluss auf Stoffwechselaktivität (XTT-Test)

Es wurden insgesamt vier Versuche zur Stoffwechselaktivität mittels XTT-Test durchgeführt.

Die Abb. 11 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse aller vier Versuche. Nach 24h Calcium-Einfluss war die Stoffwechselaktivität der SAOS-2-Osteoblasten gegenüber der Kontrolle (Zellen in Vollmedium) bei allen Konzentrationen gesunken. Dabei zeigte sich interessanterweise ein erstes Minimum der Aktivität (unter 20%) bereits bei einer Konzentration von 10mM Ca⁺⁺. Anschliessend stieg die Stoffwechselaktivität im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 40mM wieder auf annähernd 60% des Ausgangswertes an, um dann erneut kontinuierlich bis auf etwa 20% des Ausgangswertes (bei 120 und 140mM) zu sinken.

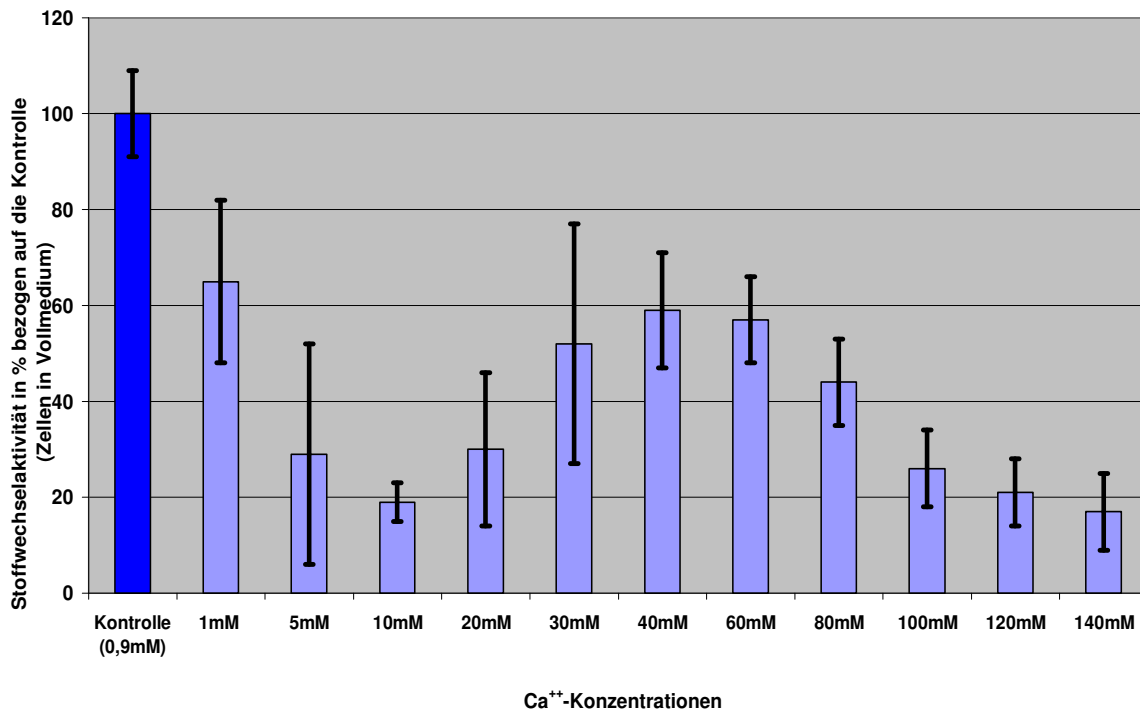


Abb. 11. Einfluss einer langzeitigen (24h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von SAOS-2-Osteoblasten (XTT-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium der Kontrolle existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier Versuche mit je vier Parallelproben.

Einfluss auf die Proliferation (BrdU-Einbau)

Es wurden fünf unabhängige Versuche zur Zellproliferation mittels BrdU-Einbau durchgeführt.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche wird in Abb. 12 dargestellt. Über einen längeren Zeitraum (48h) stimulierte 1mM Calcium die Proliferation der Zellen (+25%). Allerdings verursachten alle anderen Konzentrationen zwischen

5mM und 140mM eine starke Hemmung der Zellproliferation. Im Bereich 30-40mM Calcium wurde eine in Mittel 45%ige Hemmung des Zellwachstums festgestellt, welche bis 140mM weiter deutlich zunahm (bis zu 85%). Der Verlauf der DNA-Synthese folgte in etwa dem für die Stoffwechselaktivität (XTT) gemessenen Erscheinungsbild. Ein erstes Minimum wurde bei einer Calciumkonzentration von 10mM erreicht. Im Konzentrationsbereich zwischen 20 und 40mM Calcium nahm die Hemmung der Proliferation bis zu etwa 45% des Ausgangswertes ab, um dann weiter kontinuierlich bis auf unter 20% des Ausgangswertes (bei 100, 120 und 140mM) zu sinken.

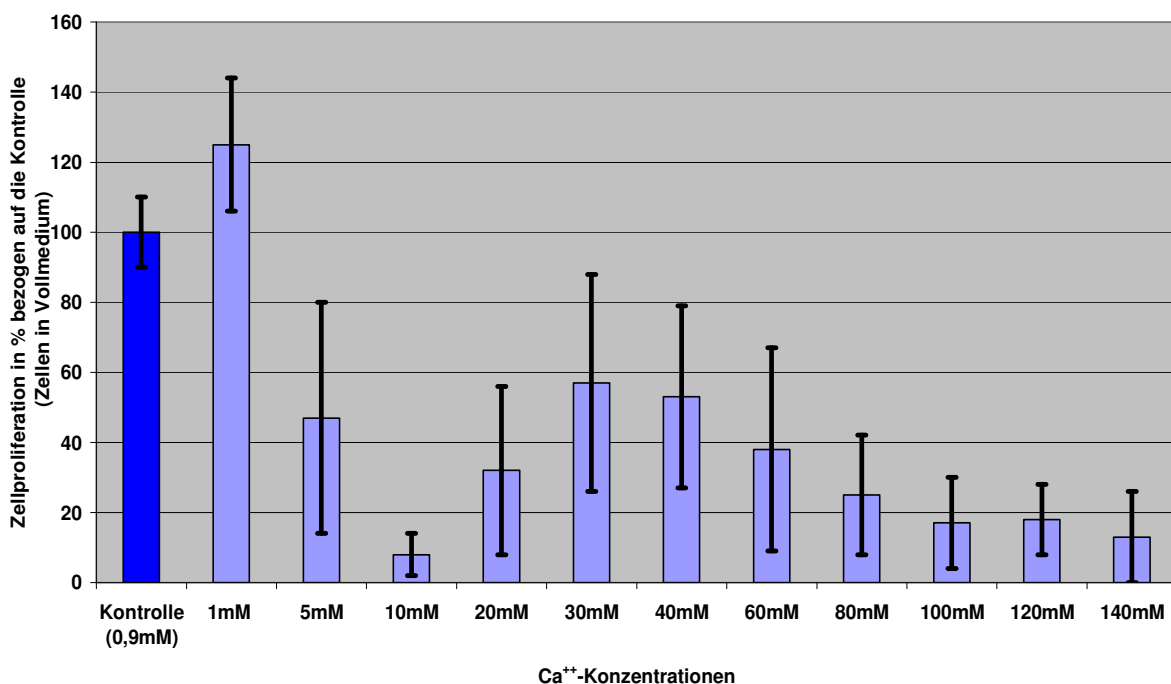


Abb. 12. Einfluss einer langzeitigen (48h) Erhöhung der Ca⁺⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium auf das Wachstum von SAOS-2-Osteoblasten (BrdU-Einbau). Die angegebenen Ca⁺⁺-Konzentrationen repräsentieren die zusätzlich zu der bereits im Medium der Kontrolle existierenden Ca⁺⁺-Konzentration zugegebenen Werte. Das

Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf Versuche mit je vier Parallelproben.

3.2 Ergebnisse der Versuche mit Thrombin

Je nach Herstellungsmethode werden in PRP Konzentrationen von bis zu etwa 130U/ml Thrombin erreicht. In dieser Arbeit wurde bei der Herstellung von PRP maximal 91U/ml Thrombin-Konzentration erreicht. Daher benutzten wir eine Verdünnungsreihe zwischen 0,5U/ml und 91U/ml Thrombin, um den Einfluss von Thrombin auf die MC3T3-Präosteoblasten zu beobachten.

Um beobachten zu können, ob die Zugabe von Thrombin auch bei vollsupplementiertem Medium die Zellen noch beeinflussen kann, wurde der Einfluss von Thrombin auf die Zellen im Basalmedium wie auch auf die Zellen im Vollmedium mittels BrdU-Einbau beobachtet.

3.2.1 Ergebnisse nach 24h Einwirkung von Thrombin auf MC3T3-E1-Präosteoblasten in Basalmedium

Abb. 13 zeigt, dass in Basalmedium niedrige Thrombinkonzentrationen zwischen 0,5U/ml und 18U/ml die Zellproliferation gegenüber der Kontrolle bis auf maximal 140% (bei 4,5U/ml Thrombin) erhöhen. Thrombinkonzentrationen im Bereich 20U/ml und 36U/ml haben keinen Einfluss auf die Zellen und ab 40U/ml bis 91U/ml Thrombin wird die Proliferation gehemmt.

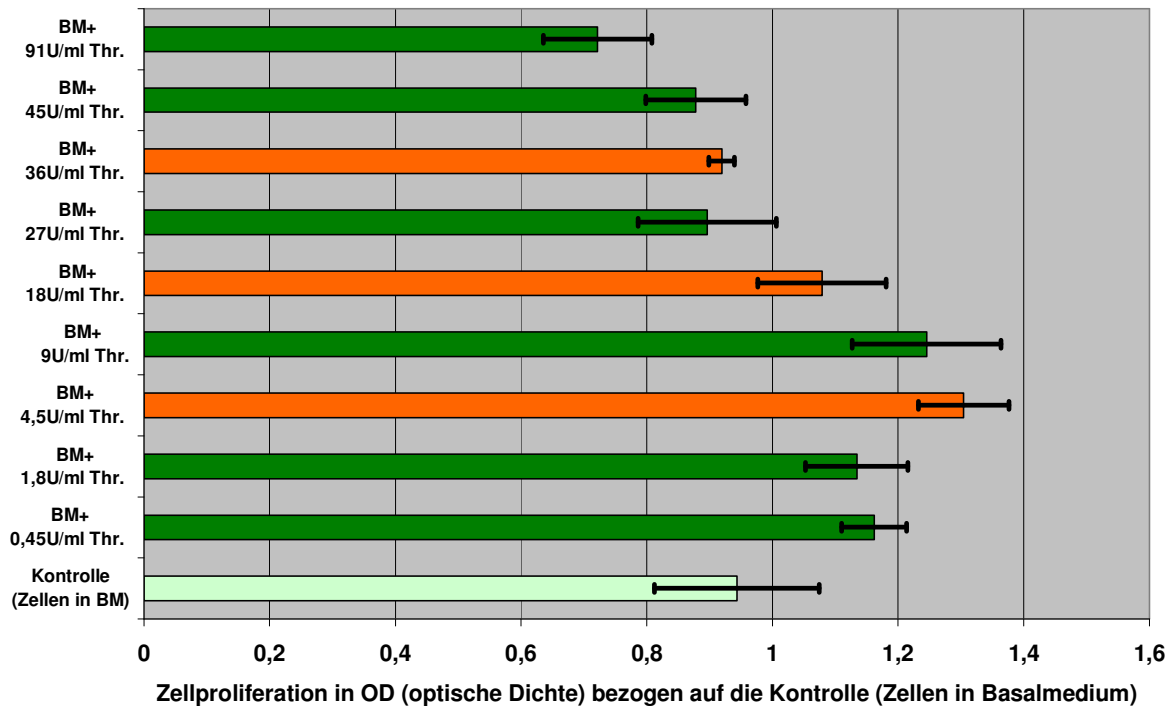


Abb. 13. Einfluss von verschiedenen Thrombinkonzentrationen auf MC3T3-Präosteoblasten im Vergleich zur Kontrolle (Zellen in Basalmedium) (BrdU-Einbau). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Versuch mit vier Parallelproben. Die orangemerkten Balken zeigen die Thrombinkonzentrationen wie sie in den Versuchen mit PRP-Überstand eintreten (bei einer Zugabe von 5% PRP entsteht eine Thrombinkonzentration von 4,5U/ml, bei 20% PRP-18U/ml Thrombin und bei 40% PRP-36U/ml Thrombin).

3.2.2 Ergebnisse nach 24h Einwirkung von Thrombin auf MC3T3-E1-Präosteoblasten in Vollmedium

In diesem Fall hatte die im Versuch eingesetzte Thrombin-Verdünnungsreihe in der Regel nur einen minimalen ($\pm 5\%$) Einfluss auf die Zellen, verglichen mit der Kontrolle (Zellen in Vollmedium). Eine Ausnahme machte die 45 U/ml Thrombinlösung, bei welcher eine stärkere Hemmung gegenüber der Kontrolle

eingetreten ist. Die 36U/ml und 91U/ml Thrombinlösungen verursachten dagegen nur eine leichte Hemmung der Proliferation der MC3T3-Präosteoblasten (Abb. 14).

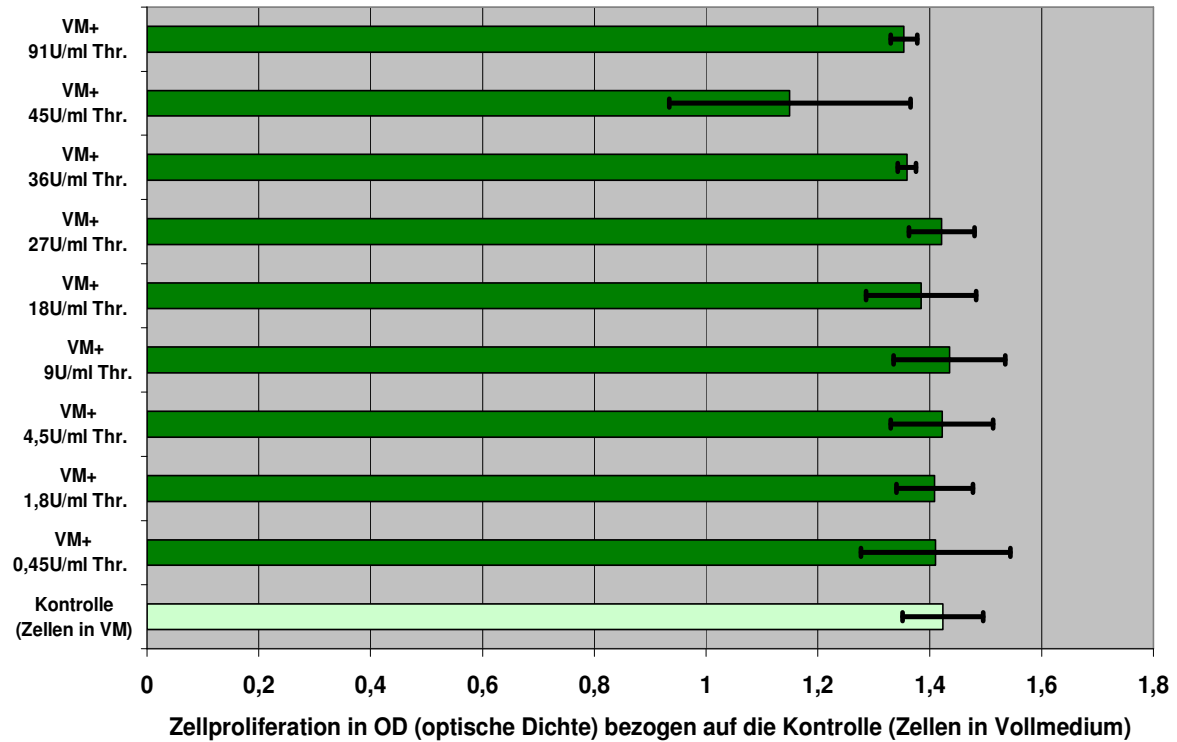


Abb. 14. Einfluss von verschiedenen Thrombinkonzentrationen auf MC3T3-Präosteoblasten im Vergleich zur Kontrolle (Zellen in Vollmedium) (BrdU-Einbau). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Versuch mit vier Parallelproben.

3.3 Ergebnisse der Versuche mit angereicherten Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand)

In diesem Versuchssystem wurde durch die im Kapitel 2.3.4 beschriebene Methode untersucht, welchen Einfluss die aus PRP freigesetzten Wachstumsfaktoren auf die MC3T3-Präosteoblasten haben.

Dazu wurde ein aus PRP jeweils frisch gewonnener Wachstumsfaktorextrakt (Zentrifugationsüberstand) eingesetzt.

Für diese Versuche wurden verschiedene Konzentrationen von Wachstumsfaktorextrakt eingesetzt (5%, 20%, 40%-Endkonzentrationen in der Zellkultur). Um spezifische, durch die Wachstumsfaktoren hervorgerufene Effekte von unspezifischen, durch die normalen Komponenten des Blutplasmas hervorgerufenen Wirkungen zu unterscheiden, wurden als Kontrolle PPP (Platelet Rich Plasma), Thrombin allein und PPP nur mittels Calcium aktiviert eingesetzt.

3.3.1 Einfluss von 40% PRP-Überstand auf die Zellproliferation

Der Einfluss von PRP-Überstand auf die Zellproliferation wurde mittels BrdU-Einbau getestet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen wurde mittels t-Test innerhalb des Excel-Programms durchgeführt. Die Angaben zur statistischen Signifikanz beziehen sich auf das 5%-Niveau.

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, bewirkte eine Zugabe von 40% PRP-Überstand eine signifikante Steigerung ($p=0,002$) der Zellproliferation um 59% im Vergleich zur Kontrolle (Zellen in Basalmedium).

Bei der Zugabe von PPP wurde ein vergleichbares Ergebnis erzielt, die Steigerung betrug etwa 58 %. Die Steigerung der Proliferation war auch in dem Fall signifikant ($p=0,001$).

Unter den gleichen Bedingungen verursachte die Zugabe von Thrombin allein eine signifikante Steigerung ($p=0,004$) der Proliferation von 45% gegenüber der Kontrolle (Zellen in Basalmedium).

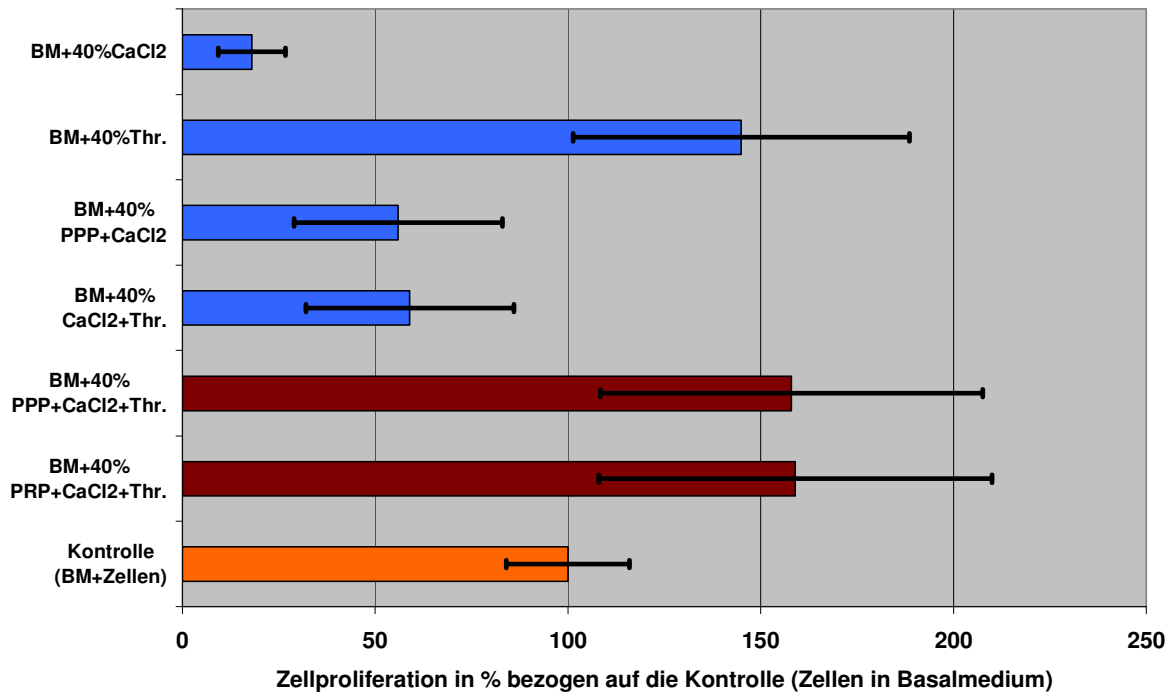


Abb. 15. Einfluss von 40% PRP-Überstand auf die MC3T3-E1-Präosteoblasten bezogen auf die Kontrolle (Zellen in Basalmedium) (BrdU-Einbau). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Konfidenzintervalle von drei zusammengefassten Versuchen mit je vier Parallelproben.

3.3.2 Einfluss von 20% PRP-Überstand auf die Zellproliferation

Bei der Zugabe von 20% PRP-Überstand wurde eine signifikante Steigerung ($p=0,002$) der Proliferation um 159% nachgewiesen. PPP-Überstand allein verursachte eine Steigerung ($p=0,001$) der Proliferation um 148% verglichen mit der Kontrolle.

Thrombin allein bewirkte eine signifikante ($p=0,002$) Steigerung von 95% in Vergleich mit der Kontrolle (Zellen im Basalmedium) (Abb. 16). Die Steigerung der Zellproliferation durch Zugabe von Thrombin war statistisch, auf dem 5%-Niveau, nicht signifikant ($p=0,15$ bzw. $p=0,18$) niedriger als durch die durch PRP bzw. PPP erzielte Steigerung.

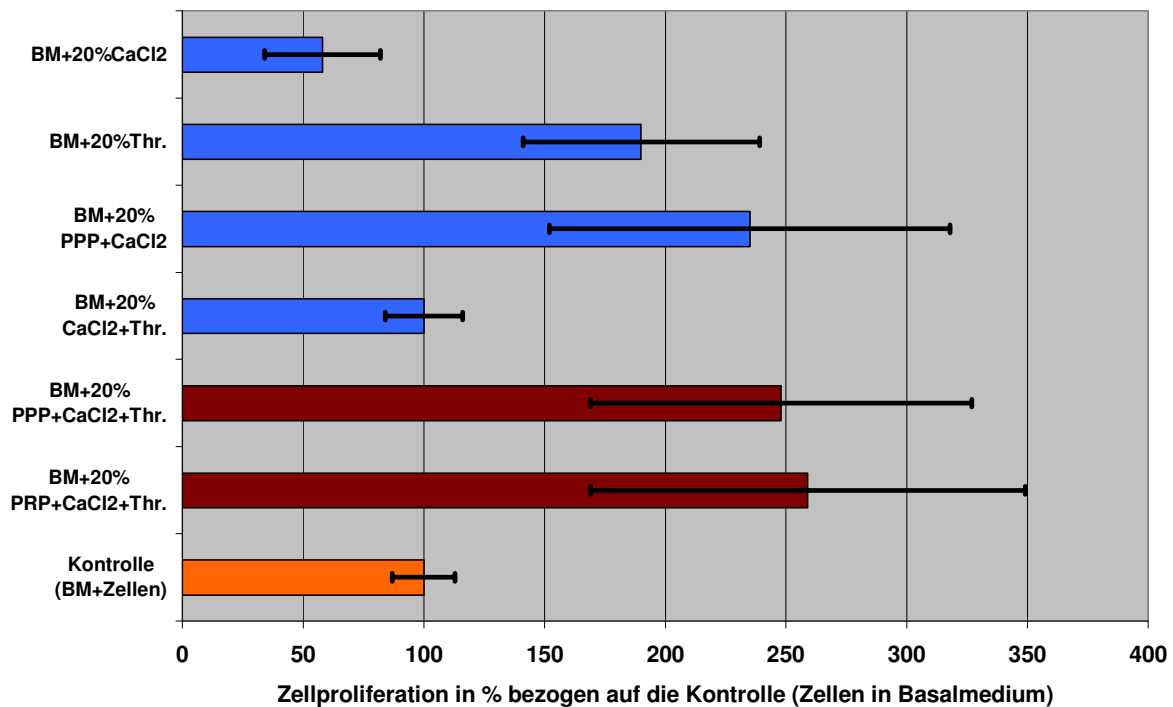


Abb. 16. Einfluss von 20% PRP-Überstand auf die MC3T3-E1-Präosteoblasten bezogen auf die Kontrolle (Zellen in Basalmedium) (BrdU-Einbau). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Konfidenzintervalle von drei zusammengefassten Versuchen mit je vier Parallelproben.

3.3.3 Einfluss von 5% PRP-Überstand auf die Zellproliferation

Bei der Zugabe des 5%igen PRP-Überstands betrug die Steigerung der Proliferation 150% gegenüber der Kontrolle ($p=0,007$). PPP-Überstand hatte ebenfalls einen signifikant ($p=0,008$) stimulierenden Effekt auf die Proliferation der Zellen von 106%. Thrombin allein verursachte eine signifikante ($p=0,00001$) Steigerung der Zellproliferation von 155 % (Abb. 17). Die Unterschiede zwischen der Förderung der Zellproliferation durch Zugabe von Thrombin und der Steigerung der Proliferation durch Zugabe von PRP bzw. PPP waren, bezogen auf das 5%-Niveau, nicht signifikant ($p=0,56$ bzw. $p=0,65$).

In diesem Versuch war die Steigerung der Proliferation der MC3T3-Präosteoblasten nur unbedeutend niedriger als bei Zugabe von 20 % PRP Überstand.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Alle beobachteten fördernden Effekte werden durch die Plasmakomponenten und/oder Thrombin, nicht durch Wachstumsfaktoren herforgerufen.
- Die Konzentration der zugefügten Komponenten ist entscheidend. Eine höhere Förderung wird eher bei niedriger Konzentration (5% bzw. 20%) hervorgerufen, als bei Zugabe von 40%. Dies ist unabhängig davon, ob PRP, PPP oder Thrombin zugesetzt wird.

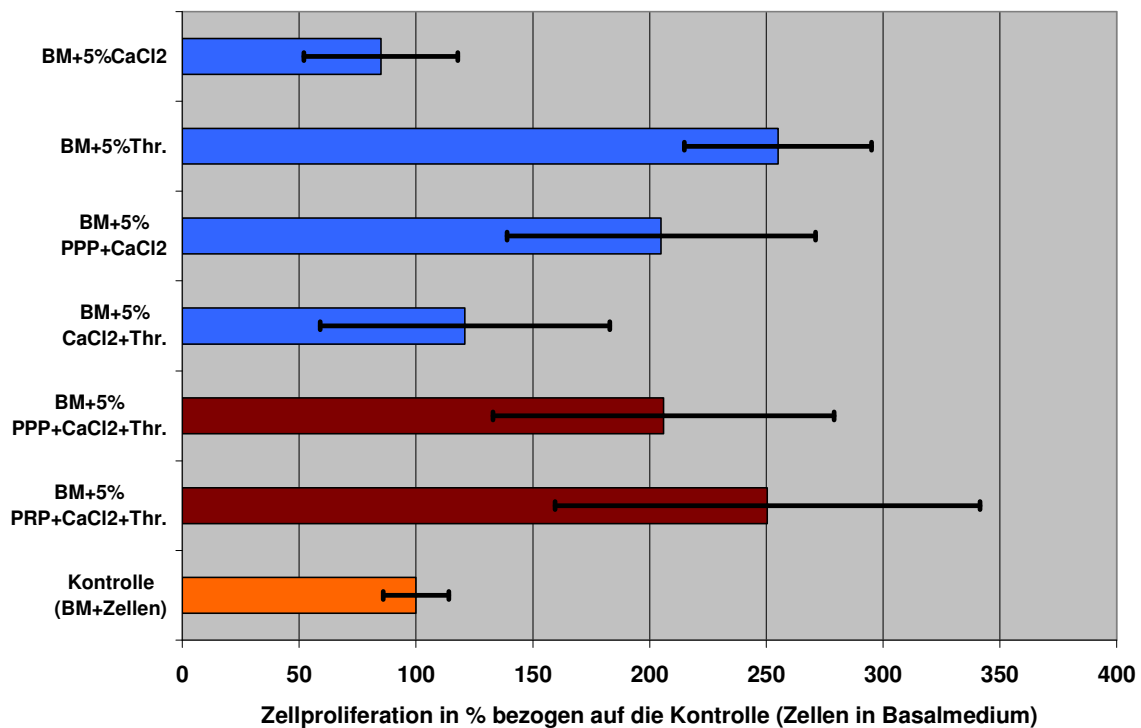


Abb. 17. Einfluss von 5% PRP-Überstand auf die MC3T3-E1-Präosteoblasten bezogen auf die Kontrolle (Zellen in Basalmedium) (BrdU-Einbau). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Konfidenzintervalle von drei zusammengefassten Versuchen mit je vier Parallelproben.

3.4 Ergebnisse der Versuche mit vollständiger PRP-Präparation in Membraneinsätzen

Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Zellen den aus PRP freiwerdenden Wachstumsfaktoren möglichst unmittelbar, ohne zeitlichen Verzug, auszusetzen (siehe Kap. 2.3.5).

Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen in Vollmedium, aber ohne Zusatz von PRP, eingesetzt. Diese Kontrolle sollte Aufschluss darüber geben, ob durch Einfluss von

PRP eine Wachstumsrate erzielt werden kann, die über die Wachstumsrate unter optimierten Zellkulturbedingungen hinausgeht.

Es wurden insgesamt drei Versuche durchgeführt. Die Beeinflussung der Wachstumsrate durch PRP, PPP und Thrombin wurde jeweils gegenüber der Kontrolle (Zellen in Basalmedium ohne alle Zusätze) bewertet.

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen wurde mittels t-Test bewertet.

Abb. 18 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse aller drei Versuche. Unter dem Einfluss von PRP wurde eine nicht signifikante ($p=0,09$) Steigerung der Zellproliferation von 94% gegenüber der Kontrolle (Zellen in Basalmedium) gemessen. In der mit PPP behandelten Zellkultur war die Proliferation ebenfalls nicht signifikant ($p=0,07$) um 92% gestiegen. Das Thrombin allein bewirkte in diesem Versuchssystem eine nicht signifikante Erhöhung der Proliferation von 16% ($p=0,29$). Die Förderung der Zellproliferation durch Zugabe von PRP, PPP bzw. Thrombin in das Zellkulturmedium (Basalmedium) war jedoch geringer als die Zellproliferation in Vollmedium mit normalem Serumzusatz (Abb. 18).

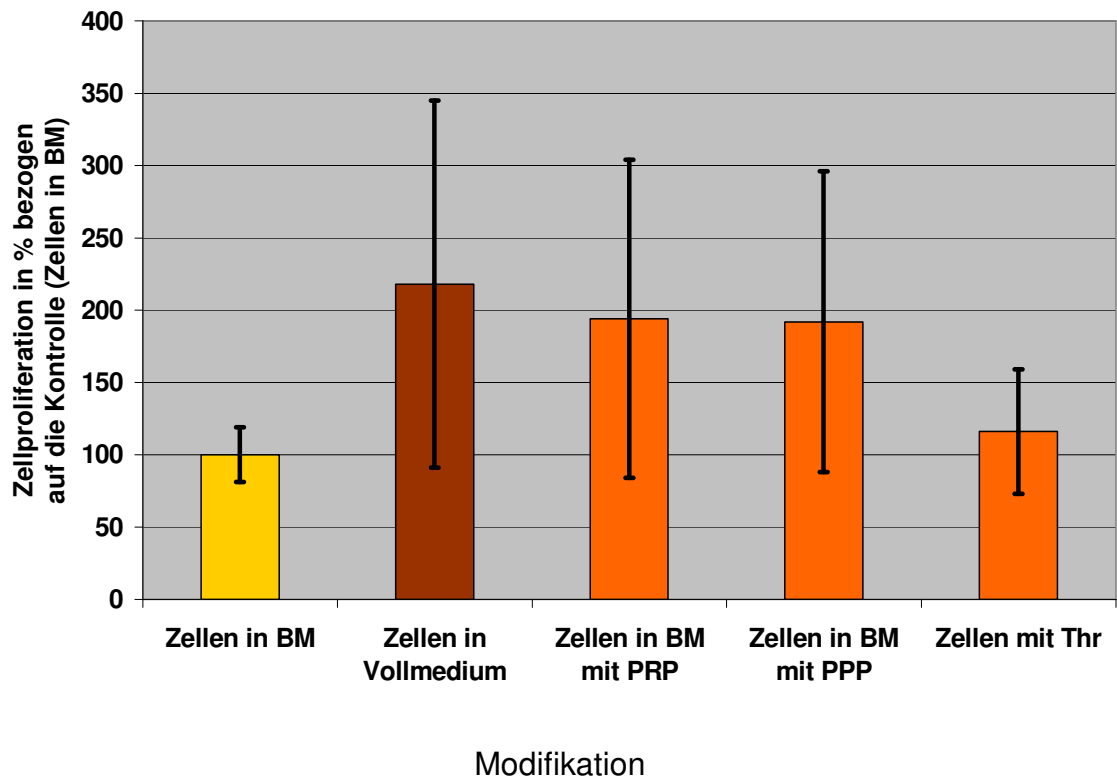


Abb. 18. MC3T3-Präosteoblasten Proliferation nach 24h Einfluss von PRP, PPP und Thrombin, bezogen auf die Kontrolle (Zellen in Basalmedium) (Vital-Färbung). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei zusammengefassten Versuchen.

3.5 Ergebnisse der Versuche mit MC3T3-E1-Präosteoblasten, die in PRP als Matrix eingebettet sind

Bei Augmentationen werden autologe „bone chips“ mit PRP gemischt, wodurch die Zielzellen den freigesetzten Wachstumsfaktoren unmittelbar ausgesetzt sind.

Mit diesen Versuchen sollten die Bedingungen beim klinischen Einsatz von PRP möglichst weitgehend simuliert werden. Es wurden drei Konzentrationen von Zellen (5000, 15000 bzw. 25000 Zellen/Well) eingesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die in PPP eingebettet wurden (Details s. Kap. 2.3.6.).

Wie in der Abbildung 19 dargestellt ist, konnte man nach 48h Wachstum bei einer Zelldichte von 5000 Zellen/Well keinen signifikanten Unterschied ($p=0,37$) zwischen den in PRP oder PPP kultivierten Zellkulturen beobachten. Die DNA-Werte lagen in beiden Fällen in Mittel bei $5\mu\text{g/ml}$.

Bei einer Ausgangszellzahl von 15000 Zellen/Well war nach 48h eine leicht erhöhte Menge von Gesamtzell-DNA in PRP-Kulturen gegenüber PPP-Kulturen ($10\mu\text{g/ml}$ bzw. $9\mu\text{g/ml}$) feststellbar, allerdings war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,88$).

Im Gegensatz dazu bewirkte PPP bei einer Konzentration von 25000 Zellen/Well eine Erhöhung der Menge von Gesamtzell-DNA, verglichen mit den in PRP kultivierten Zellen ($7\mu\text{g/ml}$ bzw. $4\mu\text{g/ml}$). Diese Erhöhung war allerdings auch in dem Fall nicht signifikant ($p=0,07$).

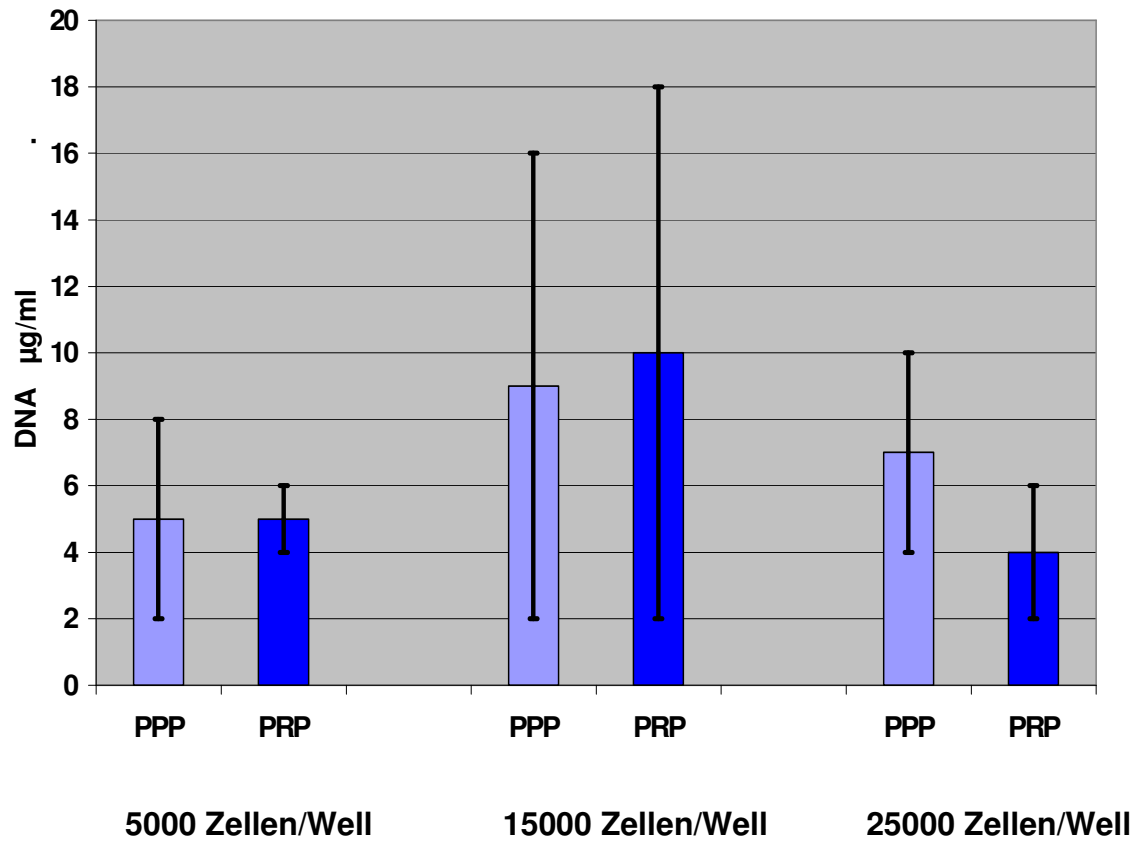


Abb. 19. Gesamtzell-DNA in PRP-Kulturen verglichen mit der Gesamtzell-DNA in PPP-Kulturen (DNA-Isolierung). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei zusammengefassten Versuchen.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei den Versuchen zum Ca-Einfluss zeigten sich bei den Kurzzeitversuchen (3h Einwirkungszeit von Ca^{++}) erst bei hohen Konzentrationen (ab 100mM) deutliche Effekte.

Stoffwechselaktivität und Proliferation wurden bei beiden eingesetzten Zelltypen gehemmt. Nicht ohne weiteres erklärt werden können die im Kurzzeittest auf Stoffwechselaktivität bei SAOS-Osteoblasten bereits bei Konzentrationen zwischen 1mM und 40mM, aufgetretenen konstanten Hemmefekte (Abb. 9). Es ist möglich, dass es sich dabei eher um einen methodischen Einfluss als einen Ca-Effekt handelt.

Bei den Versuchen mit längerer Einwirkungsdauer von Ca (24-48h) traten deutliche Effekte bereits bei Konzentrationen von 1-10mM Ca auf. Die SAOS-Osteoblasten zeigten hier ein völlig anderes Verhalten als die MC3T3-Präosteoblasten. Während die SAOS-Zellen bei Konzentrationen von 10mM bezüglich der Stoffwechselaktivität und Proliferation auf unter 20% bzw. 10% der Ausgangsaktivität abfielen, zeigten die MC3T3-Zellen bezüglich der Proliferation hier eine Förderung.

Bei mittleren Konzentrationen von 40-60mM dagegen waren die MC3T3-Zellen schon deutlich gehemmt (Abb. 7,8), während die SAOS-Zellen hier ein relatives Maximum zeigten (Abb. 11,12), das jedoch nicht die Ausgangswerte der Kontrolle erreichte.

Generell wurden die Zellen durch die erhöhte Ca-Konzentrationen eher gehemmt als gefördert. Die Ergebnisse aller Ca-Versuche sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Ca ²⁺ - Konzentration	Zellen- Typ	Kurzzeit (3h)		Langzeit (24-48h)	
		Stoffwechsel- aktivität XTT-Test	Proliferation BrdU-Test	Stoffwechsel- aktivität XTT-Test	Proliferation BrdU-Test
niedrige Konz. 5 mM	OB	↓ ↓ ↓	↑	↓ ↓ ↓	↓ ↓
	Prä-OB	↓	→	↓	↓ ↑
mittlere Konz. 40 mM	OB	↓ ↓ ↓	↑	↓ ↓	↓ ↓
	Prä-OB	↓	→	↓ ↓	↓ ↓ ↓
Hohe Konz. 100-140 mM	OB	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓
	Prä-OB	↓ ↓ ↓	→	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓

Tab.1. Zusammenfassung der Versuche zum Einfluss von Ca auf SAOS- und MC3T3-Zellen. Legende:

↓ =Verringerung der entsprechenden Aktivität um bis zu 25% (75%-100% des Kontrollwerts),

→ =Kein Einfluss auf die entsprechenden Aktivität der Zellen,

↑ =Steigerung der entsprechenden Aktivität um bis zu 25% (75%-100% des Kontrollwerts).

Die in drei verschiedenen Versuchssystemen mit PRP erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die erzielte Förderung der Zellproliferation nicht von den Wachstumsfaktoren hervorgerufen wird, sondern von den Serumkomponenten. Dafür sprechen die vergleichbaren Werte der PRP- und PPP-Wirkung auf die Zellkulturen.

Gleichzeitig scheint die eingesetzte Konzentration von PRP eine sehr wichtige Rolle in der Stimulierung der Zellproliferation in Zellkulturen zu spielen.

Ein 5%iger oder 20%iger PRP Überstand bewirkte eine Steigerung der Zellproliferation von im Mittel 160%, d. h. auf 260% des Ausgangswertes. Ein 40%iger PRP-Überstand verursachte dagegen lediglich eine Stimulation der Zellproliferation von im Mittel 60% gegenüber den im Basalmedium kultivierten Zellen.

Bei Zellen, die direkt in PRP bzw. PPP kultiviert wurden, scheinen PRP und PPP, unter unseren Versuchsbedingungen, ebenfalls die gleiche Wirkung auf Zellen zu haben.

Ausserdem ließ sich feststellen, dass die Zellkulturen durch Zugabe von PRP oder PPP keine höhere Proliferation als die der Kontrolle, bestehend aus Zellen in Vollmedium, erreicht haben.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Versuche

Das Ziel dieser Arbeit war, die für die Anwendung von PRP postulierte Beschleunigung der Heilvorgänge in Knochengewebe durch *in vitro* Untersuchungen zu verifizieren und eventuell eine Optimierung der PRP-Herstellungsverfahren und deren Einsatz zu erreichen.

Ein zentraler Prozess der Wundheilung ist die Zellproliferation. Durch die Zellproliferation wird das neue Gewebe aufgebaut, und so die Wunde verschlossen. Nach Tatsuyama erreicht die Proliferation der mesenchymalen Zellen in der Wunde ihr höchstes Niveau am zweiten Tag nach der Fraktur [98]. Es wurde daher eine Reihe von Versuchssystemen aufgebaut, durch welche untersucht wurde, ob PRP die Proliferation der Osteoblasten bzw. Präosteoblasten über einen Zeitraum von bis zu zwei Tagen stimuliert. Die Versuche wurden mit diesen Zelltypen durchgeführt, weil eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie die Zielzellen von PRP *in vivo* sein können.

In den verschiedenen Versuchssystemen wurde der Einfluss einzelner Komponenten von PRP untersucht. Im klinischen Einsatz wird PRP durch Zugabe von Calcium oder Calcium/Thrombin „aktiviert“, das bedeutet die Gerinnung wird durch diese Komponenten ausgelöst. Es wurde daher zunächst der Effekt von Calcium auf SAOS-2-Osteoblasten und MC3T3-E1-Präosteoblasten und der Effekt von Thrombin auf MC3T3-E1-Präosteoblasten untersucht.

In Anschluss daran wurde der Einfluss der aus verschiedenen PRP-Präparationen freigesetzten Wachstumsfaktoren auf MC3T3-E1-Präosteoblasten untersucht.

Um eine spezifische Stimulation durch die aus den PRP-Präparationen freigesetzten Wachstumsfaktoren nachzuweisen, wurden in diesen Versuchen die

Gerinnungsaktivatoren sowie die Plasmabestandteile der Thrombozytenkonzentrate (PPP) als Kontrollen eingesetzt.

4.1.1 *Einfluss von Calcium auf MC3T3-E1-Präosteoblasten und SAOS-2-Osteoblasten*

Unter normalen in vivo Bedingungen ist die Calciumkonzentration bei 2,5mM konstant. Während der osteoklastischen Resorption kann die Calciumkonzentration Werte von 40-50mMol/l erreichen [33]. In den PRP-Präparationen kann die Calciumkonzentration lokal auf bis zu 130mM gesteigert werden [4,64,109]. Im Normalfall liegt die Calciumkonzentration in den meisten PRP-Präparationen nicht unter 100mM.

Daher wurden für die Versuche zur Untersuchung des Calcium-Einflusses auf MC3T3-E1-Präosteoblasten wurde eine Konzentrationsreihe von 1 bis 100mM Ca^{2+} benutzt. Diese Konzentrationen schlossen die maximale Ca-Konzentration ein (etwa 90mM), die in den PRP-Präparationen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, auftreten. Für die Versuche zur Untersuchung des Calcium-Einflusses auf SAOS-2-Osteoblasten wurden die Calciumkonzentrationsreihen im Zellkulturmedium auf bis zu 1 und 140mM erweitert. Um die Verdünnung von Calcium im Körper zu simulieren, wurden drei verschiedene Zeiträume ausgewählt, in denen Calcium auf die Zellen wirken konnte: 3-, 24- und 48h.

Die Effekte von Calcium auf die Zellen wurden in Bezug auf zwei verschiedene Mechanismen untersucht:

- Einfluss auf die mitochondriale Stoffwechselaktivität (XTT-Test) für die 3- und 24h Zeiträume
- Einfluss auf die Proliferation (DNA-Synthese gemessen über BrdU-Einbau) für die 3- und 48h Zeiträume

Es zeigte sich, dass bei SAOS-2-Osteoblasten eine Ca-Konzentration über 100mM bei allen getesteten Zeiträumen (3, 24 oder 48h) einen hemmenden Effekt bezüglich Stoffwechselaktivität und Proliferation der Zellen hat.

Im Gegensatz dazu war der Effekt verschiedener Ca-Konzentrationen auf MC3T3-E1-Präosteoblasten viel stärker vom Zeitraum der Einwirkung abhängig.

Nach 3h hatten die Ca-Konzentrationen unter 100mM keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellproliferation. Nach 48h wurde bei einer 5mM Ca-Konzentration eine Steigerung der Proliferation der Präosteoblasten um 30% erreicht. Aus der Literatur sind für diese niedrigeren Ca-Konzentrationen verschiedene Auswirkungen auf die Zellen bekannt, die zum Teil die hier erhaltenen Ergebnisse unterstützen und einen positiven Effekt auf die Wundheilung *in vivo* ausüben könnten.

Kanatani et al. 1991 und Sugimoto et al. 1994 berichten auch über eine Stimulation der Zellproliferation bei 5mM Ca-Konzentration [45,92]. Eklou-Kalonji et al. 1997 finden dagegen eine Hemmung der ALP-Aktivität schon bei 5mM Ca²⁺ [22].

Bei höheren Ca-Konzentrationen wurde dagegen in unseren Versuchen nach 24- und 48h eine starke Hemmung der Zellproliferation (in Mittel um 80%) nachgewiesen.

Insgesamt zeigte sich bei allen Versuchen eher eine Hemmung als eine Förderung der Zellproliferation durch das bei der PRP-Herstellung eingesetzte Calcium. Dies gilt insbesondere bei hohen Konzentrationen und längeren Einwirkungszeiten. Inwieweit diese Effekte *in vivo* durch Verdünnungsvorgänge über Diffusion des Calcium aus dem PRP-Clot in das umliegende Gewebe kompensiert werden, kann nur vermutet werden.

4.1.2 *Einfluss von Thrombin auf MC3T3-E1-Präosteoblasten*

Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellen, darunter auch MC3T3-E1-Präosteoblasten, Rezeptoren für Thrombin besitzen. Es ist auch bekannt, dass diese Rezeptoren für verschiedene Effekte von Thrombin auf Zellen verantwortlich sind [1,42]. Unter diesen Voraussetzungen wurde in dieser Arbeit der Effekt von Thrombin allein (ohne PRP) auf MC3T3-E1-Präosteoblasten untersucht. Bei der Herstellung von PRP kann die Thrombin-Konzentration, je nach Methode, bis auf 143U/ml steigen [63,109]. In dieser Arbeit wurden bei der Herstellung von PRP maximal 91U/ml Thrombin-Konzentration eingesetzt. Daher wurden Thrombinkonzentrationen zwischen 0,45 und 91U/ml getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass Thrombinkonzentrationen von 0,45 bis 18U/ml eine Steigerung der Zellproliferation auf bis zu 140% im Vergleich mit der Kontrolle (Zellen in Basalmedium) verursachen. Thrombinkonzentrationen über 18U/ml hemmten dagegen die Zellproliferation.

Tatakis et al. [94,95] fanden einen fördernden Effekt auf Osteoblasten bei 8U/ml Thrombin in einer Konzentrations-Reihe von 0-16U/ml. In Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Gandossi et al. eine maximale Zellproliferation bei 36U/ml Thrombin beobachten [23,27].

Die Versuche mit Thrombin zeigten, dass zumindest bei niedrigen Konzentrationen eine unspezifische Stimulation der Zellen allein durch Zusatz von Thrombin möglich ist. Es scheint daher möglich, dass auch beim Einsatz von PRP ein fördernder Effekt durch die Thrombin-Komponenten der PRP-Präparationen, ohne Beteiligung von Wachstumsfaktoren, erreicht wird.

In den weiteren Versuchen sollte daher versucht werden, zwischen unspezifischen Reaktionen, die durch Thrombin und andere Komponenten von PRP hervorgerufen werden, und Reaktionen, die durch PRP-Wachstumsfaktoren verursacht werden, zu unterscheiden.

4.1.3 Einfluss von angereicherten Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand) auf MC3T3-E1-Präosteoblasten

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von PRP auf die Zellen unter Bedingungen, die möglichst nah an den von Marx in seiner grundlegenden Arbeit [63] beschriebenen *in vivo* Bedingungen sind, zu beobachten.

Die direkte Simulation der Marx'schen Versuchsbedingungen (Zielzellen in der Knochenhaut von autologen Knochentransplantaten werden mit PRP vermischt und sind so den freiwerdenden Faktoren unmittelbar ausgesetzt) stösst dabei auf grundlegende methodische Schwierigkeiten.

Bei der Zugabe von PRP direkt in die Zellkultur entsteht nach der Aktivierung des PRP durch Zusatz von Calcium und Thrombin ein Clot, das es schwierig macht, am Ende des Versuches die Zellen mit den üblichen Zellkulturtests zu bewerten.

Um die Wachstumsfaktoren ohne Bildung eines Clots in die Zellkultur zu bringen, wurde daher PRP nach der Aktivierung noch einmal zentrifugiert. Dadurch wurde ein PRP-Überstand erzielt, der reich in Wachstumsfaktoren ist. Der PRP-Überstand wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (5%, 20% und 40%) der Zellkultur zugegeben.

Der Wachstumsfaktor-Extrakt (PRP-Überstand) erhöhte die Zellproliferation bei allen getesteten Konzentrationen (5, 20, 40%PRP-Überstand). Die Stimulation der Zellproliferation war jedoch stark von der Endkonzentration des PRP-Überstandes in der Zellkultur abhängig. Überraschenderweise wurde die höchste Stimulation, etwa 2,5fach verglichen mit der Kontrolle-(Zellen in Basalmedium), bei geringeren (5% bzw. 20%) Konzentrationen an PRP-Überstand gemessen. Bei höheren Konzentrationen (40%) wurde demgegenüber eine geringere Steigerung (nur etwa 1,5fach) der Zellproliferation erreicht.

Auf Grund der Ergebnisse der mitgeführten Kontrollen scheint es wahrscheinlich, dass dieser Effekt auf eine Hemmung durch die bei Zugabe von 40% PRP zum Zellkulturmedium ebenfalls erhöhte Ca-Konzentration zurückzuführen ist. Die Zugabe von Ca^{++} allein bewirkte in diesen Experimenten eine starke Hemmung der Proliferation auf 18% des Ausgangswertes (oberster Balken in Abb. 15). Hier wird also wahrscheinlich der primär fördernde Effekt von PRP, PPP bzw. Thrombin durch die erhöhte Ca-Konzentration verringert.

In allen Versuchsgruppen (5, 20, 40%) wurde jedoch eine praktisch identische Stimulation auch durch Zugabe von Platelet Poor Plasma (PPP) erzielt (2,5fach bei 5% PPP-Überstand Zugabe, 2,5fach bei 20%, 1,5fach bei 40%).

Bei Zugabe von Thrombin konnte ebenfalls eine eindeutige Förderung der Zellproliferation (2,5fach bei 5% Thrombin-Zugabe, 2fach bei 20%, 2,5fach bei 40%) erreicht werden.

Auf Grund der Ergebnisse der mitgeführten Kontrollen scheint es wahrscheinlich, dass dieser Effekt auf die Hemmung durch die bei Zugabe von 40% PRP zum Zellkulturmedium ebenfalls erhöhte Ca-Konzentration zurückzuführen ist. Die Zugabe von Ca^{++} allein bewirkte in diesen Experimenten eine starke Hemmung der Proliferation auf 20%.

PPP bildet die wichtigste Kontrolle für die Untersuchung der Wirksamkeit von PRP bzw. der aus den PRP-Präparationen gewonnenen Wachstumsfaktor-Konzentrate. Die PPP-Kontrollen enthalten mit den Plasma-Komponenten des Bluts und den Gerinnungsaktivatoren praktisch alle Bestandteile der PRP-Präparationen bis auf die angereicherten Thrombozyten mit den aus den α -Granula freigesetzten Wachstumsfaktoren.

Die vergleichbare Steigerung der Zellproliferation durch Zugabe von PRP, PPP bzw. Thrombin zeigt, dass eine unspezifische Stimulation durch Plasma-Komponenten und/oder eine Thrombin-Wirkung vorliegt. Eine spezifische

Steigerung durch Wachstumsfaktoren, wie von PRP-Befürwortern propagiert, ist nicht nachweisbar.

Um zu klären, ob die unspezifische Stimulation durch PPP auf Plasma-Komponenten oder durch das in PPP-Präparationen enthaltene Thrombin zurückzuführen ist, wurde als zusätzliche Kontrolle PPP, das nur mit Calcium aktiviert wurde, getestet. Die Zellproliferation war insignifikant niedriger als bei der Aktivierung von PPP mit Calcium und Thrombin, was darauf hinweist, dass Thrombin nur eine kleine zusätzliche Steigerung der Zellproliferation verursacht.

In der Literatur werden bis jetzt nur wenige *in vitro* Versuche beschrieben, welche den Effekt von PRP auf Knochenzellen untersuchen. Weibrich et al. untersuchten 2002 den Effekt von reinen, gewaschenen Thrombozyten (ohne Plasma-Komponenten) auf Osteoblasten und postulierten: „Die Steigerung der Proliferationsrate von humanen Zellen ossärer Herkunft scheint *in vitro* durch die Zugabe von Thrombozyten konzentrationsabhängig bis zu einem Plateau realisierbar. Eine Übertragung der hier *in vitro* verwendeten Thrombozytenkonzentrationen auf die *in vivo* Situation ist nur begrenzt möglich“ [103].

Aus den Ergebnissen unserer Versuche wurde geschlossen, dass alle positiven Effekte durch normales Blut bzw. Plasma erzielt werden. Daher ist der zusätzliche Einsatz von angereicherten Thrombozyten nicht erforderlich, da keine zusätzlichen positiven Effekte zu beobachten sind.

4.1.4 Untersuchungen mit vollständiger PRP-Präparation in Membraneinsätzen

Ein möglicher Kritikpunkt der Versuche mit PRP-Überstand ist, dass die Zellen nicht unmittelbar nach der Aktivierung von PRP in Kontakt mit den aus den Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren kommen. Nach Aktivierung der Thrombozyten können durch die einstündige Inkubation und nach folgende 15-

minütige Zentrifugation zur Herstellung des PRP-Überstandes bis zu maximal 1,5h vergehen, bevor die Wachstumsfaktoren in die Zellkultur gebracht werden.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Halbwertszeiten einzelner Wachstumsfaktoren zwischen 2 und 3 Minuten liegen können [9,30]. Daher wurde versucht, ein Versuchssystem aufzubauen, dass eine zeitgleiche Einwirkung der Wachstumsfaktoren auf die Zellen unmittelbar nach der Freisetzung ermöglicht.

Um die oben bereits beschriebenen Probleme mit der Gerinnung von PRP in den Wells zu vermeiden, wurden für dieses Versuchssystem Membraneinsätze benutzt. Diese Ergebnisse wurden zuerst in die Zellkulturplatte eingesetzt. Danach wurde das PRP in die Membraneinsätze gebracht und dort aktiviert.

Zur Etablierung dieses Versuchsystems mussten einige Schwierigkeiten überwunden werden, da stets auch ein Teil des Fibrins durch die Membran in die Wells übertrat und dort gerann. Deswegen war die Anwendung von bisher eingesetzten Tests (XTT-, BrdU-Test) nicht mehr möglich. Auf diesem Grund wurde als Auswertungs-Methode die Vitalfluoreszenzfärbung ausgewählt.

Unter dem Einfluss von PRP wurde in diesem Versuchssystem im Mittel eine Steigerung der Zellproliferation von 94% gegenüber der Kontrolle (Zellen in Basalmedium) erreicht. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte jedoch auch PPP, welches eine Steigerung der Zellproliferation von 92% verursachte. Thrombin allein bewirkte eine Erhöhung der Zellproliferation von nur 16%. Dies ist eine deutlich geringere Stimulation als in der bisher eingesetzten Versuchssystemen. Die Gründe für die geringere Stimulation sind nicht erkannt. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Wachstumsrate von Zellen in voll supplementierten Kulturen, die als zusätzliche Kontrolle mitgeführt wurden, weder durch Zusatz von PRP, noch von PPP oder Thrombin übertroffen wurde.

Die Versuche mit aktivierten PRP-Präparationen in den Membraneinsätzen brachten ähnliche Ergebnisse wie die Versuche mit angereicherten

Wachstumsfaktoren (PRP-Überstand). Gruber et al. 2002 kamen bei zwei vergleichbaren Versuchsansätzen (mit „PRS - Platelet Released Supernatant“ und mit Membraneinsätzen) zu ähnliche Schlussfolgerungen: „The proliferative response observed in the co-culture was not significantly different from experiments where platelets were separated by a membrane filter“ [32]. Sie stellten auch einen stimulierenden Effekt der Zellproliferation durch Zugabe von Trombozyten -direkt oder indirekt- in die Zellkultur fest.

Unsere Ergebnisse mit diesem Versuchssystem weisen ebenfalls darauf hin, dass die Steigerung der Zellproliferation nicht durch Wachstumsfaktoren erreicht wurde, sondern durch Serumkomponenten. Sie unterstützen damit die Ergebnisse der mit PRP-Überstand durchgeführten Versuche.

4.1.5 *Untersuchungen mit MC3T3-E1-Präosteoblasten, die in PRP als Matrix eingebettet sind*

Dieses Versuchssystem wurde entwickelt, um noch näher an die in vivo Situation zu kommen. Unmittelbar nach dem Einbringen des autologen Transplantats gemischt mit PRP in die Wunde befinden sich die Zellen in der PRP-Matrix und kommen in direkten Kontakt mit den Wachstumsfaktoren. Um diese Situation in vitro zu simulieren, wurden daher MC3T3-E1-Präosteoblasten in die PRP-Matrix eingebracht. Als Kontrolle wurden die Zellen in die PPP-Matrix eingebettet. Nach zwei Tagen wurde die Vermehrungsrate der Zellen bestimmt.

Für die Simulation der in vivo-Bedingungen ist dies ein elegantes Versuchssystem, in welchem jedoch die PRP-Matrix die quantitative Bestimmung der Zellproliferation erschwerte. Nach einer Reihe von Vorversuchen wurde letztlich für die Quantifizierung der Zellvermehrung eine Methode der DNA-Isolierung mit anschließender photometrischer Bestimmung der Gesamt-DNA-Menge ausgewählt.

Die Ergebnisse zeigten erneut lediglich einen minimalen Unterschied zwischen den Werten der Zellproliferation in PRP und PPP. Die Zellproliferation in den 3D-Gelkulturen war deutlich geringer als die Proliferation von Zellen im normalen Vollmedium auf den Wellboden, die als zusätzliche Kontrolle mitgeführt wurden. Die geringere Proliferation ist möglicherweise entweder auf eine schlechtere Versorgung oder auf die hohe Konzentrationen von Gerinnungsaktivatoren im Gel zurückzuführen. Dieses Versuchssystem sollte weiter entwickelt und für weitere Untersuchungen mit einem erweiterten Spektrum an Versuchsbedingungen (ähnlich den Versuchen mit PRP-Überstand) eingesetzt werden.

Bei allen getesteten Zellkonzentrationen zeigte die vergleichbare Zellproliferation, die durch PRP bzw. PPP erreicht wurde, dass die Wachstumsfaktoren keinen zusätzlichen Effekt bewirken. Diese Ergebnisse stützen damit tendenziell die Ergebnisse der anderen Versuchssysteme.

4.2 Schlussfolgerung

Die wichtigsten Erkenntnisse aus den durchgeführten Versuchen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Höhere Ca-Konzentrationen, wie sie bei der Aktivierung von PRP vorkommen, haben einen eher hemmenden Effekt auf die Zellproliferation, Thrombin kann dagegen, zumindest in geringen Konzentrationen, eine Erhöhung der Zellproliferation bewirken.
- PRP erhöht zwar unter allen hier eingesetzten Versuchsbedingungen, die Zellproliferation, ein gleicher oder vergleichbarer Effekt wurde jedoch auch in der Kontrollgruppe (PPP) und teilweise mit Thrombin erzielt.

- Die Förderung der Zellproliferation durch PRP, PPP oder Thrombin überschritt nie die unter optimalen Zellkulturbedingungen (Zellen in voll supplementiertem Medium) erzielten Wachstumsraten.
- Insgesamt wurden keine Belege für die von Marx und anderen [63-66] für PRP postulierten Wirkungsmechanismen (Stimulation von Zellen durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den α -Granula der Thrombozyten) gefunden.
- Da in PPP keine spezifische Anreicherung von Wachstumsfaktoren stattfindet, sind alle hier beobachteten wachstumsfördernden Effekte auf die normalen Plasmakomponenten zurückzuführen. Zusätzliche, über die Stimulation durch Plasmaproteine hinausgehende Effekte, sind weder durch Thrombin noch durch freigesetzte Wachstumsfaktoren nachweisbar.

Übertragen auf die *in vivo* Situation kann geschlossen werden, dass das ohnehin in der Wunde existierende Vollblut ausreichend für eine gute Heilung ist. Die Zugabe von PRP bringt keinen zusätzlichen Effekt. Aus dieser Sicht könnten die aufwändigen Verfahren für das Einbringen von PRP in die Wunde, sowie Zeit und Kosten der Patienten gespart werden.

Wie die meisten *in vitro* Versuche, haben auch die in dieser Arbeit dargestellten Versuchssysteme einige Einschränkungen:

- Zeitliche Verläufe der Konzentrationen der verschiedenen Effektoren von PRP (Ca^{2+} , Thrombin, verschiedene Wachstumsfaktoren), z.B. bedingt durch Verdünnungseffekte, die im Gewebe stattfinden, sind *in vitro* nicht reproduzierbar.
- Die räumlichen Konzentrationsgradienten in der Umgebung des Wundortes sind *in vitro* nicht simulierbar.

Unter Berücksichtigung der obengenannten Einschränkungen konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zur Zellproliferation die für die Anwendung von PRP *in vivo* propagierte Beschleunigung der Heilvorgänge in Knochengewebe nicht belegt werden.

Ein Überblick über die aktuelle Literatur zeigt, dass auch die klinische Wirksamkeit von PRP nach wie vor umstritten ist. Sanchez et al. 2003 fassen ihre umfangreiche Literaturrecherche bezüglich der klinischen Wirksamkeit von PRP (siehe Anhang) wie folgt zusammen: „This literature review demonstrates a lack of scientific evidence to support the current use of PRP in combination with bone grafts during augmentation procedures“ [81].

Vor diesem Hintergrund scheint es auch weiterhin sinnvoll, die zeit- und arbeitsintensiven klinischen Studien durch weitere *in vitro* Studien zur Wirksamkeit von PRP zu ergänzen. Die aus PRP freigesetzten Wachstumsfaktoren können neben der Proliferation potentiell auch andere Prozesse beeinflussen, wie Rekrutierung, Migration oder Neovaskularisation [72]. Um weitere Erkenntnisse über den Effekt von PRP in der Wundheilung zu sammeln, wäre es sinnvoll, weitere Untersuchungen zum Einfluss von PRP auf die Migration der Zellen und die Vaskularisation durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Die Wirkung von PRP bezüglich einer Stimulation der Zellproliferation wurde *in vitro* untersucht. Die Versuche wurden mit Osteoblasten und Präosteoblasten durchgeführt.

In verschiedenen Versuchssystemen wurden sowohl komplette PRP-Präparationen als auch einzelne Komponenten von PRP untersucht. Die Wirkung der aus PRP freigesetzten angereicherten Wachstumsfaktor-fraktion (PRP-Überstand) wurde mit der Wirkung der reinen Plasma-Komponenten (Platelet Poor Plasma) und den durch die Gerinnungs-aktivatoren Calcium und Thrombin hervorgerufenen Effekten verglichen.

Die wichtigsten Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Höhere Ca-Konzentrationen, wie sie bei der Aktivierung von PRP vorkommen, haben einen eher hemmenden Effekt auf die Zellproliferation, Thrombin kann dagegen, zumindest in geringen Konzentrationen, eine Erhöhung der Zellproliferation bewirken.
- PRP erhöht zwar, unter allen hier eingesetzten Versuchsbedingungen, die Zellproliferation, ein gleicher oder vergleichbarer Effekt wurde jedoch auch in der Kontrollgruppe (PPP) und teilweise mit Thrombin erzielt.
- Die Förderung der Zellproliferation durch PRP, PPP oder Thrombin überschritt nie die unter optimalen Zellkulturbedingungen (Zellen in voll supplementiertem Medium) erzielten Wachstumsraten.
- Insgesamt wurden keine Belege für die von Marx und anderen [63-66] für PRP postulierten Wirkungsmechanismen (Stimulation von Zellen durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus α -Granula der Thrombozyten) gefunden.

- Da in PPP keine spezifische Anreicherung von Wachstumsfaktoren stattfindet, sind alle hier beobachteten wachstumsfördernden Effekte auf die normalen Plasmakomponenten zurückzuführen. Zusätzliche, über die Stimulation durch Plasmaproteine hinausgehende Effekte, sind weder durch Thrombin noch durch freigesetzte Wachstumsfaktoren nachweisbar.

Übertragen auf die *in vivo* Situation kann geschlossen werden, dass das ohnehin in der Wunde existierende Vollblut ausreichend für eine gute Heilung ist. Die Zugabe von PRP bringt keinen zusätzlichen Effekt. Aus dieser Sicht könnten die aufwendigen Verfahren für das Einbringen von PRP in die Wunde, sowie Zeit und Kosten der Patienten gespart werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abraham LA, Jenkins LJ, Stone SR, Mackie EJ.
Expression of thrombin receptor in developing bone and associated tissues.
Journal of Bone and Mineral Research 1998; 13: 818-827.

- [2] Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG.
Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study.
J Oral Maxillofac Surg 2002; 60: 1176-1181.

- [3] Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G.
An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials.
Biomaterials 1999; 20(3): 211-220.

- [4] Anitua E.
Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants.
Int J Oral Maxillofac Implants 1999; 14: 529-535.

- [5] Anitua E, Ortiz IA.
Ideale Implantatoberfläche für die Bioaktivierung mit P.R.G.F.
Dent Implantolog 2002; 6: 14-22.

- [6] Anitua E.
A new approach to bone regeneration Plasma Rich in Growth Factors.
2001.

- [7] Atanasov AT, Spasov V.
Inhibiting and disaggregating effect of gel-filtered Galega officinalis L. herbal extract on platelet aggregation.
J Ethnopharmacol 2000; 69(3): 235-240.

- [8] Aukhil I.
Biology of wound healing.
Plast Reconstr Surg 2000; 22: 44-50.

- [9] Bastian SEP, Walton PE, Belford DA.
Transport of circulating IGF-I and LRIGF-I from blood to extracellular wound fluid sites in rats.
Endocrinology 2000; 164: 77-86.

- [10] Benner KU, Bauer F, Heuckmann K-H, Haas S.
Plättchenreiches Plasma (PRP) in der Oralchirurgie.
ZMK 2003 19(7-8): 470-480.
- [11] Bhanot S.
Current applications of platelet gel in facial plastic surgery.
Facial Plastic Surgery 2002; 18: 27-33.
- [12] Bolander ME.
Regulation of fracture repair by growth factors.
Proc Soc Exp Biol Med 1992; 200: 565-569.
- [13] Boncler MA, Koziolkiewicz M, Watala C.
Aptamer inhibits degradation of platelet proteolytically activatable receptor, PAR-1, by thrombin.
Thromb Res 2001; 104(3): 215-222.
- [14] Border WA, Noble NA.
Transforming growth factor β in tissue fibrosis.
The New England Journal of Medicine 1994; 331: 1286-1892.
- [15] Canalis E, Varghese S, McCarthy TL.
Role of platelet derived growth factor in bone cell function.
Growth Regulation 1992; 2: 151-155.
- [16] Curasan AG.
Knochenaufbau mit CERASORB und PRP.
Pamphlet 2000.
- [17] Davies JE.
Mechanismus of endosseus integration.
Int J of Prosthodontics 1998; 11: 391-401.
- [18] Deodhar AK, Rana RE.
Surgical physiology of wound healing: A review.
Journal of Postgraduate Medicine 1997; 43: 52-56.
- [19] Dugrillon A, Eichel H, Kern S, Klüter H.
Autologous concentrated platelet rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration.
Int J Oral Maxillofac Surg 2002; 31: 615-619.

- [20] Duncan RL, Akanbin KA, Farach-Carson MC.
Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells.
Seminar in Nephrology 1988; 18: 178-190.
- [21] Edlund A, Wennmalm
A. Endothelin does not affect aggregation of human platelets.
Clin Physiol 1990; 10(6): 585-590.
- [22] Eklou-Kalonji E, Denis I, Lieberherr M, Pointillart A.
Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts
in vitro.
Cell Tissue Res 1997; 292: 163-171.
- [23] Gandossi E, Lunven C, Berry CN.
Role of clot-associated (-derived) thrombin in cell proliferation induced by fibrin clots in vitro.
British Journal of Pharmacology 2000; 129: 1021-1027.
- [24] Gawaz M.
Das Blutplättchen.
Stuttgart, New York: Thieme, 1999.
- [25] Ghiannobile WV, Whitson SW, Lynch SE.
Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-
I.
Journal of Dental Research, 1997; 76: 1569-1578.
- [26] Gleizes P-E.
TGF- β latency: Biological significance and mechanisms of activation.
Stem Cells 1997; 15: 190-197.
- [27] Giesen PLA.
Transfer of Units. 2003.
Abstract: 1 U/ml is around 10 nM Thrombin.
- [28] Godwin S, Soltoff S.
Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor-mediated
chemotaxis in osteoblasts through different pathways.
The Journal of Biological Chemistry 1997; 272: 11307-11312.
- [29] Goodkin DA, Pierce GF.
Role of platelet-derived growth factor in osteoblast function and bone synthesis.
Wound Rep Reg 1993; 1: 203-212.

- [30] Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC.
TGF- β in blood: A Complex Problem.
Cytokine & Growth Factor Reviews 2000; 11: 133-145.
- [31] Green DM.
Platelet gel as an operatively procured platelet-based alternative to fibrin-glue.
Plast Reconstr Surg 1997; 101: 1161-1162.
- [32] Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G.
Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes.
Clin Oral Impl Res 2002; 13: 529-535.
- [33] Haga CS, Stern PH.
Responses of osteoblastic cells (UMR 106) exposed to elevated extracellular calcium.
Journal of Endodontics 1993; 19: 462-464.
- [34] Hale LV, Ma YF, Santerre RF.
Semi-quantitative fluorescence analysis of calcein binding as a measurement of in vitro mineralization.
Calcif Tissue Int 2000; 67(1): 80-84.
- [35] Hall TJ.
A reappraisal of the effect of extracellular calcium on osteoblastic bone resorption.
Biochemical and Biophysical Research Communications 1994; 202: 456-462.
- [36] Harrison P, Cramer EM.
Platelet Alpha-Granules.
Blood Reviews 1993; 7: 52-62.
- [37] Hartman AR, Galanikis DK, Honig MP, Seifert FC, Anagnostopoulos CE.
Autologous whole plasma fibrin gel: Intraoperative procurement.
Arch Surg 1992; 127: 357-359.
- [38] Hemker HC, Giesen P.
The thrombogram: Monitoring thrombin generation in platelet rich plasma.
Thromb Haemost 2000; 83: 589-591.
- [39] Hock JM, Canalis E.
Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts.
Journal of Endocrinology 1994; 134: 1423-1428.

- [40] Hom DB, Thatcher G, Tibesar R.
Growth factor Therapy to Improve Soft Tissue Healing.
Facial Plastic Surgery 2002; 18: 41-51.
- [41] Huges FJ, Aubin JE, Heersche JNM.
Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta.
Bone and Mineral 1992; 19: 63-74.
- [42] Hung DT, Vu T-KH, Nelken NA, Coughlin SR.
Thrombin-induced events in non-platelet cells are mediated by the unique proteolytic mechanism established for the cloned platelet thrombin receptor.
J Cell Biol 1992; 116: 827-832.
- [43] Ishii-Watabe A, Uchida E, Mizuguchi H, Hayakawa T.
On the mechanism of plasmin-induced platelet aggregation.
Biochem Pharmacol 2000; 59: 1345-1355.
- [44] Jiang D, Dziak R, Lynch SE, Stephan EB.
Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors.
J Periodontol 1999; 70: 834-839.
- [45] Kanatani M, Sugimoto T, Fukase M, Fugita T.
Effect of elevated extracellular calcium on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: its direct and indirect via monocytes.
Biochem Biophys Res Commun 1991; 181: 1425-1430.
- [46] Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA.
Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series.
J Periodontol 2000; 71(10): 1654-1661.
- [47] Katagiri T, Lee T, Takeshima H, Suda T, Tanaka H, Omura S.
Transforming growth factor-beta modulates proliferation and differentiation of mouse clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells depending on their maturation stages.
Bone and Mineral 1990; 11: 285-293.
- [48] Kim HD, Valentini RF.
Human osteoblasts response in vitro to platelet derivated growth factor and transforming growth factor-beta delivered from contolled-release polymer rods.
Biomaterials 1997; 18: 1175-1184.

- [49] Kim HD, Kim W-K, Park J-C, Kim K-J.
A Comparative Study os Osseointegration of Avana Implants in a Demineralized Freeze-Dried Bone Alone or With Platelet-Rich Plasma.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2002; 60: 1018-1025.
- [50] Kim HD, Chung C-H, Kim W-K, Park J-C, Lim S-C.
Use of Particulate Dentin-Plaster of Paris Combination with/without Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Bone Defects Around Implants.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2002; 17: 86-94.
- [51] Kingsley K, Rust WL, Huff JL, Smith RC, Plopper GE.
PDGF-BB enhances expression of, and reduces adhesion to, laminin-5 in vascular smooth muscle cells.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 294(5): 1017-1022.
- [52] Landesberg RM, Moses M, Karpatkin M.
Letters to the editor: Risks of using platelet rich plasma gel.
J Oral Maxillofac Surg 1998; 56: 1116-1117.
- [53] Landesberg RM, Roy M, Glickman RS.
Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation.
J Oral Maxillofac Surg 2000; 58: 297-300.
- [54] Lansdown ABG.
Calcium: A potential central regulator in wound healing in the skin.
Wound Repair and Regeneration 2002; 10: 271-280.
- [55] Lawrence WT.
Physiology of the acute wound.
Clinics in Plastic Surgery 1998; 25: 321-339.
- [56] Lekovic VC, Camargo PM, Weinländer M, Vasilic N, Kenney EB.
Comparison of Platelet-Rich Plasma, Bovine Porous Bone Mineral, and Guided Tissue Regeneration Versus Platelet-Rich Plasma and Bovine Porous Bone Mineral in the Treatment of Intraony Defects: A Reentry Study.
J Periodontol 2002; 73(2): 198-205.
- [57] Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C.
Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors.
APMIS 1995; 103(2): 140-146.

- [58] Lind M.
Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies and implant fixation.
Acta Orthopaedia Scandinavica 1998; 2(37): 283.
- [59] Loza J, Stephan e, Dolce C, Simasko S.
Calcium currents in osteoblastic cells: Dependence upon cellular growth stage.
Calcified Tissue International 1994; 55: 128-133.
- [60] Lynch SE, Williams RC, Polson AM et al.
A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration.
J Clin Periodontol 1989; 16: 545-548.
- [61] Lynch SE, Luiz de Castilla G, Williams RC, et al.
The effects of short-time application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing.
J of Periodontology 1991; 62: 458-467.
- [62] Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E.
Platelets and inflammation: Role of Platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine.
Inflammation Res. 1997; 46: 4-18.
- [63] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR.
Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85(6): 638-646.
- [64] Marx RE.
Platelet rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts.
Tissue engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics, 1999; 71-82.
- [65] Marx RE.
Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma preparation.
Int J Oral Maxillofac Surg 2000; 58: 300-301.
- [66] Marx RE.
Platelet Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP?
Implant Dentistry. 2001; 10: 225-228.
- [67] McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Cui Y, Decker JD, Franceschi RT.
Effects of differentiation and transforming growth factor beta 1 on PTH/PTHrP receptor

mRNA levels in MC3T3-E1 cells.
J Bone Miner Res 1995; 10(8): 1243-1255.

- [68] Meffert RM.
The soft tissue interface in dental implantology.
Journal of Dental Education 1988; 52: 810-811.
- [69] Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG et al.
Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression.
Plast Reconstr Surg 1999; 103(2): 536-547.
- [70] Mundy GR.
Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors.
Journal of Clinical Orthopaedics and Related Research 1999; 323: 24-28.
- [71] Nwomeh BC, Yager DR, Cohen IK.
Physiology of the chronic wound.
Clinics in Plastic Surgery 1998; 25: 341-355.
- [72] Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE.
Effect of Platelet Releasate on Bone Cell Migration and Recruitment In Vitro.
The J of Craniofac Surg 2003; 14(3): 292-300.
- [73] Palti A.
Marktübersicht der PRP-Systeme.
Oralchirurgie Journal 2001; 1: 6-11.
- [74] Park J, Davies JE.
Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces.
Clin Oral Impl Res 2003; 11: 530-539.
- [75] Quirinia A.
Skin wound healing and ischaemia.
Danish Medical Bulletin 1999; 46: 85-105.
- [76] Oz MC, Jeevanandam V, Smith CR et al.
Autologous fibrin glue from intraoperatively collected platelet-rich plasma.
Ann Thorac Surgery 1992; 53: 530-531.
- [77] Roberts WE.
Bone tissue interface.
Journal of Dental Education 1988; 52: 804-809.

- [78] Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M.
Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the mandible: preliminary results.
J Oral Maxillofac Surg 2002; 60: 630-635.
- [79] Rodan GA, Martin TJ.
Therapeutic approaches to bone diseases.
Science 2000; 289: 1508-809.
- [80] Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H.
Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet-rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2003; 61: 157-163.
- [81] Sanchez A, Sheridan P, Kupp L..
Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review.
The International Journal of Oral & Maxillofac. Impl. 2003,18(1): 93-103.
- [82] Schaffer C, Nanney LB.
Cell biology of wound healing.
International Review of Cytology 1996; 169: 151-181.
- [83] Schmitz JP, Hollinger JO.
The biology of platelet-rich plasma.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2001; 59: 1119-1121.
- [84] Schulte W.
Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung Für die primäre Heilung von Kieferknochen.
München: Carl Hans Verlag 1964.
- [85] Schulte W.
Zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung großer Knochendefekte: Eine Modifikation der Eigenblutmethode.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2001; 59: 1119-1121.
- [86] Service RF.
Tissue engineers build new bone.
Science 2000; 289: 1498-1500.
- [87] Sirieix D, Chemla E, Castier Y, Massonnet-Castel S, Fabiani JN, Baron JF.
Comparative study of different biological glues in an experimental model of surgical bleeding in anesthetized rats: platelet-rich and -poor plasma-based glue with and without

aprotinin versus commercial fibrinogen-based glue.
Ann Vasc Surg 1998; 12(4): 311-316.

- [88] Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL.
Functionalized silk-based biomaterials for bone formation.
J Biomed Mater Res 2001; 54(1): 139-148.
- [89] Solheim E.
Osteoinduction by demineralised bone.
Int Orthop 1998; 22: 335-342.
- [90] Solheim E.
Growth factors in bone.
Int Orthop 1998; 22: 410-416.
- [91] Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB et al.
Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats.
Plast Reconstr Surg 2000; 105(6): 2028-2038.
- [92] Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Fukase M, Chihara K.
Growth factors in bone.
Int Orthop 1998; 22: 410-416.
- [93] Su-Gwan Kim D.
IGF-I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation.
Am J Physiol 1994; 266: E709-E716.
- [94] Tatakis DN, Dolce C, Dziak R.
Thrombin effects on osteoblastic cells. I. Cytosolic Calcium and Phosphoinositides.
Biochem Biophys Res Commun 1989; 164(1): 119-127.
- [95] Tatakis DN, Dolce C, Dziak R, Fenton JW.
Thrombin effects on osteoblastic cells. II. Structure-function relationships.
Biochem Biophys Res Commun 1991; 174(1): 181-188.
- [96] Tatakis DN.
Human Platelet Factor 4 is a Direct Inhibitor of Human Osteoblast-like Osteosarcoma Cell Growth.
Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 287-293.

- [97] Tatakis DN.
Blood Coagulation Factors in Periodontal Pathophysiology: A Review with Emphasis on the Role of Thrombin.
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 1992; 18: 28-32.
- [98] Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H et al.
Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone.
Eur J Histochem 2000; 44: 269-278.
- [99] Tischler M. Platelet rich plasma.
The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts.
N Y State Dent J 2002; 68(3): 22-24.
- [100] Teitelbaum SL.
Bone resorption by osteoclasts.
Science 2000; 68(3): 22-24.
- [101] Watrous DA, Andrews BS.
The metabolism and immunology of bone.
Seminars in Arthritis and Rheumatism 1989; 19: 45-65.
- [102] Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE.
Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count.
J Craniomaxillofac Surg 2002; 289: 1504-1508.
- [103] Weibrich G, Gnoth SH, Otto M, Reichert TE, Wagner W.
Wachstumsstimulation von humanen osteoblastenähnlichen Zellen durch Thrombozytenkonzentrate in vitro. [Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro].
Mund Kiefer Gesichtschir 2002; 6(3): 168-174.
- [104] Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G.
Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system.
Int J Oral Maxillofac Implants 2002; 17(2): 184-190.
- [105] Weibrich G, Kleis WKG.
Curasan PRP Kit vs PCCS PRP system. Collection Efficiency and Platelet Counts by Two Different Methods for the Preparation of Platelet-Rich Plasma.
Clin Oral Impl Res 2002; 13: 437-443.

- [106] Weibrich G, Kleis W, Wagner W.
Platelet-rich Plasma (Thrombozytenkonzentrate) in der Präprothetischen Chirurgie und Implantologie – eine aktuelle Literaturübersicht.
Zahnärztl Impl 2003, 19(3) 168-174.
- [107] Weibrich G, Streckbein P,, Weibrich T.
Übersicht über verschiedene Eigenherstellungsverfahren von Thrombozytenkonzentraten.
ZMK. 2003, 19(7-8) 482-487.
- [108] Whitman DH, Berry RL, Green DM.
A technique for improving the handling of particulate cancellous bone and marrow grafts using platelet gel.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 1998; 56: 1217-1218.
- [109] Whitman DH, Berry RL.
Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 1997; 55: 1294-1299.
- [110] Winters KJ, Santoro SA, Miletich JP, Eisenberg PR.
Relative importance of thrombin compared with plasmin-mediated platelet activation in response to plasminogen activation with streptokinase.
Circulation 1991; 84(4): 1552-1560.
- [111] Yamamoto K, Hayashi J, Miyamura H, Eguchi S.
A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery.
Cardiovasc Surg 1996; 4: 9-14.
- [112] Zechner W, Tangl S, Tepper G et al.
Influence of platelet-rich plasma an osseous healing of dental implants: A histologic and histomorphometric study in minipigs.
Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18: 15-22.
- [113] Zheng MH, Wood DJ, Papadimitiou JM.
What's is new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation?
Path Res pract 1992; 118: 1104-1121.
- [114] Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT.
Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells.
J Bone Miner Res 2002; 17(1): 101-110.

7 Anhang

- 7.1 **Skizze:** Sanchez A, Sheridan P, Kupp L. Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *The International Journal of Oral & Maxillofac. Impl.* 2003, 18(1): 93-103.

Table 3 Summary of Human Studies Involving the Use of PRP in Combination with Bone Grafts

Authors	Study type	Patients	Groups	Control	Random-ization	Length	Defect type	Graft	Biopsy
Marx et al ¹⁵	Prospective	88	44 PRP+graft/ 44 graft	Yes	Questionable	4 months	Mandibular discontinuity	Autologous	Yes
Anitua ²⁶	Case series	20	10 PRP, 10 control	Yes	Questionable	6 months	Postextraction	None/ Autologous*	Yes
		3	3 split-mouth	Yes	No	Same	Same	None	Yes
Kassolis et al ²⁷	Case series	15		No	No	12 months	Ridge and SA	FDDBA	Yes
Rosenberg and Torosian ²⁸	Case report	1		No	No	9 months	SA	Alloplastic	No
Shanamen et al ⁴⁵	Case reports	3		No	No	No	RA	1 DFDBA, 1 alloplastic/ DFDBA/ autograft, 1 DFDBA	Yes
Froum et al ⁴⁶	Case reports	3	Split mouth	Yes	Questionable	7-9 months	SA	ABB	Yes

*In 5 patients in the PRP group.

PRP = platelet-rich plasma; SA = sinus augmentation; RA = ridge augmentation; DFDBA = demineralized freeze-dried bone allograft; FDDBA = freeze-dried bone allograft; ABB = anorganic bovine bone.

7.2 Photos: PRP Herstellung nach Curasan Methode

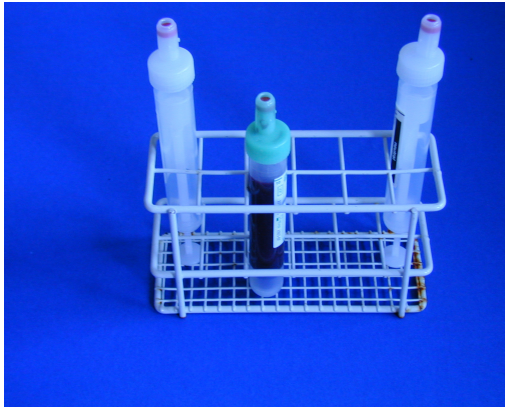


Photo 1. Frisches venöses Blut in CPDA-Monovette

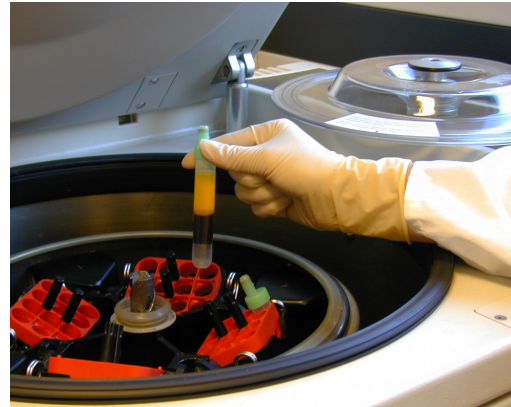


Photo 2. Das Zentrifugieren um das plättchenhaltigen Plasma zu erreichen

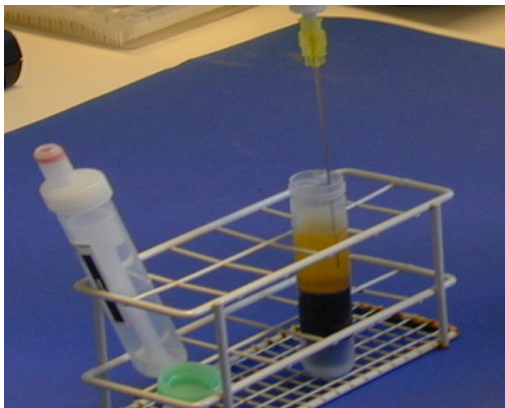


Photo 3. Abnehmen vom plättchenhaltigen Plasma in eine neutralen Monovette

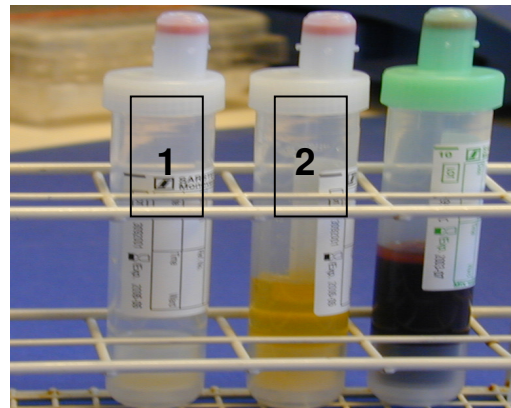


Photo 4. Rörchen 1 und 2: 300 μ l PRP, ~3ml PPP

7.3 Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mein Studium ermöglicht haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Geis-Gerstorfer, danke ich für die hervorragende Themenstellung und für die freundliche Unterstützung während meiner Dissertation. Herrn Prof. Dr. Weber danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit zu schreiben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Scheideler, für die fachkompetente Unterstützung, für die vielen Stunden, die er für meine Dissertation geopfert hat, für all seine Ratschläge betreffend der Doktorarbeit, aber auch der deutschen Sprache, die er mir immer zu geben bereit war.

Bei Herrn Axmann bedanke ich mich für die wertvolle Hilfe bei der Auswertung meiner Ergebnisse. Frau Kimmerle und Frau Füger danke ich für die unersetzliche und ständige Mithilfe und für das sehr gute Arbeitsklima, Herrn Kruppenbacher danke ich für seine oftmals aufmunternden Bemerkungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Apheresezentrum, Abteilung Transfusionsmedizin mit Blutbank an der Uni Tübingen, für die Trombozytenkonzentrate und vor allem bei allen Mitarbeitern, die für meine Versuche Blut gespendet haben.

Danken möchte ich all meinen Freunden, speziell Renata und Adriano, Shila und Michael sowie auch Chen, für ihre Unterstützung aber mindestens ebenso für die willkommene und notwendige Ablenkung.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Mann Gabriel für die liebevolle und motivierende Unterstützung meiner Promotion.

7.4 Tabellarischer Lebenslauf

GABRIELA AIDA SEHER

Geboren 30. August 1974, Gura Humorului, Rumänien

STUDIUM

1993 – 1999 Fakultät für Zahnmedizin der “West-Universität Vasile Goldisch”, Arad, Rumänien
Sept. 1999 Staatsexamen für Zahnärzte (September-Session 1999)

BERUFSERFAHRUNG

10/99 - 02/00 Private Zahnarztpraxis, Gura Humorului
Ausführung kompletter zahnärztlicher Behandlungen
06/01 - 06/02 Private Zahnarztpraxis Berlin, Dr. Monika Nowak
Ausbildungsassistentin (deutsche Berufserlaubnis nach §13)

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

2003 Poster „Stimulation of cell proliferation by Platelet Rich Plasma (PRP)“, Internationales Symposium IBI, 14-16 Mai 2003, Rostock
2003 Poster „Influence of Platelet Rich Plasma (PRP) on Cell Proliferation“, 18th European Conference on Biomaterials, 1-4 Oktober 2003, Stuttgart
2003 A. Seher, D. Axmann, J. Geis-Gerstorfer, H. Weber, L. Scheideler „Stimulation of cell proliferation by Platelet Rich Plasma (PRP)“, BIOMaterialien 4 (2): 149, 2003
2003 A. Seher, L. Scheideler, D. Axmann, J. Geis-Gerstorfer, H. Weber „Influence of Platelet Rich Plasma (PRP) on Cell Proliferation“, Abstract, ESB-18th European Conference on Biomaterials, P145, 2003
2004 Vortrag „In-vitro Untersuchungen der Zellstimulation durch Thrombozytenkonzentrate (PRP)“, Fortbildung Prothetikspezialist der DGZPW, Zahnklinik Uni Tübingen
2004 Vortrag „Einfluss von Platelet Rich Plasma (PRP) auf die Zellproliferation“, 53. DGZPW-Jahrestagung, 13-16. Mai 2004, Kiel

PROMOTION

Seit Juli 2002 Dissertation „In vitro-Untersuchungen zur Zellstimulation durch Trombozytenkonzentrate (PRP)“ in der Sektion MWT, Abteilung Prothetik, Zahnklinik Universität Tübingen (Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Weber) unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Geis-Gerstorfer.