

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie

Prof. Dr. med. J. Windolf

**Einfluss von Platelet-rich Plasma
in Kombination mit Calciumphosphatgranulaten
auf die Knochenheilung bei metaphysären Defekten
des langen Röhrenknochens beim Mini-Pig**

- Eine tierexperimentelle Studie -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ebru Ar

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Mohssen Hakimi

Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Scherer

Wenn ich nicht brenne, wenn du nicht brennst,
wenn wir nicht brennen,
wie kann
die Finsternis erleuchtet werden?

Nazim Hikmet Ran.

Teile dieser Dissertation von Ebru Ar waren Bestandteil einer Publikation, die in einem englischsprachigen peer reviewed Journal unter folgendem Titel veröffentlicht wurde:

“Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes
metaphyseal bone healing in mini-pigs”

Journal of Orthopaedic Research 2010 Nov;28(11):1448-55. Jungbluth P, Wild M,
Grassmann JP, Ar E, Sager M, Herten M, Jäger M, Becker J, Windolf J, Hakimi M.

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Knochendefekte	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	10
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	11
2.1	Versuchstiere.....	12
2.2	Versuchsdurchführung.....	12
2.2.1	Operationsvorbereitung.....	12
2.2.2	Operationsdurchführung: Defekterstellung.....	13
2.2.3	Therapie des zugeführten Defekts.....	14
2.2.4	Intraoperative Blutentnahme.....	16
2.2.5	Postoperative Versorgung.....	17
2.2.6	Euthanasie der Tiere und Entnahme der proximalen Tibia.....	17
2.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	18
2.3.1	Materialien und Geräte.....	18
2.3.2	Vorbereitung der Blutproben.....	19
2.3.3	Assay.....	20
	VEGF-Elisa.....	20
	TGF- β 1-Elisa.....	21
	BMP-2-Elisa.....	21
	BMP-7-Elisa.....	22
	PDGF-Elisa.....	23
2.4	Statistische Auswertung.....	23
3	<u>ERGEBNISSE</u>	24
3.1	Thrombozytenkonzentration im PRP.....	24
3.2	Wachstumsfaktorenkonzentration im PRP.....	25
4	<u>DISKUSSION</u>	30
4.1	Übertragbarkeit auf den Menschen.....	30
4.2	Bisheriger Forschungsstand.....	30
4.3	PRP-Herstellungsverfahren und Thrombozytenkonzentration.....	36
4.4	Wachstumsfaktoren.....	38
4.5	Resorptionsrate der Calciumphosphatgranulate.....	40
4.6	Defektlokalisierung.....	41
4.7	Resümee.....	41

INHALTSVERZEICHNIS

5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	43
6	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	45
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	47
8	<u>DANKSAGUNG</u>	55
9	<u>LEBENS LAUF</u>	57

1 Einleitung

1.1 Knochendefekte

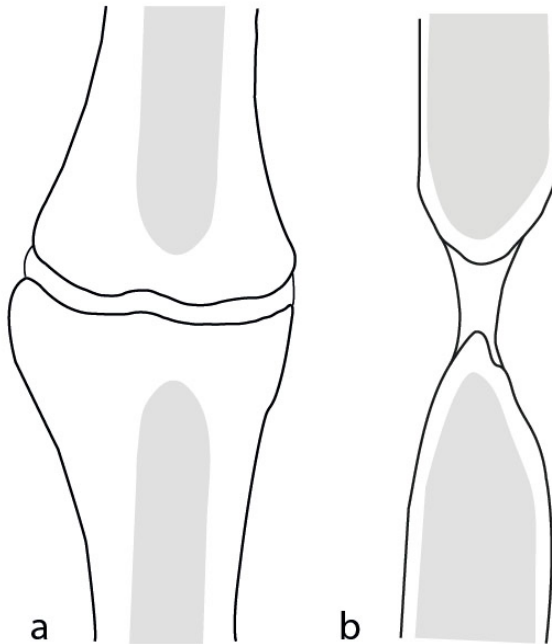
Knochendefekte, d.h. Defekte der Knochenspongiosa und -kortikalis, entstehen durch Tumoren, septische oder aseptische Nekrosen sowie Pseudarthrosen. Letztere kommen auf dem Boden einer Fraktur zustande und bilden somit für jeden Traumatologen eine besondere Herausforderung [1]. Aufgrund einer Störung der physiologischen Frakturheilung des traumatisierten Knochens kommt es zu einer Persistenz des entstandenen Knochendefekts, was eine mögliche Komplikation bei der Versorgung von Knochenbrüchen darstellt. In der Regel sind Knochenbrüche nach vier bis sechs Monaten knöchern durchbaut. Man spricht von einer verzögerten Frakturheilung (delayed union), wenn die Fraktur in der erwähnten Zeit nicht verheilt [2]. Bleibt die Regeneration des Knochens hingegen über mehr als sechs Monate aus, so handelt es sich um eine Pseudarthrose (non-union) [3].

Nach Weber und Cech [2] werden die Pseudarthrosen in vitale, hypertrophe und avitale, atrophe Pseudarthrosen eingeteilt (Abb. 1). Diese Klassifikation berücksichtigt sowohl die zugrunde liegenden biologischen Eigenschaften als auch die Bildmorphologie der fehlenden Frakturregeneration. Sind die Frakturfragmente durchblutet, so liegt eine vitale Pseudarthrose vor, in deren Frakturzone eine überschießende Knochenneubildung zu erkennen ist. Ist die Durchblutung dagegen gestört, handelt es sich um eine avitale Pseudarthrose, bei der folglich die Funktionstüchtigkeit des Knochens eingeschränkt ist. Somit kommt es zur insuffizienten Knochenregeneration.

Abb. 1: Pseudarthrosenformen nach Weber und Cech

a) hypertrophe und

b) atrophe Pseudarthrose



Zum Auftreten von Pseudarthrosen liegen keine einheitlichen Daten vor, da die Pseudarthroseninzidenz abhängig ist vom untersuchten Kollektiv, der Frakturlokalisation und -beschaffenheit (z.B. offene Fraktur, enormer Weichteilschaden und Knochenverlust). Kaminski et al. [4] rechnen bei Frakturen langer Röhrenknochen mit einer verzögerten Knochenregeneration in 1-5 % der Fälle. Die Rate verzögerter Knochenheilung wird von Zimmermann et al. [5] unterschiedlich hoch angegeben. Sie rechnen mit 10 %, falls keine Risikofaktoren vorliegen, und mit bis zu 40 %, wenn bei den Betroffenen Risikofaktoren vorzufinden sind.

Grundlegend kann man zwei Ursachengruppen einer gestörten Knochenbruchheilung unterscheiden. Zu diesen gehören einerseits die mechanischen und biologischen Faktoren und andererseits die Infektion, wobei eine Kombination beider Faktoren nicht auszuschließen ist [6].

Zu den mechanischen Faktoren zählen zum einen ein mangelnder Fragmentkontakt und zum anderen eine Instabilität des Knochens während der Frakturheilung [7]. Wichtigste biologische Ursache ist die fehlende Durchblutung aufgrund einer Störung der Makrozirkulation oder auch der medullären und periostealen Mikrozirkulation [3].

Weiterer ungünstiger Faktor ist die bakterielle Kontamination, die sich intraoperativ oder während des Unfalls bei offenen Verletzungen ereignen kann. Selten können auch hämatogene Verschleppungen auftreten [6]. Derartige Infektionen eskalieren die Situation durch Ausbildung von Knochennekrosen und Osteolysen.

Polytraumatisierte Patienten stellen infolge ihres immunologischen Zustandes, der Immobilisation sowie des mangelnden Muskeltonus eine besondere Risikogruppe für Pseudarthrosen dar [7].

Andere Ursachen sind systemische Faktoren wie Rauchen, Alkoholismus, Neoplasien, bereits bestehende Durchblutungsstörungen sowie Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Osteoporose [3, 6, 8] (Abb. 2). Auch das Alter stellt einen entscheidenden Risikofaktor dar [7].

Abb. 2: Ursächliche Faktoren einer gestörten Knochenheilung nach Gandhi et al. [8]

Box 1. Risk factors for impaired bone healing

Medically/pharmacologically immunosuppressed
Nonunion/pseudarthrosis at proposed surgical site
Smoking
Multiple surgeries (more than two at same proposed surgical site)
History of trauma (open, high-energy)
Diabetes (neuropathy, Charcot arthropathy)
Avascular necrosis at proposed surgical site
History/active infection at proposed surgical site
Suboptimal arterial inflow from peripheral vascular disease
(not requiring revascularization)

Typisch für das klinische Erscheinungsbild der Pseudarthrose sind belastungsabhängige Schmerzen mit Schwellungen im Frakturbereich. Achsen- und Rotationsfehler können während der klinischen Untersuchung festgestellt werden. Die Symptommfreiheit einiger Patienten ist durchaus möglich [6].

Als diagnostisches Standardverfahren dient das konventionelle Röntgenbild in zwei Ebenen. In fraglichen Fällen kann die Computertomographie herangezogen werden [7]. Zur Klärung, ob eine reaktive oder reaktionslose Pseudarthrose vorliegt, ist die Anwendung der Skelettszintigraphie hilfreich [6].

Die Heilungsraten nach chirurgischer Pseudarthrosentherapie werden von Rompe et al. [9] zwischen 86 % und 93 % angegebenen.

Bisher existiert für Patienten mit Knochendefekten bzw. Pseudarthrosen kein klares und einheitliches Behandlungskonzept. Die Behandlungsmethoden sind von der Lokalisation und der Art der Pseudarthrose abhängig. Neben der konservativen Behandlung besteht die Möglichkeit der operativen Versorgung einer Pseudarthrose. Wird eine operative Versorgung angestrebt, so muss zunächst eine Stabilisierung der Defektzone durch Osteosyntheseverfahren erfolgen. Etabliert haben sich hier die Marknagel- und Plattenosteosynthesen sowie die Fixateursysteme [4].

Bei hypertrophen Pseudarthrosen ist allein die Herstellung von Stabilität ausreichend, während atrophe Pseudarthrosen zusätzlich die Gewährleistung von Vitalität erfordern. Goldstandard ist dabei das Anfrischen der Knochenfragmente und die Anlagerung einer Spongiosaplastik [3]. Ein Problem mit hoher klinischer Relevanz stellt die Defektpseudarthrose dar. Prinzipiell bieten sich zur Defektüberbrückung zwei Möglichkeiten:

1. Defektauffüllung mittels Knochentransplantat

Als Standardtherapie gilt hier die autologe Knochentransplantation in Form von Beckenkammspänen oder -spongiosa [10]. Diese Verfahren bieten sicherlich den Vorteil einer adäquaten Überbrückung des Knochensubstanzdefekts sowie einer großen biologischen Leistungsfähigkeit im Sinne von Osteogenität und, durch ihre Wachstumsfaktoren und Strukturen, gleichzeitig auch Osteoinduktivität und -konduktivität [11]. Nachteile bestehen allerdings in der Entnahmemorbidität

(donor-site morbidity) und der eingeschränkten Verfügbarkeit beim Einsatz autologer Spongiosa [12, 13].

Erstmals beschäftigte sich 1931 Matti [14] mit der Verpflanzung von Spongiosa. Anhand ausführlicher Untersuchungen kam er zu der Schlussfolgerung, dass transplantierte Spongiosa lebend einheilen kann, wenn das Transplantatlager im Stande ist, möglichst viele Knochenzellen am Leben zu halten [14].

Die tierexperimentelle Studie von Decker et al. [15] zeigte bei Transplantation von autologer Beckenkamm-spongiosa in einen durch Osteosynthese stabilisierten Knochendefekt der Ulna beim Hund schon nach 1 Woche Osteoblastenaktivität. Nach weiteren 2-3 Wochen konnte neu gebildete Knochenmatrix zwischen Transplantat und angrenzender Kortikalis nachgewiesen werden.

Rehn et al. [16] erprobten das Einwachsen von transplantierte autologer Spongiosa und Kortikalis im Weichteilgewebe von Ratten. Sie stellten fest, dass die von der Spongiosa ausgehende Knochenneubildung ausgeprägter war als die der Kortikalis.

In einer tierexperimentellen Studie an Hunden, in der autologe Spongiosa aus dem Trochanter in einen keilförmig erstellten Defekt der Radiusdiaphyse eingesetzt wurde, beobachteten Saur et al. [17] bereits nach 6 Wochen einen vollständigen Umbau der transplantierten Spongiosa über Geflechtknochen zum Lamellenknochen. Sie begründeten die besondere Umstrukturierungsfähigkeit der Spongiosa mit ihrer lockeren Struktur, die rasch vaskularisiert wird und somit sehr frühzeitig knöchern umbaut werden kann.

2. Behandlung mit Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmittel gehören zu den Biomaterialien. Diese sind nicht-körpereigene Substanzen, die im menschlichen Organismus Strukturen und deren Funktionen teilweise oder gänzlich ersetzen [18].

Es gibt zahlreiche Knochenersatzmittel, die sich in ihren chemischen Zusammensetzungen, ihren Wirkmechanismen und Indikationsbereichen unterscheiden. Die Klassifikation erfolgt nach den Ausgangsverbindungen in biologisch-organische Substanzen, synthetisch-anorganische Materialien und synthetisch-organische Verbindungen sowie Kompositen [18].

Schieker et al. [11] erarbeiteten eine Einteilung der Rekonstruktionsverfahren zur Knochendefektüberbrückung anhand folgender Kriterien: Biologische Leistungsfähigkeit, mechanische Beanspruchbarkeit, Verfügbarkeit, technischer Aufwand, sowie Morbidität und Langzeitstabilität. In diesem Zusammenhang erfüllt die autologe Spongiosa beinahe alle Kriterien, während es vor allem Knochenersatzstoffen an osteogener und osteoinduktiver Leistungsfähigkeit mangelt [11] (Abb. 3).

Abb. 3: Beurteilung verschiedener Rekonstruktionsverfahren nach Schieker et al. [11]

Tab. 1 Summarische Bewertung verschiedener Rekonstruktionsverfahren zur Knochendefektüberbrückung												
Kriterien		Autogen				Allogen		Ersatzverfahren			Experimentelle Therapie	
		Spongiosa	Nicht vask. Span	Vask. Span	Kallusdis-traktion	Span/Spongiosa		Metall-implan-tate	Ersatz-stoffe	Wachs-tums-faktoren	TE	Stamm-zell-therapie
1. Biolo-gische Leistungsfähigkeit	Osteo-genese	+	+	+	+	-		-	-	-	+	+
	Osteo-Induktion	(+)	(+)	(+)	+	(+)		-	-	+	+	-
	Osteo-konduktion	+	+	(+)	-	+		(+)	+	-	+	-
2. Frühe mechanische Beanspruchbarkeit		(+)	+	+	-	(+)		+	(+)	-	(+)	-
3. Verfügbarkeit		+	(+)	(+)	(+)	+		+	+	+	(+)	(+)
4. Technischer Aufwand		-	(+)	+	+	-		-	-	-	+	(+)
5. Morbidität		(+)	+	+	+	-		-	-	-	(-)	(-)
6. Langzeitstabilität		+	+	+	+	(+)		+	(+)	+	+	+

Tierexperimentelle Untersuchungen zur osteoinduktiven Eigenschaft synthetischer und biologischer Knochenersatzmittel von Siebert et al. [19] zeigten, dass synthetische Implantate wie Calciumphosphat-Keramiken, -pulver, Tricalciumphosphatgranulate sowie Hydroxylapatit zwar hoch biodegradierbar waren, aber keine osteoinduktive Wirkung hatten.

In der Klasse der biologisch-organischen Stoffe spielen insbesondere extrahierte, wie z.B. bovines Bone Morphogenetic Protein (BMP), und gentechnisch hergestellte Knochenwachstumsfaktoren, wie rh-BMP-2 und rh-BMP-7 eine wichtige Rolle [20, 21]. Zu den Wachstumsfaktoren, die ebenfalls Einfluss auf die Osteogenese haben, gehören Platelet-derived Growth Factor (PDGF),

Transforming Growth Factor (TGF- β 1, TGF- β 2), Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Platelet Factor 4 (PF 4). Diese werden aus Thrombozyten freigesetzt [22-24].

1965 beobachtete Urist [25] die Knochenbildung in der Muskulatur der Ratte, nachdem er in diese demineralisierte Knochenmatrix implantiert hatte. Somit kam er zum Entschluss, dass es ein Protein geben musste, das die Knochenneubildung induzierte und nannte es „Bone Morphogenetic Protein“. Wozney et al. [26] identifizierten 1988 die Gensequenz dieses Proteins und entdeckten seine Isoformen.

Zimmermann et al. [27] zeigten in einer klinischen Studie, in der 21 Patienten mit ausbleibender Frakturheilung der langen Röhrenknochen mit rekombinantem humanem BMP-7 behandelt und regelmäßigen Röntgenkontrollen unterzogen wurden, eine nachweisbare knöcherne Durchbauung der Frakturen durch osteoinduktive Potenz des BMP.

Wachstumsfaktoren sind vor allem in den α -Granula der Thrombozyten enthalten [28]. Angereicherte Thrombozyten und somit konzentrierte Wachstumsfaktoren liegen im Platelet-rich Plasma (PRP) vor. Marx definiert PRP als autologes Plasma, in dem eine Thrombozytenkonzentration über den Normwert hinaus vorliegt [29]. Dieses an Thrombozyten reiche Plasma kann mit Hilfe spezieller Bojensysteme durch Zentrifugation gewonnen werden [30]. Ein großer Vorteil besteht darin, dass es autologer Herkunft ist und somit die Übertragung von Infektionen und immunologische Reaktionen vermieden werden können [31].

Eppeley et al. [32] zeigten eine 8-fach größere Thrombozytenzahl im PRP im Vergleich zum Vollblut. Auch ein Anstieg der Wachstumsfaktoren PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und EGF im PRP wurde verzeichnet, wobei die Wachstumsfaktorkonzentration von Patient zu Patient unterschiedlich gewesen ist. Ein Anstieg der IGF-1-Konzentration wurde nicht beobachtet.

Die Beschleunigung der Knochenregeneration durch Wachstumsfaktoren wird in den letzten Jahren intensiv diskutiert. Franchini et al. [33] prüften die Wirkung von PRP an 19 Patienten, die in einem Zeitraum von 2 Jahren 22 rekonstruktive Knochenoperationen erhielten. Eingesetzt wurde PRP in Kombination mit Hydroxylapatit. Bei allen Patienten konnte röntgenologisch eine erfolgreiche Knochenregeneration nachgewiesen werden.

In einer tierexperimentellen Untersuchung, in der Knochendefekte des Os frontale des Schweins mit autologem Knochen und Knochenersatzmitteln kombiniert mit unterschiedlichen PRP-Konzentrationen aufgefüllt wurden, zeigten Schlegel et al. [34] mikroradiographisch eine frühzeitige und gesteigerte Mineralisation des Defekts in der Frühphase der Knochenregeneration bei Auffüllung mit autologem Knochen und PRP.

Marx et al. [22] konnten für die kombinierte Auffüllung von mind. 5 cm großen Defekten der Mandibula mit Beckenspongiosa und PRP eine höhere Knochenregenerationsrate und größere Knochendichte nachweisen als bei der Auffüllung der Defekte ohne PRP. Sie erklärten diese Ergebnisse durch die Induktion von Endothelzellen zur Angiogenese und Aktivierung von Präosteoblasten durch PRP, was zusammen eine Verdichtung des Knochens zur Folge hatte. Camargo et al. [35] konnten in ihrer klinischen Studie ähnliche Veränderungen demonstrieren. Auch andere Studien [36-38] belegten durch den Zusatz von PRP positive Effekte des PRP bzw. der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren auf die Knochenregeneration. Allerdings gibt es auch Autoren [1, 39, 40], die keinen positiven Effekt von PRP bezüglich der Knochendefektheilung beobachten konnten. Somit stellt die Rolle des PRP als Promoter der Knochenregeneration Gegenstand kontroverser Diskussionen dar. Ebenso wird die Wirksamkeit des PRP in Kombination mit verschiedenen osteokonduktiven Biomaterialien gegensätzlich diskutiert.

Plachokova et al. [41] konnten keinen positiven Einfluss von PRP bei der gleichzeitigen Anwendung mit Tricalciumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit nachweisen. Die tierexperimentelle Studie von Kasten et al. [42] zeigte allerdings, dass der positive Effekt des PRP von der Beschaffenheit des Knochenersatzmittels abhängig ist, mit dem es kombiniert wird. Mit Zunahme der Ähnlichkeit des Biomaterials zum menschlichen Knochen steigt seine positive Beeinflussbarkeit durch osteoinduktive Eigenschaften des PRP.

Jungbluth et al. [12] konnten bei ihren Untersuchungen zeigen, dass unter dem Einsatz von PRP in Kombination mit Calciumphosphat-Granulat bei einem metaphysären Defekt an der Tibia von Mini-Pigs sowohl in der zentralen Defektzone, als auch in der kortikalen Defektzone Areale mit neuem Knochen signifikant größer waren als bei den Defekten, die ausschließlich mit Calciumphosphat-Granulat aufgefüllt wurden. Zudem konnten sie nachweisen,

dass unter dem Einsatz von PRP die Calciumphosphat-Granulate sich in den neuen Knochen integrieren. Diese Knochenneubildung konnte sowohl auf der Oberfläche der Granulate, als auch im Inneren derselbigen nachgewiesen werden, wobei viele Granulatanteile regelrecht von neu gebildetem Knochen infiltriert waren. Außerdem demonstrierten sie, dass der Anteil residualer Calciumphosphat-Granulate unter dem Einsatz von PRP nach 6 Wochen sowohl in der zentralen, als auch in der kortikalen Defektregion signifikant niedriger war als bei alleiniger Defektfüllung mit Calciumphosphat-Granulat.

In den bisherigen Publikationen wurden aber keine Untersuchungen im Rahmen der Defekteinheilung an belastetem Knochen durchgeführt, bei der festgestellt werden konnte, inwieweit es bei der Herstellung von PRP zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl kommt. Weiterhin wurden die Wachstumsfaktoren, die in den Thrombozyten beinhaltet sind, weder im Serum bzw. im Plasma, noch im hergestellten PRP bestimmt. Entsprechend ist ein direkter Zusammenhang von Knochenneubildung mit der erhöhten Konzentration der Wachstumsfaktoren nur hypothetisch möglich gewesen.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Es gibt zahlreiche Arbeiten zur Prüfung der Wirksamkeit von im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren bezüglich der Knochenneubildung.

Ein In-vitro-Versuch von Weibrich et al. [43], in dem osteoblastenähnliche Zellen aus humanen Knochenproben von Beckenkammpongiosa gewonnen wurden und mit verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen stimuliert wurden, zeigte, dass die Proliferationsrate dieser Zellen durch PRP konzentrationsabhängig gesteigert werden konnte.

Vor allem im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Wiltfang et al. [44] führten eine klinische Studie zur Prüfung des PRP-Einflusses auf die Knochenregeneration durch. Hier wurden an 39 Patienten 45 Sinusbodenaugmentationen durchgeführt. 22 Patienten erhielten PRP und β -TCP, während die restlichen nur β -TCP bekamen. In der PRP-Gruppe konnte eine gesteigerte Knochenneubildung nachgewiesen werden.

Derartige Erfahrungen im Bereich belasteter Skelettabschnitte wie an den peripheren Extremitäten liegen bisher nicht vor.

Vor diesem Hintergrund ist es Ziel meiner Dissertationsarbeit zu evaluieren, um welchen Faktor Thrombozytenzahl und die Wachstumsfaktorkonzentrationen im PRP im Vergleich zum Vollblut durch das von unserer Arbeitsgruppe eingesetzte Verfahren zur Herstellung von PRP gesteigert werden kann, und inwieweit durch unser PRP-Herstellungsverfahren eine ideale PRP-Konzentration erzielt werden kann. Außerdem soll evaluiert werden, wie hoch die tatsächlichen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im hergestellten PRP sind und ob diese Konzentrationen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Serum- bzw. Plasmawerten zeigen.

Ob diese erzielten Konzentrationen an PRP und Wachstumsfaktoren im Einklang mit den erzielten Knochenneubildungsraten der Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe ist, soll im Rahmen der Diskussion meiner Dissertationsarbeit erörtert werden.

2 Material und Methoden

Die gesamte Versuchsdurchführung, die im Folgenden aufgeführt wird, wurde durch die Arbeitsgruppe Knocheninduktion der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Durchführung der operativen Eingriffe, Erfassung der Daten sowie die Nachbetreuung und die Euthanasie der Tiere in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgte durch die gesamte Arbeitsgruppe. Die Arbeitsgruppe bestand aus zwei Mitarbeiterinnen, die von Herrn PD Dr. med. Mohssen Hakimi und Herrn PD Dr. med. Pascal Jungbluth betreut wurden. Die weiterführenden Auswertungen und Untersuchungen erfolgten im Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie sowie im Labor der Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme. Diese wurden von den Mitarbeiterinnen individuell ausgeführt bzw. ausgewertet.

Mitarbeiterinnen und deren Arbeitsschwerpunkte:

Frau Ebru Ar:	Herstellung des Platelet-rich Plasma aus dem Vollblut der Versuchstiere, Bestimmung der Thrombozytenzahl im Vollblut und Platelet-rich Plasma sowie Evaluation der Wachstumsfaktoren im Serum/Plasma des Vollblutes sowie im Platelet-rich Plasma mittels quantitativer Elisa-Technik.
Frau Alina Kessner:	Herstellung der histologischen Knochenpräparate unter der Anleitung der Betreuer der Arbeitsgruppe sowie die Durchführung und Auswertung der histomorphometrischen Vermessungen.

2.1 Versuchstiere

Die Tierversuche, die im Rahmen meiner Dissertationsarbeit durchgeführt wurden, waren durch die Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (Protokollnummer: 50.05-230-78/06).

Im Rahmen dieser Untersuchungen kamen 16 weibliche Göttinger Mini-Pigs zum Einsatz. Sämtliche Tierlieferungen stammten vom Zuchtbetrieb Ellegaard in Dänemark. Die Unterbringung der Versuchsschweine erfolgte in allen Fällen in Ställen der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Bei Eintritt in die Studie betrug das Gewicht der Tiere zwischen 25-35 kg bei einem Alter von 18-30 Monaten. Außerdem wurde eine regelmäßige Fütterung der Tiere mit Mischfutter der Firma „ssniff Spezialdiäten GmbH“ (Soest, Germany) geachtet. Hierbei erhielten die Tiere maximal 500 g des Futters/d verteilt. Zusätzlich stand Trinkwasser zur Verfügung. Vor den operativen Eingriffen bestand, bis auf die Verabreichung von Trinkwasser, eine Nahrungskarenz von 12 Stunden.

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Operationsvorbereitung

Den Tieren wurde zur Betäubung 10 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Germany) intramuskulär injiziert. Im gleichen Zuge konnte ein venöser Zugang in eine der Ohrvenen gelegt werden, über welche die Narkoseeinleitung mit Thiopental (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Germany) erfolgen konnte. Außerdem wurde über diesen venösen Zugang Piritramid als Opioid verabreicht (Dipidolor®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany). Im Anschluss wurden die Tiere schmerzfrei intubiert.

Die Ventilation der Tiere wurde mit einem Gemisch von 0,9 l Lachgas zu 2 l Sauerstoff und 1-1,5 % Isoflurane bei einer Atemfrequenz von 12-15 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 0,35-0,5 l durchgeführt.

Während der gesamten Operation erhielten die Tiere ein Infusionsgemischs aus 5%-iger Glucose-Lösung (Delta-Select, Pfullingen, Germany), 10 ml Inzolen (Dr.

Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Germany) und 5 ml Lidocain 2 % (Lidocain-HCl, B.Braun, Melsungen, Germany).

Während des gesamten operativen Eingriffes erfolgte das Monitoring der Tiere, wobei Sauerstoff-, Lachgas- und Isoflurankonzentration kontrolliert wurden. Das Herz-Kreislauf-Monitoring wurde mittels eines EKG-Gerätes (Cardiofax V, Nihon Kohden, Bad Homburg, Germany) durchgeführt. Als perioperative Antibiose erhielten die Tiere 3,3 ml Lincomycin (Lincomycin 20 %, WDT, Garbsen, Germany).

2.2.2 Operationsdurchführung: Defekterstellung

Präoperativ fand die Rasur und Desinfektion der Versuchsschweine unter Zuhilfenahme von Skinsept® G (Henkel-Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf) statt. Jedem Versuchsschwein wurde die rechte mediale Tibia rasiert. Den Versuchstieren der PRP-Gruppe wurde zusätzlich der Hals- und Brustbereich rasiert, da bei diesen zur Blutabnahme für die PRP-Herstellung ein Katheter in die V. jugularis gelegt wurde.

Zur Herstellung des Defektes an der Tibia wurde medial an der rechten proximalen Tibia ein 10 cm langer Hautschnitt gesetzt, wonach 10 mm distal des Plateaus und 12 mm ventral der Tibiakante mittels einer Hohlfräse (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) ein Defekt von 11 mm Durchmesser und 25 mm Tiefe ohne Penetration der lateralen Kortikalis gesetzt wurde. Dieser Defekt wurde in Anlehnung an das Defektmodell nach Wheeler et al. [45] als einen Defekt kritischer Größe definiert. Ein solcher Defekt liegt vor, falls die vorliegende Defektgröße eine Heilung während der Lebenszeit eines Lebewesens ohne Therapie nicht erlaubt [46]. Auf eine Stabilisierung der Tibia im Sinne einer Osteosynthese konnte bei der erwähnten Defektgröße und -form verzichtet werden.

Bei den von mir untersuchten Tieren wurde der so hergestellte zylinderartige Defekt auf zwei verschiedene Arten aufgefüllt:

Gruppe a) mit Calciumphosphatgranulat

Gruppe b) mit Calciumphosphatgranulat in Kombination mit PRP

Somit erfolgte bei 8 Versuchsschweinen die Defektauffüllung mit reinen Calciumphosphatgranulaten (Calcibon® Granules, Biomet Orthopaedics Switzerland GmbH). Bei weiteren 8 Versuchsschweinen wurden die Defekte mit Calciumphosphatgranulaten in Kombination mit PRP behandelt. Entsprechend wurden die Tiere in die jeweilige Gruppe randomisiert.

Im Anschluss an die Defektauffüllung erfolgte der schichtweise Wundverschluss.

2.2.3 Therapie des zugeführten Defekts

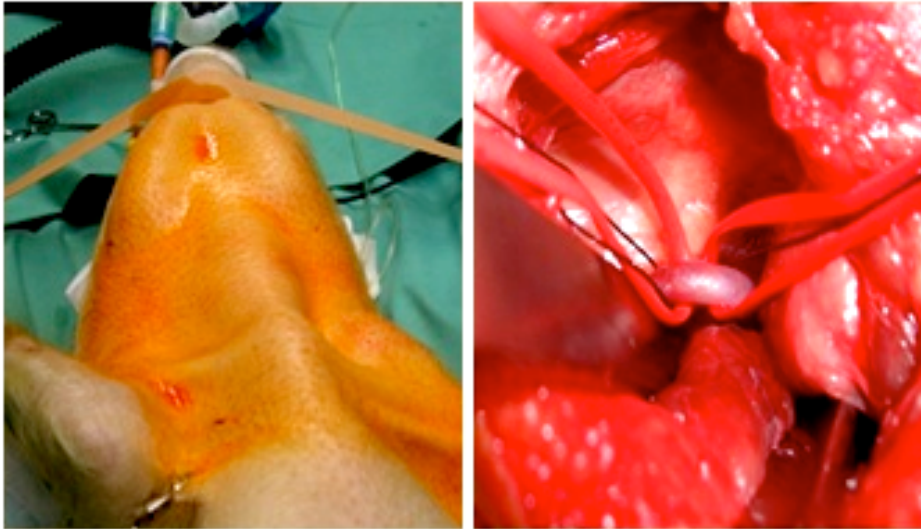
Bei den Tieren der Gruppe a (mit Calciumphosphatgranulat) erfolgte die Defektauffüllung mit reinen Calciumphosphatgranulaten (Calcibon® Granules, Biomet Orthopaedics Switzerland GmbH, CH-3216 Ried b. Kerzers). Dies sind synthetisch hergestellte biogradierbare Calcium- und Phosphatsalze, die zur Mineralisierung von spongiosen Knochendefekten beitragen.

Bei den Tieren der Gruppe b (mit Calciumphosphatgranulat in Kombination mit PRP) wurde der Defekt mit Calciumphosphatgranulaten in Kombination mit fertig hergestelltem PRP aufgefüllt.

Zur Herstellung von PRP musste von jedem Tier 120 ml Blut gewonnen werden. Zwecks Blutgewinnung wurde die V. jugularis freigelegt. Hierfür wurde über einen paramedianen Halsschnitt die Vene dargestellt. Danach wurde die Vene punktiert und katheterisiert. Im Anschluss wurden zwei 60 ml-Spritzen, in die vorher jeweils 6 ml Citratlösung aufgezogen wurde, auf den Katheter aufgesetzt und mit Blut aufgefüllt (Abb. 4).

Zur Anreicherung der Wachstumsfaktoren wurde das Gravitational-Platelet-System (GPS) eingesetzt. Benötigt wurde hierfür pro Tier eine „GPS II Double Unit“ (Biomet Biologics, Warsaw, IN USA).

Abb. 4: Darstellung der V. jugularis sowie Punktion und Katheterisierung



Zusätzlich wurden zur Herstellung des autologen Thrombins zwei Vakuumröhrchen mit je 7 ml Blut gefüllt.

Das Blut-Citrat-Gemisch wurde aus den 60 ml in jeweils einen GPS-Behälter eingefüllt. Dann wurden die GPS-Bojensysteme in die Zentrifuge eingesetzt und 15 min lang mit einer Drehzahl von 3200 U/min zentrifugiert.

Nach Beendigung der Zentrifugation wurden aus den GPS-Behältern das Platelet-poor Plasma (PPP) mit jeweils einer 30 ml-Spritze entnommen. Dazu wurden die GPS-Behälter um 180 Grad gedreht. Anschließend wurden die Behälter wieder in aufrechter Position gehalten und das Platelet-rich Plasma (PRP) mit 10 ml-Spritzen entnommen (Abb. 5).

Abb. 5: Gewinnung von PPP und PRP



Gleichzeitig wurden die Vakuumröhrchen für die Thrombin-Produktion für eine Dauer von 2,5 min mit einer Drehzahl von 3200 U/min zentrifugiert. Hiernach wurde aus den zentrifugierten Vakuumröhrchen der gelbliche Überstand jeweils mit 10 ml-Spritzen abgezogen.

Anschließend wurde das autologe Thrombin mit 2 ml Calciumchlorid aktiviert. Das aktivierte Thrombin wird zur Aktivierung der Thrombozyten und damit zur Wachstumsfaktorenfreisetzung benötigt.

2.2.4 Intraoperative Blutentnahme

Zusätzlich zu den Blutentnahmen für die Gewinnung von PRP wurde aus dem selbigen Katheter bei den Tieren der PRP-Gruppe Blut zur Bestimmung von Thrombozytenzahl und Wachstumsfaktoren entnommen. Verwendung fanden hierbei Röhrchen für Serum, Citrat-Plasma und EDTA-Plasma. Die Thrombozytenzahl wurde mittels eines Analysegeräts der Firma Scilvet (scil vet abc, scil animal care company GmbH, Viernheim, Germany) ermittelt (Abb. 6). Zusätzlich wurde an diesem Gerät die Thrombozytenzahl im PRP bestimmt. Die quantitative Analyse der Wachstumsfaktoren erfolgte mit Hilfe der Elisa- (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Abb. 6: Analysegerät zur Bestimmung der Thrombozytenzahl



2.2.5 Postoperative Versorgung

Postoperativ war den Tieren eine Vollbelastung der operierten Extremität möglich. Zur Entzündungshemmung erhielten die Versuchsschweine postoperativ drei Tage lang Carprofen (Rimadyl 20 mg Tabletten, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Germany) und als Antibiose Lincomycin-Tabletten (Linco-Tabs, CP Pharma Burgdorf, Germany) peroral. Die Euthanasie der Tiere fand sechs Wochen nach der Operation statt.

2.2.6 Euthanasie der Tiere und Entnahme der proximalen Tibia

Zur Euthanasie der Tiere wurde eine Barbituratüberdosis (Eutha 77, Essex Pharma GmbH, München, Germany) intravenös verabreicht.

Nach der Euthanasie erfolgte die Exartikulation des Kniegelenkes. Auf Schaftmitte wurde nun die Tibia mit einer elektrischen Säge (Aesculap Oscillant, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) durchtrennt. Der entnommene proximale Tibiaanteil wurde mit Hilfe einer Bandsäge (MBS 220/E, Proxxon GmbH, Niersbach, Germany) auf die Defektzone verkleinert. Anschließend wurde das Tibiaresektat in 10 % gepufferte Formalinlösung eingelegt und bei 4 °C für mindestens 14 Tage gekühlt.

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Bei jedem Versuchstier wurden sowohl im Plasma bzw. Serum als auch im PRP die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- β 1, BMP-2, BMP-7 und PDGF bestimmt. Für diese quantitative Analyse wurde die sehr sensitive Elisa-Technik angewandt.

Diese Methode basiert auf dem Antikörper-Sandwich-Prinzip. Dabei werden Mikrotiterplatten verwendet, die mit Antikörpern beschichtet sind. Diese Antikörper sind gegen die zu bestimmende Substanz gerichtet. Nach Zugabe der Probe wird die Substanz von den Antikörpern gebunden. Die Platten werden nach erfolgter Inkubation ausgewaschen, um überschüssiges Untersuchungsmaterial und somit ungebundene Proteine zu entfernen. In einem nächsten Schritt werden nun enzymmarkierte Antikörper zugegeben, die gegen die gleiche Substanz wie die ersten Antikörper gerichtet sind. Durch erneute Waschvorgänge werden nochmals ungebundene Proteine entfernt und es folgt eine Beschichtung der Platten mit einem Substrat, welches wiederum mit den an den Antikörpern gebundenen Enzymen reagiert. Bei dieser Reaktion kommt es zur Bildung farbiger Produkte. Der Substratabbau wird durch Zugabe einer Säure gestoppt und die Extinktion wird photometrisch erfasst. Die Absorption ist hierbei der Konzentration der zu bestimmenden Substanz direkt proportional.

2.3.1 Materialien und Geräte

Die Konzentrationsbestimmung der Wachstumsfaktoren erfolgte mittels der Quantikine® Elisa-Kits der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN USA) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Elisa-Kit
VEGF	Quantikine® human VEGF Immunoassay
TGF-β1	Quantikine® porcine TGF-β1 Immunoassay
BMP-2	Quantikine® BMP-2 Immunoassay
BMP-7	Quantikine® human BMP-7 Immunoassay
PDGF	Quantikine® human PDGF Immunoassay

Im Labor wurden Reaktionsgefäße (Safe Lock Tubes 1,5 ml), Mehrkanalpipetten und Multipetten (Multipette® plus) der Firma Eppendorf (Hamburg, Germany) benutzt. Die Pipettenspitzen stammten vom Hersteller Starlab (Filter Tips, Starlab, Merenschwand, Schweiz).

Außerdem fand ein Schüttler (KS 250, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) und zur Extinktionsmessung ein Multilabel Reader der Firma Perkin Elmer (Victor³, Perkin Elmer, Waltham, MA USA) Verwendung.

2.3.2 Vorbereitung der Blutproben

Den Versuchstieren wurde während der OP Blut zur Wachstumsfaktorbestimmung abgenommen.

Die Röhrchen wurden nach der Blutentnahme 10 min bei 1880 x G und 4° C zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Das Serumröhrchen wurde vor der Zentrifugation 30 min bei Raumtemperatur belassen, damit eine vollständige Gerinnung stattfinden konnte. Das Serum und das Plasma konnten nach der Zentrifugation in Eppendorf Tubes abpipettiert und bei -20° C eingefroren werden.

2.3.3 Assay

Die Durchführung der Elisa-Assays zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Wachstumsfaktoren wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Alle Reagenzien stammten aus den Elisa-Kits der R&D Systems. Als Proben wurden Plasma und PRP bzw. bei der PDGF-Analyse an Stelle von Plasma Serum verwendet.

VEGF-Elisa

Zunächst musste eine Basislösung (stock solution) hergestellt werden. Hierfür wurde die VEGF-Standardlösung, die aus rekombinantem VEGF in Proteinpuffer besteht, mit 1 ml Calibrator Diluent RD6U (tierisches Serum) gelöst.

Mit 6 Reaktionsgefäßen, in die jeweils vorher 500 µl Calibrator Diluent RD6U gegeben wurde, und der Basislösung wurde eine Verdünnungsreihe pipettiert (1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml und 31.2 pg/ml). Die unverdünnte Standardlösung diente als höchster Standard (2000 pg/ml) und das tierische Serum RD6U als Null-Standard.

In die Vertiefungen der mit monoklonalen VEGF-Antikörper gecoateten Mikrotiterplatte wurden 100 µl Proteinpuffer sowie 200 µl des VEGF-Standards und Probematerial pipettiert. Die Platten wurden mit Folie bedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgten Waschvorgängen wurden in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten weitere 200 µl des VEGF-Konjugats pipettiert, wobei anschließend weitere Inkubation und Waschvorgänge folgten. Zur Induktion einer Farbreaktion wurden dann in den Vertiefungen Farbreagenzien (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) im gleichen Verhältnis beigemischt. Anschließend wurden die Platten 25 min unter lichtgeschützten Verhältnissen bei Raumtemperatur belassen. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem Photometer gemessen.

TGF- β 1-Elisa

Zu Beginn erfolgte die Aktivierung des im Plasma enthaltenen TGF- β 1. Dabei mussten zu 40 μ l Plasma 10 μ l 1 M HCl gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach der Inkubation wurde zur Probenneutralisation dem Gemisch 8 μ l 1,2 M NaOH/0,5 M HEPES-Puffer hinzugefügt. Danach erfolgte die Verdünnung der Proben mit 160 μ l Proteinpufferlösung (Calibrator Diluent RD5-53) im Verhältnis 1:5.

Nachdem in die mit im Kit befindlichen Standardlösung aus rekombinantem monoklonalem TGF- β 1 beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte je 50 μ l der Pufferlösung RD1-73 gegeben wurde, wurden zusätzlich 50 μ l der TGF- β 1-Standardreihe, der Kontrolllösung und der Plasmaproben beigemischt. Nach der Inkubation der Mikrotiterplatte über 2 Stunden unter Raumtemperatur erfolgten die Waschvorgänge mit 400 μ l Waschpufferlösung. Danach wurden in den Vertiefungen 100 μ l Antikörper-Enzym-Konjugat pipettiert und es folgten weitere 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur. Nach den wiederholten Waschvorgängen wurde zur Färbung der Platten in den Vertiefungen 100 μ l der Farbreagenzien (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) pipettiert, wonach die Platten weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm Wellenlänge photometrisch erfasst.

BMP-2-Elisa

Zur Durchführung dieses Elisas wurden 20 ml Calibrator Diluent RD5P, bestehend aus gepufferter Proteinbaselösung, unmittelbar vor Gebrauch mit 180 ml destilliertem Wasser versetzt, sodass insgesamt 200 ml Calibrator Diluent RD5P gewonnen wurde.

Der BMP-2-Standard (humanes, rekombinantes BMP-2) wurde ebenfalls mit 1 ml destilliertem Wasser vermischt, wodurch eine Basislösung von 20000 pg/ml hergestellt wurde.

Aus diesen beiden Komponenten konnte nun die erforderliche Verdünnungsreihe hergestellt werden. Dazu wurden 800 μ l Calibrator Diluent RD5P in ein Reaktionsgefäß gegeben. In weitere 6 Reaktionsgefäße wurden 500 μ l Calibrator

Diluent RD5P gegeben. Zusammen mit der Basislösung wurde eine Verdünnungsreihe pipettiert (4000 pg/ml, 2000pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml und 62.5 pg/ml).

Die 4000 pg/ml-Verdünnung diente dabei als höchster Standard und der Calibrator Diluent RD5P als Null-Standard.

In die mit murinem monoklonalem BMP-2-Antikörper beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden jeweils 100 µl Proteinbase (Assay Diluent RD1-19) pipettiert. Außerdem wurden jeweils 50 µl der Standardlösung sowie 50 µl des Probenmaterials hinzugefügt.

Nachdem die Platten mit Folie bedeckt wurden, wurden sie zur Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Hiernach folgten die Spülung und die Trocknung der Platten. Dann wurden je 200 µl BMP-2-Konjugat in die Plattenvertiefungen hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Platten zur weiteren Inkubation für die Dauer von 2 Stunden weiter geschüttelt.

Zur Färbung der Platten wurden in die Vertiefungen 200 µl der Farbreagenzien (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) pipettiert, wonach die Platten weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm Wellenlänge photometrisch erfasst.

BMP-7-Elisa

Zunächst wurde die Basislösung hergestellt. Dafür wurde die BMP-7-Standardlösung, die aus rekombinantem humanem BMP-7 in Proteinpuffer zusammengesetzt ist, mit 1 ml destilliertem Wasser gemischt, sodass eine Lösung von 20000 pg/ml entstand.

Außerdem wurden 5 ml Proteinbase Calibrator Diluent RD5P mit 5 ml destilliertem Wasser gemischt. 900 µl dieser 1:2 verdünnten Proteinbase wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben. In 6 weitere Reaktionsgefäße wurden 500 µl Proteinbase pipettiert.

Unter Zunahme der Basislösung wurde eine Verdünnungsreihe produziert (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml und 31.2 pg/ml).

Die 2000 pg/ml-Verdünnung diente als höchster Standard, während der Calibrator Diluent RD5P als Null-Standard galt.

Die weiteren Schritte bis zur photometrischen Erfassung verhielten sich wie bei BMP-7.

PDGF-Elisa

Zur Durchführung dieses Elisas wurden Serumproben verwendet. Vor Anwendung des Kits mussten die Serumproben 20fach verdünnt werden. Dazu wurden 20 µl der Serumprobe mit 380 µl Calibrator Diluent RD6-3 gemischt.

Der weitere Ablauf bis zur Messung der Absorption bei 450 nm mit einem Photometer gestaltete sich wie bei VEGF.

2.4 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Programms SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) wurden die ermittelten Daten statistisch ausgewertet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für jede Gruppe errechnet. Für den statistischen Vergleich der Gruppen kam der unverbundene t-Test zur Anwendung. Als signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 definiert.

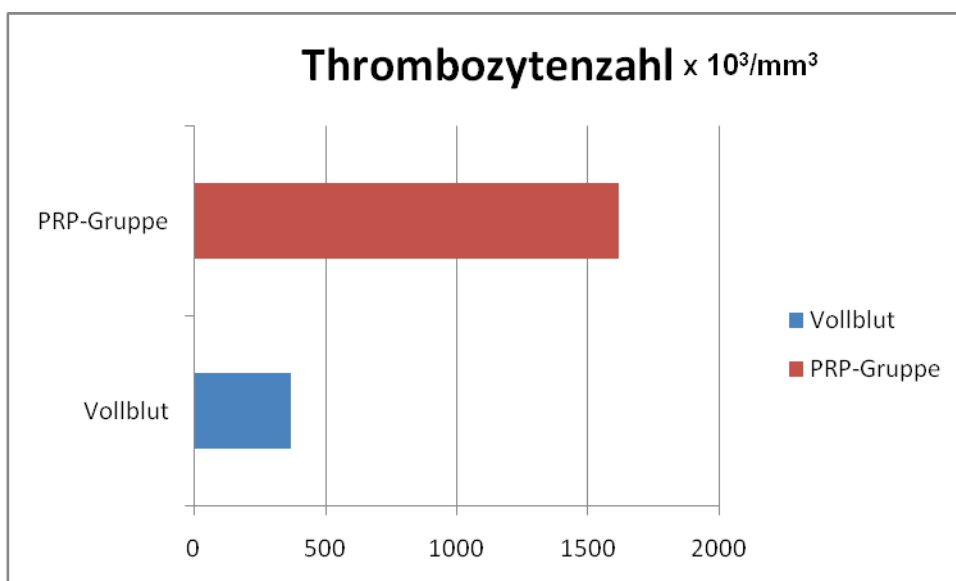
3 Ergebnisse

Das postoperative Ausheilen verlief bei allen Versuchstieren ereignislos. Es wurden keine Komplikationen wie allergische Reaktionen, Abszesse oder Infektionen für die Dauer der Versuchsdurchführung beobachtet.

3.1 Thrombozytenkonzentration im PRP

Die Plättchenkonzentration im Vollblut der Versuchstiere, welches unmittelbar vor der Operation abgenommen wurde, variierte interindividuell zwischen 198 und 511 $\times 10^3/\text{mm}^3$ Plättchen (Mittelwert = $369,8 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 91,6$). In den PRP-Proben wurden Plättchenkonzentrationen zwischen 995 und 2245 $\times 10^3/\text{mm}^3$ (Mittelwert = $1619,5 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 406,9$) nachgewiesen. Dies war signifikant höher als im Vollblut ($p = 0,01$). Im Schnitt konnte hierdurch im PRP ein 4,4-facher Konzentrationsanstieg der Thrombozyten erreicht werden (Abb. 9).

Abb. 7: Konzentration von Thrombozyten im Vollblut und PRP der Tiere der PRP-Gruppe (4,4-facher Konzentrationsanstieg im PRP, $p < 0,001$)

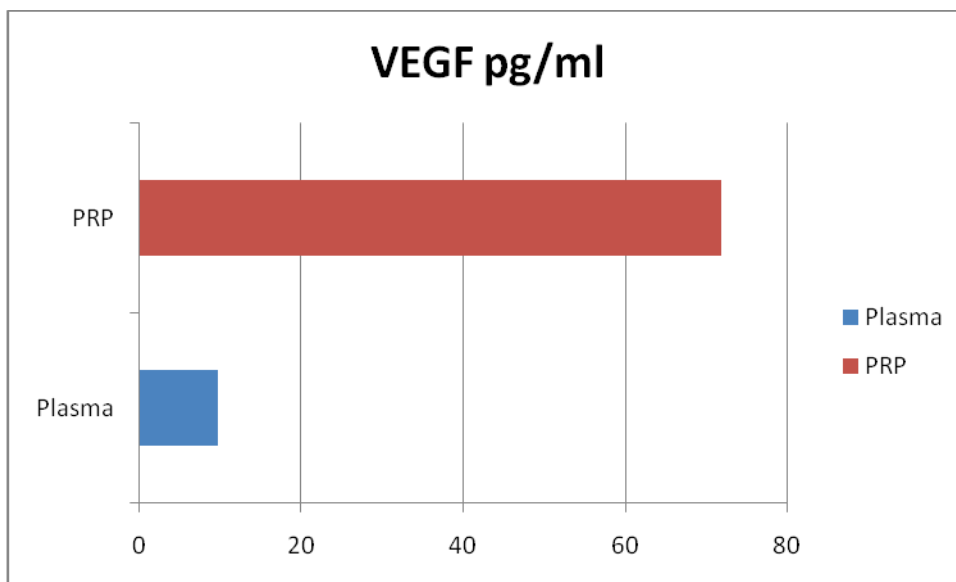


3.2 Wachstumsfaktorenkonzentration im PRP

Im Rahmen der Bestimmung von Wachstumsfaktoren im PRP verglichen mit Serum- bzw. mit Plasmaproben wurden folgende Wachstumsfaktoren analysiert: VEGF, TGF- β 1, BMP-2, BMP-7 sowie PDGF.

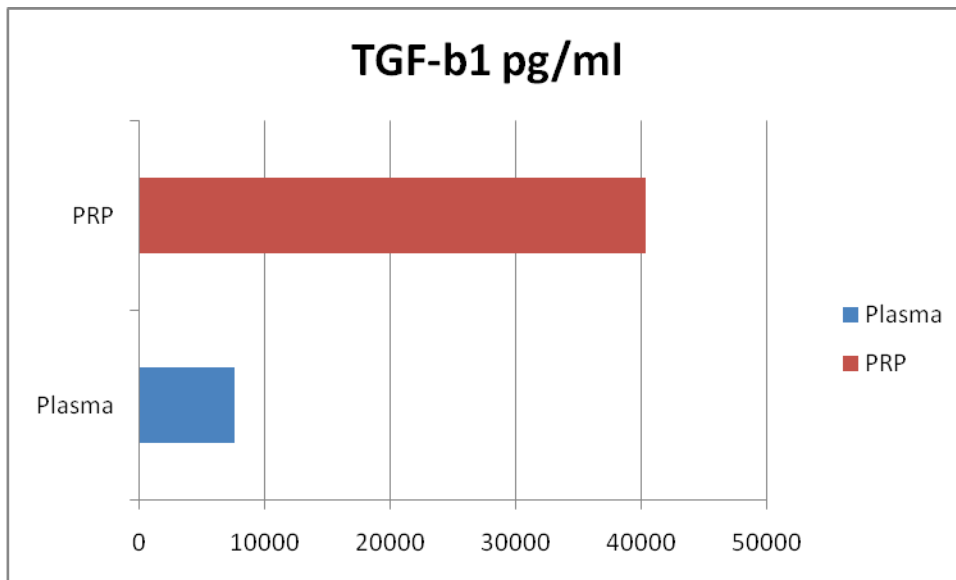
So konnte bei der Untersuchung von VEGF im PRP im Vergleich zu den Plasmaproben eine signifikant höhere Konzentration im PRP festgestellt werden ($p < 0,01$). Dabei war die VEGF-Konzentration im Plasma zwischen 9,1 und 13,2 pg/ml angesiedelt (Mittelwert = $9,63 \text{ pg/ml} \pm 1,26$) und im PRP zwischen 23,1 und 221,7 pg/ml (Mittelwert = $71,83 \text{ pg/ml} \pm 50,32$) (Abb. 10). Somit war die VEGF-Konzentration im PRP 7,48-fach höher als in den Plasmaproben.

Abb. 8: Konzentration von VEGF im Plasma und PRP der Tiere der PRP-Gruppe (7,48-facher Konzentrationsanstieg im PRP, $p < 0,001$)



Die Konzentrationen von TGF- β 1 im Vollblutplasma zeigten eine Bandbreite zwischen 2132,6 und 22157,9 pg/ml (Mittelwert = $7560,1 \pm 7279,3$) und im PRP zwischen 34668,5 und 46585,9 pg/ml (Mittelwert = $40340,7 \pm 5372,8$). Demzufolge wurde ein signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der TGF- β 1-Konzentration um das 5,3-fache verzeichnet (Abb.11).

Abb. 9: Konzentration von TGF- β 1 im Plasma und PRP der Tiere der PRP-Gruppe (5,3-facher Konzentrationsanstieg im PRP, $p < 0,001$)



Ähnlich verhielt es sich mit dem Konzentrationsanstieg von BMP-2 und BMP-7 beim Vergleich ihrer Konzentration in Plasmaproben bzw. im PRP. Dabei betrug die BMP-2 Konzentration im Plasma zwischen 11,1 und 16,2 pg/ml (Mittelwert = $11,7 \pm 1,57$) und im PRP zwischen 62,5 und 281,75 pg/ml (Mittelwert = $191,7 \pm 99,56$). Somit war die Konzentration von BMP-2 im PRP 16,3 höher als in den Plasmaproben ($p < 0,01$) (Abb.12).

Die Konzentration von BMP-7 in den Plasmaproben war zwischen 72,2 und 178,5 pg/ml (Mittelwert = $87,6 \pm 25,7$) und im PRP zwischen 84,1 und 432,9 pg/ml (Mittelwert = $139,7 \pm 90,17$). In diesem Fall konnte eine Konzentrationssteigerung

von 1,59-fach im PRP festgestellt werden. Somit war die Konzentration von BMP-7 im PRP signifikant höher als in den Plasmaproben ($p < 0,034$) (Abb. 13).

Abb. 10: Konzentration von BMP-2 im Plasma und PRP der Tiere der PRP-Gruppe (16,3-facher Konzentrationsanstieg im PRP, $p < 0,01$)

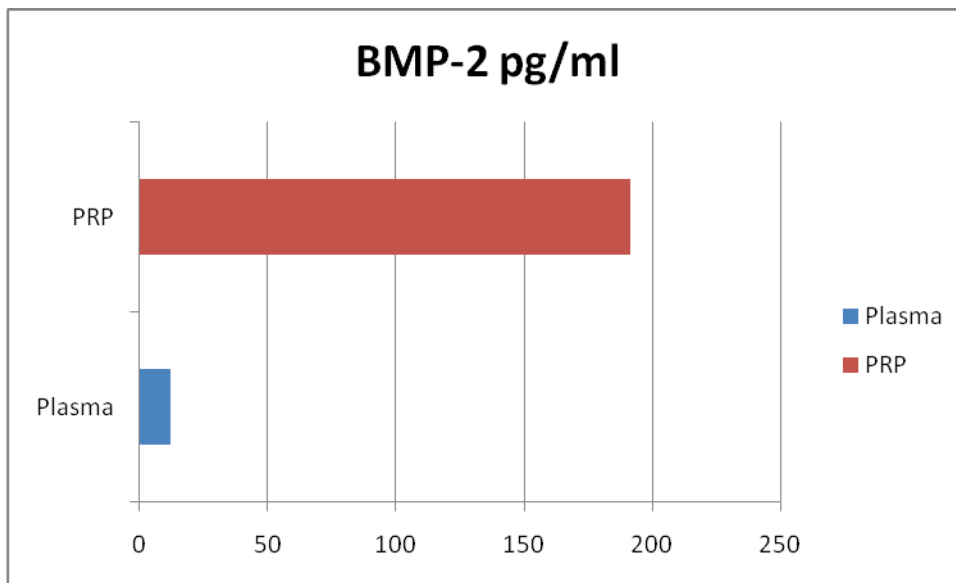
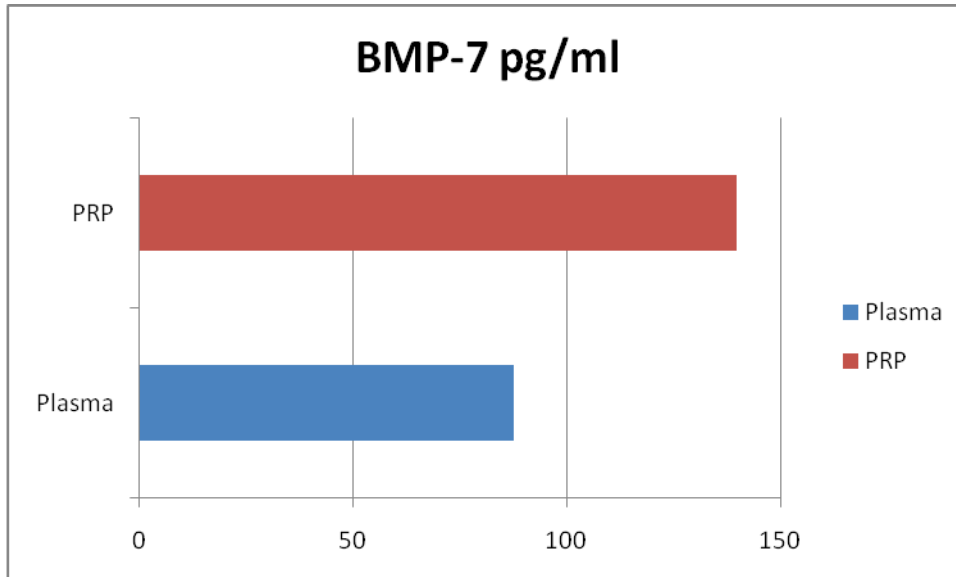
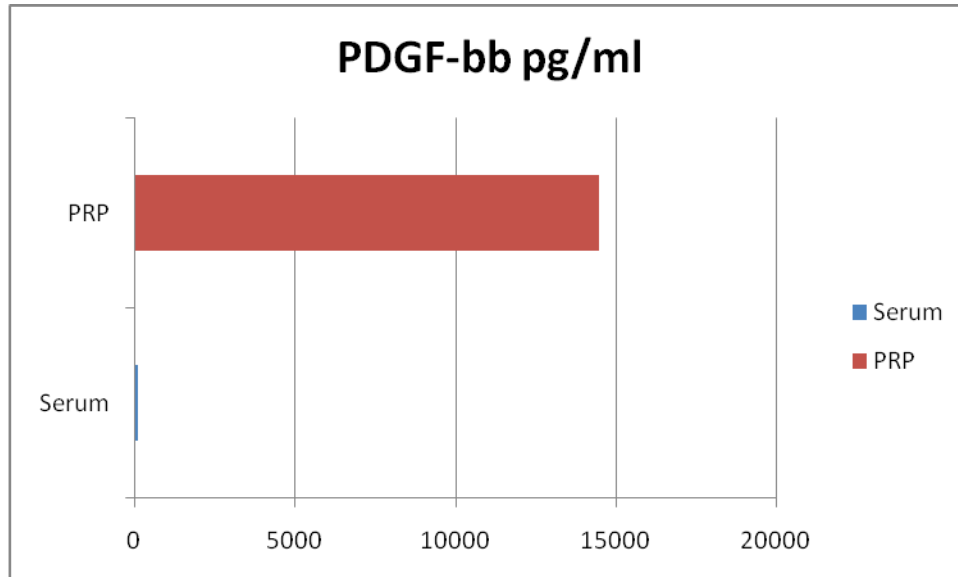


Abb. 11: Konzentration von BMP-7 im Plasma und PRP der Tiere der PRP-Gruppe (1,59-facher Konzentrationsanstieg im PRP, $p < 0,034$)



Die PDGF-Konzentration im Vollblutserum lag zwischen 15 und 535 pg/ml (Mittelwert = $131,9 \text{ pg/ml} \pm 182,9$); im PRP jedoch zwischen 8619 und 21486 pg/ml (Mittelwert = $14499,6 \text{ pg/ml} \pm 4879,8$). Die PDGF-Konzentration im PRP war somit um das 109,9-fache höher als im Vollblutserum ($p < 0,001$) (Abb. 14).

Abb. 12: Konzentration von PDGF Im Serum und PRP der Tiere der PRP-Gruppe (109,9-facher Konzentrationsanstieg im PRP, $p < 0,001$)



4 Diskussion

4.1 Übertragbarkeit auf den Menschen

Die bestmögliche Analogie hinsichtlich der Knochenregeneration ist essentiell, wenn es darum geht, Ergebnisse von Tierexperimenten auf Menschen zu übertragen. Deshalb wurden für diese Studie Mini-Pigs als Versuchstiere gewählt, da die Regenerationsrate neuen Knochens beim Schwein mit 1.2-1.5 mm/Tag nahezu identisch ist mit der Knochenheilungskapazität des Menschen [34].

Außerdem sind sie bezüglich der Plättchenzahl, Gerinnungsparameter und der Struktur langen Röhrenknochens dem Menschen sehr ähnlich [47], was im Rahmen dieser Studie bei der Wahl der Versuchstiere entscheidend gewesen ist, da unter anderem genau diese Parameter untersucht wurden und somit auf den Menschen übertragbar sein sollten.

Bei den Versuchsschweinen handelte es sich allerdings um junge Tiere. Somit wurde das Alter, welches eines der Risikofaktoren für die Pseudarthrose darstellt, vernachlässigt [48].

4.2 Bisheriger Forschungsstand

Die Ergebnisse der Studie von Jungbluth et al. [12] zeigten, dass PRP kombiniert mit CPG die Knochenheilung begünstigt. Nur in zwei Fällen der PRP-Gruppe zeigten die radiologischen Befunde bei der semiquantitativen Beurteilung der metaphysären Defekte nach sechs Wochen eine komplette knöcherne Überbrückung der Defektzone. In fünf Fällen dieser Gruppe hatte eine knöcherne Überbrückung zwar begonnen, war allerdings unvollständig. Nichtsdestotrotz erwies sich röntgenologisch in der PRP-Gruppe eine bessere knöcherne Überbrückung als in der Kontrollgruppe. Dies wird durch die histomorphometrische Untersuchung unterstützt. Hier konnte in der PRP-Gruppe eine signifikant stärkere

Knochenneubildung sowohl im zentralen als auch im kortikalen Defekt beobachtet werden.

Experimentelle sowie klinische Studien anderer Arbeitsgruppen zur Anwendung von PRP zeigen ebenfalls eine Beschleunigung der Knochenneubildung [22, 35, 38, 42, 49, 50].

Dallari et al. [38] untersuchten in ihrer klinischen Arbeit an 33 Patienten, die eine Tibiaosteotomie aufgrund eines Genu varum und einer Osteoarthritis erhielten und aufgrund dessen einen Knochendefekt größer 1 cm aufwiesen, die Anwendung von PRP in verschiedenen Kombinationen. Für PRP kombiniert mit Knochenmarkszellen und Knochentransplantat zeigten sie, dass PRP die osteogenetische Potenz des Transplantats steigern konnte.

In ihrer klinischen Studie konnten Marx et al. [22] an 88 Patienten mit mandibulären Knochendefekten von mindestens 5 cm Größe hervorgerufen durch benigne oder maligne Tumoren die Wirksamkeit von PRP auf die Knochenheilung erproben. Nachdem die Defekte unter Zusatz bzw. ohne PRP mit Knochen aus dem Beckenkamm aufgefüllt wurden, konnten sie demonstrieren, dass 6 Monate nach der Knocheneinpflanzung in der PRP-Gruppe die Knochendichte größer war als in der Kontrollgruppe.

Auch Gumieiro et al. [51] konnten für die Auffüllung von tibialen Knochendefekten der Wistar-Ratte mit PRP eine beschleunigte Knochenregeneration sowie größere Areale neuen Knochens nachweisen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PRP. Sie schrieben diese positiven Auswirkungen insbesondere dem im PRP enthaltenem PDGF zu, welches die Mitogenese von Osteoblasten und von Stammzellen aus dem Knochenmark hervorruft und die Angiogenese stimuliert, die für die zelluläre Ernährung und lokale Oxygenation erforderlich ist. Auch seien diese positiven Effekte auf TGF- β zurückzuführen, das durch Chemotaxis und Mitogenese von osteoblastären Präkursorzellen sowie durch Inhibition der Knochenresorption zur Knochenheilung beiträgt.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Simman et al. [52]. Sie wandten PRP zur Therapie von Frakturen am Rattenfemur an und konnten ebenso einen schnelleren Heilungsprozess durch PRP als ohne PRP verzeichnen. Allerdings ist anzumerken, dass Simman et al. Untersuchungen am Kleintiermodell durchgeführt haben und somit keine Aussage zum lasttragenden Knochen getroffen werden kann. Außerdem führten sie keine Untersuchung der im PRP enthaltenen

Wachstumsfaktoren durch. Somit können bei dieser Studie nur eingeschränkte Aussagen zur Qualität des PRPs getroffen werden.

Fuerst et al. [50] wandten aus PRP gewonnene Wachstumsfaktoren in ihrer experimentellen Arbeit an 8 Mini-Pigs an. Sie setzten 2 Implantate pro Versuchstier in die Mandibula, jeweils mit und ohne Wachstumsfaktoren. Die Tiere wurden nach 4 und 8 Wochen euthanisiert und die Knochenproben histomorphometrisch untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Anwendung von Wachstumsfaktoren eine bessere Implantatintegration und -einheilung sowie eine stärkere Verankerung des Implantats in das Knochenlager gewährleistet.

Auch Ergebnisse aus In-vitro-Versuchen unterstreichen den möglichen Einfluss von PRP auf die Knochenheilung. Graziani et al. [49] konnten in ihrem In-vitro-Versuch nachweisen, dass es unter Anwendung von PRP zur Stimulation der Osteoblasten- und Fibroblastenproliferation kommt. Außerdem verzeichneten sie gesteigerte Konzentrationen des Wachstumsfaktors TGF- β , was sie wiederum auf das PRP zurückführen.

Der positive Effekt von PRP scheint insbesondere in der frühen Phase der Knochenheilung eine Rolle zu spielen [51, 53, 54].

In ihrer klinischen Untersuchung setzten Kitoh et al. [55] PRP in Kombination mit Stammzellkonzentrat aus dem Knochenmark bei Patienten mit Längendifferenzen der unteren Extremität ein. Der Zusatz von PRP zum Stammzellkonzentrat im Rahmen der Distaktionsosteogenese verkürzte den Heilungsprozess und reduzierte außerdem assoziierte Komplikationen. Somit waren auch sie im Stande, einen positiven Effekt von PRP auf den Prozess der Knochenheilung zu belegen.

Fennis et al. [53] wandten in ihrer tierexperimentellen Studie an 28 Ziegen mit mandibulären Knochendefekten, die mit Knochentransplantat überbrückt wurden, bei 14 Tieren PRP an. Nach Euthanasie der Tiere konnten sie anhand histologischer und histomorphometrischer Untersuchungen zeigen, dass in der PRP-Gruppe eine gesteigerte Knochenregeneration vorzufinden war verglichen mit der Kontrollgruppe.

Trotz dieser positiven Ergebnisse ist der Erfolg von PRP in Kombination mit synthetischen Biomaterialien ein kontrovers diskutiertes Thema [1, 41, 42, 54, 56-58]. Zunächst einmal scheint PRP nicht mit jedem Knochenersatzmittel einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration auszuüben [42]. Zweitens scheint der Typ und die Form des Knochenersatzmaterials, sowie Partikelgröße, Porengröße (Makro- oder Mikroporen), Oberflächeneigenschaften und die Resorptionsrate des Biomaterials eine wichtige Rolle zu spielen [1, 42, 57, 59].

Kasten et al. zeigten in ihrer experimentellen Studie an Mäusen, dass PRP kombiniert mit calciumdefizienten Hydroxylapatit-Keramiken (CDHA) zu einer stärkeren Induktion der Knochenheilung führt als in Kombination mit β -TCP, welches eine geringe spezifische Oberfläche besitzt [42, 57, 60]. Die Autoren nehmen an, dass die größere spezifische Oberfläche des CDHA eine intensivere und längere Resorption von PRP ermöglicht, während die raue Oberfläche eine stärkere Degranulation der α -Granula der Thrombozyten im PRP verursacht. Dies könnte eine stärkere Freisetzung von Wachstumsfaktoren zur Folge haben [42, 57, 60].

Rai et al. [56] konnten in ihrer Studie, in der sie Polycaprolacton-Tricalciumphosphat-Partikel (PLC-TCP) kombiniert mit PRP in einen Femurdefekt der Ratte implantierten, ein früheres und beschleunigtes Gefäßwachstum und eine verbesserte langfristige Funktionsintegrität im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PRP nachweisen. Die Honigwabenstruktur des PLC-TCP-Gerüsts mit zusätzlicher Unterstützung durch PRP scheint die Infiltration neuer Blutgefäße und die Formation neuen Knochens im Inneren des Gerüsts und nicht nur auf der äußeren Oberfläche zu ermöglichen [56].

Andererseits konnten Li et al. [58] keine verbesserte Knochenheilung in ihrem Tiermodell, in dem sie eine vordere spinale Fusion am Schwein mit β -TCP in Kombination mit PRP auffüllten, vorzeigen. Sie erklären diese Ergebnisse zum einen damit, dass bereits geringe Mengen an PRP gereicht haben, die β -TCP-Partikel zu sättigen und somit nur wenige Milliliter an PRP zum Einsatz kamen. Außerdem wurden keine quantitativen Untersuchungen hinsichtlich der im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren unternommen, sodass keine Aussagen zum Vorhandensein dieser Faktoren gemacht werden können. Zum anderen unterstreichen sie, dass die Gefäßinfiltration und Zellmigration bei vorderen

spinalen Fusionen erschwert ist verglichen mit hinteren spinalen Fusionen, was die Knochenheilung in diesem Modell negativ beeinflusst haben könnte.

Auch Wiltfang et al. [54] waren nicht in der Lage, einen positiven Effekt von β -TCP kombiniert mit PRP auf einen Defekt kritischer Größe des Os frontale beim Schwein nachzuweisen. Nur während der Anfangsphase der Knochenheilung konnte im Rahmen dieses Versuchsmodells für PRP ein positiver Einfluss auf die Knochregeneration gezeigt werden [54].

In ihrer tierexperimentellen Untersuchung, in der sie Knochendefekte der Kaninchenkalotte mit β -TCP + PRP auffüllten, beobachteten auch Tamura et al. [61] keinen signifikanten Einfluss von PRP auf die Knochenregeneration. Allerdings haben auch diese Autoren keine quantitativen Untersuchungen hinsichtlich des PRP durchgeführt, sodass auch hier keine Aussage zur Qualität des PRP bzw. zum Vorhandensein von Wachstumsfaktoren gemacht werden kann.

Plachokova et al. [41] applizierten Hydroxylapatit-Keramiken (HA) mit β -TCP Keramiken (Verhältnis 60 %/40 %) im PRP-Gemisch in einen kranialen Rattendefekt. Diese Autoren konnten ebenso keine positive Wirkung von PRP auf die Knochenheilung demonstrieren. Als mögliche Erklärung für dieses Ergebnis gaben sie an, dass das Ratten-PRP nur eine 3-fache Steigerung der Plättchenzahl erreichte im Vergleich zum Vollblut.

All diese Untersuchungen veranschaulichen, dass es keinen eindeutigen Konsens hinsichtlich der „idealen“ Eigenschaften synthetischer Knochenersatzmaterialien gibt.

Die erfolgreiche Wirkung von PRP kombiniert mit Calciumphosphatgranulaten in der Studie von Jungbluth et al. [12] könnte mit den spezifischen Materialeigenschaften der Granulate erklärt werden. Diese Granulate werden aus Calciumphosphatzementpuder synthetisiert, bestehen aus karbonatisiertem, calciumarmen, mikrokristallinem Calciumphosphat und weisen eine große Ähnlichkeit hinsichtlich chemischer und struktureller Eigenschaften zum mineralischen Anteil humanem Knochen auf [62]. Auch in Bezug auf ihre Degradation sind sie menschlichem Knochen ähnlich. Ihre Resorption findet durch in den Remodeling-Lakunen befindliche Osteoklasten statt [63]. Die Resorptionsrate ist dabei nahezu identisch mit der Formationsrate neuen

Knochens [64]. Dies ermöglicht neuem Knochen, mit Ersatzmaterial aufgefüllte Areale zu infiltrieren, sobald das Ersatzmaterial in diesen Arealen biodegradiert und resorbiert wird.

Darüber hinaus besitzen sie ein untereinander verbundenes Netzwerk aus Mikro- und Makroporen, für die gezeigt wurde, dass sie für das Einwandern von Zellen und Einwachsen des Knochens in das Ersatzmaterial notwendig sind [65]. Außerdem ermöglichen die Mikroporen die Versorgung der beteiligten Zellen. Laut Böhner und Baumgart läuft die in vivo-Resorption poröser Granulate sehr viel schneller ab als in dichten Blöcken oder prismatischen Objekten hergestellt aus demselben Material [66].

Des Weiteren konnten Tas et al. [62] zeigen, dass Calciumphosphatgranulate im Stande sind, nahezu vollständig Zitratblut und flüssiges PRP bereits vor der Auffüllung des Defekts zu absorbieren, was sich durch eine starke Resorptionsfähigkeit der Granulate begründet. Dies könnte den positiven Einfluss des PRP auf die Knochenregeneration in dieser Studie erklären.

Abgesehen davon wurden sowohl kontinuierliches Einwachsen auf der Oberfläche als auch diskontinuierliches Einwachsen mit Knocheninseln durchgehend im Inneren des Granulatgerüsts nur in der PRP-Gruppe beobachtet, was die aktuelle Literatur bekräftigt, in der es heißt, dass Granulate mit ähnlich großen Poren und porösen Wänden diese beiden Arten von Knochenwachstum zur Folge haben [56, 67]. Auch hier machten die spezifischen Materialeigenschaften und die Struktur der Calciumphosphatgranulate mit einer Porengröße von 50-500 µm und einer hohen Porosität von 50% die Infiltration neuen Knochens in die Tiefe möglich und dies nicht nur auf der äußeren Oberfläche des Materials.

Darüber hinaus sind Biomaterialien auf Calcium-Phosphatbasis in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren. Aus den Granulaten werden nämlich nach ihrer Biodegradation und Resorption Calcium-Ionen freigesetzt, welche wiederum zur Plättchenaktivierung und somit zur Abgabe von Wachstumsfaktoren führen [68].

4.3 PRP-Herstellungsverfahren und Thrombozytenkonzentration

Ein weiterer essentieller Parameter bezüglich der PRP-Leistung ist seine Zubereitungsmethode, da dies einen signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenkonzentration und die Konzentration der freigesetzten Wachstumsfaktoren haben kann [69].

Die erforderliche Thrombozytenkonzentration, um einen positiven PRP-Effekt auf die Knochenheilung zu erzielen, scheint innerhalb eines schmalen Bereiches zu liegen. 3- bis 5-fach größere Plättchenkonzentrationen als im Vollblut scheinen die Knochenregeneration zu stimulieren [22, 69].

Laut Marx ist erst ein PRP mit einer Plättchenkonzentration von 1.000.000/ μ l als therapeutisch wirksam zu bezeichnen [70]. Unterhalb dieser Konzentration ist der Effekt des PRP suboptimal und paradoxer Weise hat eine höhere Konzentration eine inhibierende Wirkung auf die Knochenregeneration [69, 71]. Außerdem korrelieren höhere Thrombozytenkonzentrationen nicht notwendigerweise mit höheren Wachstumsfaktorkonzentrationen [72].

Die Methode, die im Rahmen meiner Dissertationsarbeit zur PRP-Herstellung angewandt wurde, ermöglichte es, eine im Durchschnitt 4,4-fach höhere Plättchenkonzentration im PRP als im Vollblut zu erzielen. Diese Konzentration liegt in dem Bereich, in dem eine stimulierende Wirkung auf die Knochenregeneration beobachtet werden kann und erklärt den positiven PRP-Effekt.

Ferner beeinflussen sowohl die Zentrifugationszeit als auch die Anzahl der Umdrehungen pro Minute die Höhe der erzielten Thrombozytenkonzentration [73, 74]. Zentrifugationen unter einer Zeit von 5 min führen nämlich zu keiner signifikanten Plättchenanreicherung [73].

Im Rahmen meiner Untersuchungen wurde das autologe Vollblut 15 min lang bei einer Drehzahl von 3200 U/min zentrifugiert. Diese Zentrifugationszeit scheint einen effektiven Einfluss auf das erzielte Ergebnis im Rahmen der Knochenneubildung gehabt zu haben. Auch eine Geschwindigkeit von 3200 U/min scheint einer vorzeitigen Aktivierung der Plättchen durch mechanische Kräfte und somit einer zu frühen Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den α -Granula entgegen gewirkt zu haben.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass das Blut zur PRP-Herstellung vor dem operativen Eingriff abgenommen wurde. Laut Pietrzak und Eppley [28] ist das für die gewonnene Thrombozytenzahl von entscheidender Bedeutung, da bereits die operative Intervention zur Plättchenaktivierung und somit zur Anreicherung der Thrombozyten im Interventionsgebiet führt. Folglich kommt es zur Abnahme der Thrombozyten im Vollblut [28]. Auch diese Tatsache könnte die starke Anreicherung von Plättchen im PRP im Rahmen vorliegender Arbeit erklären.

Ein weiterer positiver Einfluss ist der angewandten Antikoagulationslösung zuzuschreiben. Hier wurde Citrat-Dextrose zu diesem Zweck eingesetzt, für das eine bessere Wirkung im Rahmen der PRP-Präparation als Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschrieben wurde [75]. Dabei wird die Gerinnung durch das Citrat, welches Calcium-Ionen bindet, verhindert, während Dextrose in den Stoffwechsel der Plättchen eingeschleust wird. Ferner schützt Citrat-Dextrose während der Zentrifugation die Plättchenmembran und verhindert somit eine Thrombozytenschädigung [28].

Für EDTA dagegen wurde gezeigt, dass es unter seiner Anwendung zur Schädigung der Thrombozyten gekommen war [73]. Auch diese schützende Wirkung der Citrat-Dextrose scheint für die positive Wirkung des PRP verantwortlich zu sein.

Des Weiteren spielt die Art der PRP-Applikation in den Defekt eine entscheidende Rolle. Dabei wird durch den Einsatz eines Spray Applicators, der die zeitgleiche Dosierung von PRP und Thrombin als potenten Plättchenaktivator in einem Verhältnis von 10:1 ermöglicht, die Applikation optimiert [76],[77]. Dementsprechend gelangt PRP unmittelbar nach seiner Aktivierung in den Defekt und es kommt erst im Defekt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den α -Granula. Somit kann ein Verlust wichtiger Wachstumsfaktoren durch zu frühzeitige Aktivierung noch vor Defektauffüllung vermieden werden.

Außerdem konnte für Thrombin gezeigt werden, dass es eine signifikant höhere Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, TGF- β 1, BMP-2, BMP-7 sowie PDGF herbeiführt verglichen mit anderen Thrombozytenaktivatoren [78, 79].

Diese verstärkte Mediatorenfreisetzung kombiniert mit der zeitgleichen Applikation von PRP und Thrombin könnte eine weitere Erklärung für den positiven Effekt des PRP auf die Knochenheilung in der Studie von Jungbluth et al. [12] gewesen sein.

Ein weiteres günstiges Charakteristikum des in meiner Untersuchung angewandten Thrombins lag darin, dass es autologer Herkunft gewesen ist. Durch Anwendung patienteneigenem Thrombins konnten Blutungskomplikationen, Bildung von Antikörpern oder anaphylaktische Reaktionen, wie sie unter Verwendung von xenogenem Thrombin auftreten, vermieden werden [80-82].

4.4 Wachstumsfaktoren

Durch das in meinen Untersuchungen eingesetzte PRP-Herstellungsverfahren konnte eine signifikant höhere Konzentration aller gemessenen Wachstumsfaktoren festgestellt werden. Dabei stieg die Konzentration von VEGF um das 9,63-fache, die von TGF- β um das 5,3-fache, die von BMP-2 um das 16,3-fache und die von BMP-7 um das 1,59-fache im Vergleich zum Blutplasma. Die Konzentration von PDGF stieg um das 109,9-fache im Vergleich zum Blutserum.

Die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren fördern die Knochenformation, indem sie intakte Zellen, vor allem Progenitorzellen und Osteoklasten, aus dem die Defektzone umgebenden Gewebe anlocken [22, 42].

Für PDGF wurde eine mitogene Wirkung auf Osteoblasten [83, 84] und ein stimulierender Effekt auf mesenchymale Progenitorzellen gezeigt [85]. TGF- β hat ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf die Knochenformation und hemmt die Knochenresorption [86].

Auch Marx et al. [22, 70] messen insbesondere diesen beiden Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der Knochenheilung zu. PDGF scheint unter den Wachstumsfaktoren der erste in einer Wunde anwesende Faktor zu sein, da er direkt bei Gewebsschädigung aus den Thrombozyten freigesetzt wird [22].

Liebermann et al. [84] unterstreichen ebenso die Rolle des PDGF während der frühen Frakturheilung.

Marx et al. erklären, dass PDGF seine Wirkung über Rezeptoren an Membranen der Zielzellen entfaltet, wodurch eine Kaskade von Reaktionen innerhalb der Zielzellen ausgelöst wird [22]. Schließlich kommt es zur Mitogenese weiterer Zellen, zur Angiogenese und Makrophagenaktivierung, weshalb Marx PDGF auch als Initiator der Wund- und der Knochenheilung bezeichnet [22].

Ebenso wird TGF- β von Thrombozyten, aber auch von Makrophagen abgegeben und aktiviert als parakriner Faktor vor allem Fibroblasten, Knochenmarksstammzellen und Präosteoblasten. Diese wiederum sind im Stande, eigenes TGF- β zu synthetisieren und freizusetzen, was zur Folge hat, dass die Knochenheilung für längere Dauer aufrecht erhalten werden kann [22, 32]. Schließlich ruft TGF- β die Chemotaxis und Mitogenese osteoblastärer Präkursorzellen hervor und Inhibiert Osteoklasten und somit die Knochenresorption, weshalb TGF- β im Rahmen des Knochenremodeling eine besondere Rolle zu spielen scheint [22]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl Chondrozyten als auch Osteoblasten reich an Rezeptoren für TGF- β sind, was unterstreicht, dass dieser Faktor während jeder Phase der Knochenheilung effektiv zum Einsatz kommt [84].

Dem Wachstumsfaktor VEGF, welches ebenso in den α -Granula der Thrombozyten enthalten ist und im Rahmen dieser Arbeit signifikant angereichert werden konnte, wird vor allem eine angiogenetische Wirkung zugeschrieben [32]. Ferner begünstigt es die Heilung chronischer Wunden und unterstützt die enchondrale Ossifikation [32]. Die signifikante Anreicherung von VEGF im Rahmen meiner Arbeit könnte durch angiogenetische Effekte und somit Gewährleistung einer ausreichenden Durchblutung und Ernährung des Transplantatlagers die starke knöcherne Durchbauung in der Studie von Jungbluth et al. [12] erklären.

Weitere im Knochenheilungsprozess agierende Faktoren sind BMP-2 und -7, welche die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu osteochondroblastären Zellen stimulieren und somit eine entscheidende Rolle im Rahmen von Zellwachstum und Knochenformation spielen sowie auf diese Weise das Wachstum neuen Knochens induzieren [84].

Auch bei diesen Wachstumsfaktoren konnte in meinen Untersuchungen ein signifikanter Anstieg im PRP als im Plasma verzeichnet werden, was wiederum die stärker ausgeprägte Knochenregeneration und starke Infiltration des Transplantatlagers mit neu gebildetem Knochen in der Studie von Jungbluth et al. [12] erklärt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Wachstumsfaktoren die Knochenregeneration primär via Chemotaxis und via mitogener Effekte auf Präosteoblasten und osteoblastische Zellen unterstützen [1]. Der signifikante

Anstieg der zuvor beschriebenen Wachstumsfaktoren durch die in meiner Untersuchung eingesetzte PRP-Herstellungsmethode könnte einen essentiellen Einfluss auf den positiven PRP-Effekt gehabt haben. Hingegen kann der Mangel an quantitativen Messmethoden für Wachstumsfaktoren eine mögliche Erklärung für den begrenzten Erfolg von PRP in anderen Studien sein.

4.5 Resorptionsrate der Calciumphosphatgranulate

Eine andere Größe, die die Knochenformation beeinflussen kann, ist die Resorptionsrate des Granulatgerüsts. Wenn das Granulat schnell resorbiert wird, entsteht mehr Raum für neuen Knochen [42]. Biomaterialien, die schneller resorbiert werden, können eine schnelle Wiederherstellung von langen Röhrenknochen hervorrufen [56]. Wird es allerdings zu schnell resorbiert, kann eine inflammatorische Reaktion auftreten, die die biochemische Stabilität herabsetzten kann [42]. Einen Konsens über die optimale Resorptionsrate für die Knochenregeneration gibt es aber immer noch nicht [42].

Die histomorphometrischen Messungen in der Studie von Jungbluth et al. [12] demonstrieren eine signifikant höhere Resorptionsrate der Granulate in der PRP-Gruppe. Grund dafür kann die besondere Wirkung der Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- β sein, die durch die eingesetzte PRP-Herstellungsmethode in meiner Untersuchung in signifikant höherer Konzentration im PRP nachweisbar waren als im Blutplasma bzw. im Blutserum.

Die Eigenschaften von PDGF als Stimulator von mesenchymalen Progenitorzellen sowie ihre mitogene Wirkung auf die Osteoblasten einerseits, und die stimulierende Wirkung von TGF- β auf die Knochenformation und die Hemmung der Knochenresorption andererseits, können sowohl eine Erklärung für die verbesserte Knochenneubildung, als auch eine Begründung für die optimierte Resorption von Calciumphosphat-Granulaten unter dem Einsatz des in meiner Dissertationsarbeit hergestellten PRPs in der Studie von Jungbluth et al. [12] sein. In der Studie von Jungbluth et al. [12] führten die Granulate zu keiner inflammatorischen Reaktion. Die Formation neuen Knochens in an die Defektzone angrenzenden Arealen war stärker ausgeprägt. Dies unterstreicht die Tatsache,

dass intakte Zellen des umliegenden Gewebes unerlässlich sind für eine biologische Antwort auf die Wachstumsfaktoren aus dem PRP.

4.6 Defektlokalisation

Der etablierte Defekt unserer Arbeitsgruppe war ein metaphysärer Defekt am langen Röhrenknochen. Diese Defekte zeichnen sich durch eine bessere Vaskularisation und ein größeres regeneratives Potential als diaphysäre Defekte aus [1, 42]. Deswegen, um die Wirksamkeit des PRP in der Behandlung von Defekten kritischer Größe in diaphysären Bereichen belasteter langer Röhrenknochen zu klären, sollten weitere Studien mit dem Zweck einer kombinierten Anwendung von PRP und Knochenersatzmaterial durchgeführt werden.

4.7 Resümee

Die zusätzliche Anwendung von PRP in der in dieser Arbeit beschriebenen Herstellungsmethode scheint die Wirksamkeit des osteokonduktiven Calciumphosphatgranulats zu optimieren, was wiederum unterstreicht, dass Calciumphosphatgranulat ein für die Kombination mit PRP geeignetes Knochenersatzmittel repräsentiert. Diese von PRP verursachte Knocheninduktion geschieht unter einer optimalen PRP-Konzentration (4,4-fache), bei der die für die Knocheninduktion verantwortlichen Wachstumsfaktoren in signifikant höherer Konzentration im Vergleich zum Blutplasma bzw. Blutserum vorkommen. Hierbei ist insbesondere die 109,9-fache Konzentration von PDGF im PRP im Vergleich zum Blutserum zu erwähnen.

Die unter dem zusätzlichen Einsatz von PRP gesteigerte Resorptionsrate des Calciumphosphatgranulats in der Arbeit von Jungbluth et al. [12] kann ebenfalls in direktem Zusammenhang mit dem oben geschilderten Konzentrationsanstieg der Thrombozytenzahl im PRP sowie der erwähnten Wachstumsfaktoren gesehen werden. Dies ist im Rahmen der Knochenregeneration von entscheidender

DISKUSSION

Bedeutung, da eine schnelle Resorption des Biomaterials auch eine schnelle Wiederherstellung des Knochens ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung:

In der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. Hakimi konnte im Tiermodell an Mini-Pigs ein Defekt kritischer Größe entwickelt werden, welcher die Prüfung der Wirksamkeit von Calciumphosphatgranulat als Knochenersatzmittel isoliert oder in Kombination mit PRP an belasteten Knochenabschnitten ermöglichte. Das Ausmaß der Knochenneubildung, der Resorption der Calciumphosphatgranulate sowie der knöchernen Durchbauung sowohl in der Kortikalis als auch in der Spongiosa konnte in diesen beiden Versuchsgruppen vergleichend untersucht werden.

Dabei wurden von mir die Analyse von Blutproben, die Herstellung von PRP, die Bestimmung der Thrombozytenzahl im Vollblut sowie im PRP und die Bestimmung der Wachstumsfaktoren, die für die Knocheninduktion zu verantworten sind, sowohl im Blutplasma bzw. im Blutserum, als auch im PRP durchgeführt.

Methoden:

Die PRP-Herstellung wurde von mir unter dem Einsatz von Gravitational-Platelet-System (GPS II) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der Wachstumsfaktoren erfolgte mittels der Elisa-Technik.

Ergebnisse:

Die angewandte PRP-Herstellungsmethode ermöglichte in der PRP-Gruppe eine signifikant höhere Konzentration an Thrombozyten und der Wachstumsfaktoren VEGF, TGF- β 1, BMP-2, BMP-7 sowie PDGF verglichen mit den Konzentrationen im Vollblut, im Blutplasma bzw. im Blutserum. Es wurde eine im Schnitt 4,4-fach höhere Plättchenkonzentration im PRP gemessen. Ein Anstieg des VEGF um das

7,48-fache, des TGF- β 1 um das 5,3-fache, des BMP-2 um das 16,3-fache, des BMP-7 um das 1,59-fache und des PDGF um das 109,9-fache wurde erzielt.

Schlussfolgerungen:

Die im Rahmen meiner Dissertationsarbeit angewandte Methode zur Herstellung von PRP erzielt eine ideale Konzentration von Thrombozyten im PRP. Zu dem kann mittels dieses Verfahrens ein signifikanter Anstieg der Konzentration von Wachstumsfaktoren im PRP erreicht werden, der für die osteoinduktive Wirkung von PRP verantwortlich gemacht werden kann.

Dieses eingesetzte Herstellungsverfahren kann als Grund für die bessere Wirksamkeit von PRP in Kombination mit einem geeigneten Knochenersatzmaterial bezüglich der Knochenneubildung angesehen werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDHA	Calciumdefiziente Hydroxylapatit-Keramiken
cm	Zentimeter
CPG	Calciumphosphatgranulat
d	days/Tage
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
Elisa	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alteres
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Erdbeschleunigungskraft/Gravitationskraft
GPS	Gravitational-Platelet-System
HA	Hydroxylapatit-Keramiken
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHU	Heinrich-Heine-Universität
IGF	Insulin-like Growth Factor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molmasse
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
MMA	Methylmethacrylat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OP	Operation
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PF 4	Platelet Factor 4
pg	Pikogramm
PLC-TCP	Polycaprolacton-Tricalciumphosphat-Partikel
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPP	Platelet-poor Plasma
PRP	Platelet-rich Plasma

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

rh-BMP	Recombinant human Bone Morphogenetic Protein
ROI	Region of Interest
s	seconds/Sekunden
SIDEXIS XG	Sirona Dental X-ray Imaging System Next Generation
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
TGF	Transforming Growth Factor
U	Umdrehungen
V. jugularis	Vena jugularis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
µm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

1. Sarkar, M.R., et al., *Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1817-23.
2. Weber BG, C.O., *Pseudarthrosis: Pathophysiology, Biomechanics, Therapy, Results*. 1976, Bern: Huber.
3. Ruter, A. and E. Mayr, *[Pseudarthrosis]*. Chirurg, 1999. **70**(11): p. 1239-45.
4. Kaminski, A. and G. Muhr, *[Pseudarthrosen]*. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2008. **3**(1): p. 41-56.
5. Zimmermann, G., et al., *[Therapeutic outcome in tibial pseudarthrosis: bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) versus autologous bone grafting for tibial fractures]*. Unfallchirurg, 2007. **110**(11): p. 931-8.
6. Runkel, M. and P.M. Rommens, *[Pseudoarthrosis]*. Unfallchirurg, 2000. **103**(1): p. 51-63; quiz 63.
7. Kuner, E.H., H. Berwarth, and S.V. Lucke, *[Treatment principles in aseptic pseudarthrosis]*. Orthopade, 1996. **25**(5): p. 394-404.
8. Gandhi, A., et al., *The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery*. Foot Ankle Clin, 2005. **10**(4): p. 621-37, viii.
9. Rompe, J.D., et al., *[Extracorporeal shockwave treatment of delayed bone healing. A critical assessment]*. Unfallchirurg, 1997. **100**(10): p. 845-9.
10. Jubel, A., et al., *[Use of the injectable bone cement Norian SRS for tibial plateau fractures. Results of a prospective 30-month follow-up study]*. Orthopade, 2004. **33**(8): p. 919-27.
11. Schieker, M. and W. Mutschler, *[Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]*. Unfallchirurg, 2006. **109**(9): p. 715-32.
12. Jungbluth, P., et al., *Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs*. J Orthop Res. **28**(11): p. 1448-55.
13. Spies, C., et al., *[Animal study of the bone substitute material Ostim within osseous defects in Gottinger minipigs]*. Z Orthop Unfall, 2008. **146**(1): p. 64-9.

14. Matti, H., [*Über die Behandlung von Pseudarthrosen mit Spongiosatransplantation*]. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 1932. **31**(1): p. 218-231.
15. Decker, S., et al., [*Morphological results after an experimental transplantation of autogenous cancellous bone in dogs (author's transl)*]. Arch Orthop Unfallchir, 1976. **85**(3): p. 303-17.
16. Rehn, J. and W. Schramm, [*Animal experiments on the reaction of autologous transplantations of spongy and cortical substance into soft tissue by marking with tetracycline*]. Arch Orthop Unfallchir, 1970. **68**(3): p. 185-96.
17. Saur, K., L.T. Dambe, and L. Schweiberer, [*Experimental studies of autograft with cancellous bone in the diaphysis of long bone (author's transl)*]. Arch Orthop Trauma Surg, 1978. **92**(2-3): p. 211-9.
18. Rueger, J.M., [*Bone substitution materials. Current status and prospects*]. Orthopade, 1998. **27**(2): p. 72-9.
19. Siebert, H.R., K. Wagner, and J.M. Rueger, [*Biological value of various bone substitutes in the treatment of bone defects. Animal experiment studies*]. Unfallchirurgie, 1986. **12**(2): p. 98-100.
20. Friedlaender, G.E., et al., *Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A Suppl 1**(Pt 2): p. S151-8.
21. Govender, S., et al., *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A**(12): p. 2123-34.
22. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. **85**(6): p. 638-46.
23. Veillette, C.J. and M.D. McKee, *Growth factors--BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them?* Injury, 2007. **38 Suppl 1**: p. S38-48.
24. Wrotniak, M., T. Bielecki, and T.S. Gazdzik, *Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery*. Ortop Traumatol Rehabil, 2007. **9**(3): p. 227-38.

25. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(698): p. 893-9.
26. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
27. Zimmermann, G., et al., *[Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) in nonunions of long bones]*. Unfallchirurg, 2006. **109**(7): p. 528-37.
28. Pietrzak, W.S. and B.L. Eppley, *Platelet rich plasma: biology and new technology*. J Craniofac Surg, 2005. **16**(6): p. 1043-54.
29. Marx, R.E., *Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?* Implant Dent, 2001. **10**(4): p. 225-8.
30. Saleh, H. and F. Cox, *Gravitational platelet separation. Accelerating the body's own healing process*. Br J Perioper Nurs, 2004. **14**(4): p. 175-9.
31. Marlovits, S., et al., *A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note*. Eur Spine J, 2004. **13 Suppl 1**: p. S102-6.
32. Eppley, B.L., J.E. Woodell, and J. Higgins, *Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2004. **114**(6): p. 1502-8.
33. Franchini, M., et al., *Efficacy of platelet gel in reconstructive bone surgery*. Orthopedics, 2005. **28**(2): p. 161-3.
34. Schlegel, K.A., et al., *[Osseous defect regeneration using autogenous bone alone or combined with Biogran or Algipore with and without added thrombocytes. A microradiologic evaluation]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2003. **7**(2): p. 112-8.
35. Camargo, P.M., et al., *Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans*. J Periodontal Res, 2002. **37**(4): p. 300-6.
36. Garg, A.K., *The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants*. Dent Implantol Update, 2000. **11**(3): p. 17-21.
37. Kitoh, H., et al., *Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases*. Bone, 2004. **35**(4): p. 892-8.

38. Dallari, D., et al., *Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells*. J Bone Joint Surg Am, 2007. **89**(11): p. 2413-20.
39. Aghaloo, T.L., P.K. Moy, and E.G. Freymiller, *Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study*. J Oral Maxillofac Surg, 2002. **60**(10): p. 1176-81.
40. Fuerst, G., et al., *Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(9): p. 784-90.
41. Plachokova, A.S., et al., *Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(2): p. 244-51.
42. Kasten, P., et al., *The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects*. Biomaterials, 2008. **29**(29): p. 3983-92.
43. Weibrich, G., et al., *[Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2002. **6**(3): p. 168-74.
44. Wiltfang, J., et al., *Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation?* Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(2): p. 213-8.
45. Wheeler, D.L., et al., *Grafting of massive tibial subchondral bone defects in a caprine model using beta-tricalcium phosphate versus autograft*. J Orthop Trauma, 2005. **19**(2): p. 85-91.
46. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
47. Furst, G., et al., *Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(4): p. 500-8.
48. Green, E., J.D. Lubahn, and J. Evans, *Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture*. J Surg Orthop Adv, 2005. **14**(2): p. 64-72.

49. Graziani, F., et al., *The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts*. Clin Oral Implants Res, 2006. **17**(2): p. 212-9.
50. Fuerst, G., et al., *Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2003. **18**(5): p. 685-90.
51. Gumieiro, E.H., et al., *Platelet-rich plasma in bone repair of irradiated tibiae of Wistar rats*. Acta Cir Bras, 2010. **25**(3): p. 257-63.
52. Simman, R., et al., *Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing*. Ann Plast Surg, 2008. **61**(3): p. 337-44.
53. Fennis, J.P., P.J. Stoelinga, and J.A. Jansen, *Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2004. **33**(1): p. 48-55.
54. Wiltfang, J., et al., *Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment*. Clin Oral Implants Res, 2004. **15**(2): p. 187-93.
55. Kitoh, H., et al., *Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones*. Bone, 2007. **40**(2): p. 522-8.
56. Rai, B., et al., *Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair*. J Biomed Mater Res A, 2007. **81**(4): p. 888-99.
57. Kasten, P., et al., *Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference*. J Biomater Appl, 2008. **23**(2): p. 169-88.
58. Li, H., et al., *Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs*. Eur Spine J, 2004. **13**(4): p. 354-8.
59. Bohner, M., et al., *Synthesis and characterization of porous beta-tricalcium phosphate blocks*. Biomaterials, 2005. **26**(31): p. 6099-105.

60. Kasten, P., et al., *Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics*. Cells Tissues Organs, 2006. **183**(2): p. 68-79.
61. Tamura, K., et al., *The use of porous beta-tricalcium phosphate blocks with platelet-rich plasma as an onlay bone graft biomaterial*. J Periodontol, 2007. **78**(2): p. 315-21.
62. Tas, A.C., *Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(5): p. 2231-9.
63. Ooms, E.M., et al., *Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone*. Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 989-1000.
64. Tay, B.K., V.V. Patel, and D.S. Bradford, *Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone*. Orthop Clin North Am, 1999. **30**(4): p. 615-23.
65. Weiss, P., et al., *Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials*. Biomaterials, 2003. **24**(25): p. 4591-601.
66. Böhner, M. and F. Baumgart, *Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3569-82.
67. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
68. Hee Soon, C., et al., *Effect of different bone substitutes on the concentration of growth factors in platelet-rich plasma*. J Biomater Appl, 2008. **22**(6): p. 545-57.
69. Weibrich, G., et al., *Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank*. Clin Oral Implants Res, 2003. **14**(3): p. 357-62.
70. Marx, R.E., *Platelet-rich plasma: evidence to support its use*. J Oral Maxillofac Surg, 2004. **62**(4): p. 489-96.

71. Choi, B.H., et al., *Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2005. **34**(4): p. 420-4.
72. Dugrillon, A., et al., *Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2002. **31**(6): p. 615-9.
73. Landesberg, R., M. Roy, and R.S. Glickman, *Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation*. J Oral Maxillofac Surg, 2000. **58**(3): p. 297-300; discussion 300-1.
74. Andrade, M.G., et al., *Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **105**(1): p. e5-e12.
75. Alsousou, J., et al., *The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature*. J Bone Joint Surg Br, 2009. **91**(8): p. 987-96.
76. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 186-93.
77. Man, D., H. Plosker, and J.E. Winland-Brown, *The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery*. Plast Reconstr Surg, 2001. **107**(1): p. 229-37; discussion 238-9.
78. Fufa, D., et al., *Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen*. J Oral Maxillofac Surg, 2008. **66**(4): p. 684-90.
79. Martineau, I., E. Lacoste, and G. Gagnon, *Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4489-502.
80. Dorion, R.P., et al., *Risk and clinical significance of developing antibodies induced by topical thrombin preparations*. Arch Pathol Lab Med, 1998. **122**(10): p. 887-94.
81. Ortel, T.L., et al., *Immunologic impact and clinical outcomes after surgical exposure to bovine thrombin*. Ann Surg, 2001. **233**(1): p. 88-96.

82. Wai, Y., et al., *Anaphylaxis from topical bovine thrombin (Thrombostat) during haemodialysis and evaluation of sensitization among a dialysis population*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(12): p. 1730-4.
83. Assoian, R.K., et al., *Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets*. Nature, 1984. **309**(5971): p. 804-6.
84. Lieberman, J.R., A. Daluiski, and T.A. Einhorn, *The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications*. J Bone Joint Surg Am, 2002. **84-A**(6): p. 1032-44.
85. Fiedler, J., et al., *BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells*. J Cell Biochem, 2002. **87**(3): p. 305-12.
86. Baylink, D.J., R.D. Finkelstein, and S. Mohan, *Growth factors to stimulate bone formation*. J Bone Miner Res, 1993. **8 Suppl 2**: p. S565-72.

8 Danksagung

Zuallererst möchte ich dem Klinikdirektor der Unfall- und Handchirurgie sowie Dekan der Medizinischen Fakultät Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf für die Ermöglichung dieser Dissertation danken.

Mein nächster Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Mohssen Hakimi, der bereits zu meinen Famulaturzeiten mein Interesse an dem Fach der Chirurgie erweckte und viel mehr auch eine Begeisterung zur wissenschaftlichen Arbeit in mir hervorrief. Ich danke ihm für die Ermöglichung und Begutachtung meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Pascal Jungbluth, der mir nicht nur mit fundiertem Fachwissen und wertvollen Hinweisen stets zur Seite stand und beim Verfassen dieser Arbeit uneingeschränkt seine Hilfe anbot, sondern auch durch eine vertrauensvolle Betreuung und zuverlässige Unterstützung eine erfolgreiche Durchführung der wissenschaftlichen Versuche und die Vollendung dieser Arbeit ermöglichte.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. vet. Martin Sager, Frau Dr. med. vet. Eva Engelhardt sowie Frau Iris Schrey für die endlose Hilfestellung und Unterstützung bei den Arbeiten an der TVA Düsseldorf. Sie waren mir nicht nur Ansprechpartner, sondern haben auch durch ihre Anregungen und konstruktive Kritik mein Forschungsprojekt bereichert.

Vom Herzen möchte ich meinen Freunden Mine, Aysen und vor allem Yasemin Seyis danken, die mir nicht nur Freunde sondern auch immer eine Familie gewesen sind und mir stets Ausgleich und Erholung von den Strapazen des Studiums und der Doktorarbeit geschaffen haben.

Nicht zu vergessen sind meine Kommilitoninnen Özlem Bolat, Hatice Düzsoy und Senay Macit, die mich vor allem in angespannter und gestresster Laune ertragen und mir den Rücken freigehalten haben.

DANKSAGUNG

Schließlich danke ich meinen Eltern Züriyet und Ibrahim Ar, die die Grundsteine für meinen Weg gelegt, mein Studium erst ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben, sowie meinen Geschwistern Kader, Birgül und Murat, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bekräftigt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Ebru Ar

Geburtsdatum:	14.10.1984
Geburtsort:	Düsseldorf
Staatsbürgerschaft:	deutsch
Familienstatus:	ledig

Schulbildung

1991-95	Grundschule in Düsseldorf
1995-04	Humboldt-Gymnasium in Düsseldorf

Austauschprogramme

05/2001	École Alsacienne in Paris
03/2002	Wayzata High-School in Plymouth, Minnesota

Medizinische Ausbildung

Oktober 2004	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
September 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2010	Abschluss des Studiums mit dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung; Gesamtnote: Gut

Klinische Arbeit

Famulaturen:

März 2007	Unfallchirurgie und Handchirurgie Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf Universitätsklinikum Düsseldorf
August 2007	Innere Medizin, Praxisfamulatur Dr. med T. Vorfeld Düsseldorf
August 2008	Ästhetische Chirurgie und Handchirurgie Dr. med. M. Rohrbach Bergmannsheil Buer, Gelsenkirchen
September 2008	Unfallchirurgie und Handchirurgie Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf Universitätsklinikum Düsseldorf

Praktisches Jahr:

1. Tertial:

31.08.09 - 18.12.09	Innere Medizin Prof. Dr. M. Aktan Faculty of Medicine, University of Istanbul
---------------------	--

2. Tertial:

21.12.09 - 09.04.10	Gynäkologie und Geburtshilfe Dr. med. K. Taghavi Sana Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim
---------------------	--

3. Tertial:

02.06.03 - 21.09.03	Chirurgie Prof. Dr. med. O. Horstmann Sana Kliniken Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim
---------------------	---