

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. Joachim Windolf

# **Die Untersuchung des Einflusses autologer Wachstumsfaktoren aus Platelet-Rich Plasma auf porcine Chondrozyten in Monolayerkultur**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Annika Licht**

**2012**

---

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

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

Dekan

Referent: PD Dr. med. M. Wild

Korreferent: PD Dr. med. P. Kröpil

---

In Dankbarkeit  
meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis:

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b><u>7</u></b>
1.1	Hintergrund der Arbeit	7
1.2	Knorpelgewebe	9
1.2.1	Hyaliner Knorpel	10
1.2.1.1	Chondrozyten	11
1.2.1.2	Extrazellulärmatrix	12
1.2.1.3	Aufbau des hyalinen Knorpels	12
1.2.2	Elastischer Knorpel	14
1.2.3	Faserknorpel	15
1.3	<b>Platelet-Rich Plasma (PRP)</b>	<b>15</b>
1.3.1	Allgemeines und Definition von PRP	15
1.3.2	Bestandteile von PRP	16
1.3.2.1	Thrombozyten	16
1.3.2.2	Eigenschaften der Wachstumsfaktoren im PRP	17
1.3.2.3	Thrombin	18
1.3.2.4	Calcium	19
1.4	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b><u>21</u></b>
2.1	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>21</b>
2.1.1	Zellkulturmedien und Zusätze	21
2.1.2	Chemikalien	21
2.1.3	Lösungen	22
2.1.4	Puffer	22
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	Enzyme	25
2.1.7	Testkits	25
2.1.8	Primer	26
2.1.9	Sonstiges Material	26
2.1.10	Geräte	27
2.2	<b>Methoden</b>	<b>28</b>

2.2.1	Gewinnung von primären Chondrozyten	28
2.2.1.1	Zellgewinnung und Kultivierung	28
2.2.1.2	Einfrieren von Zellen	29
2.2.2	Herstellung von Platelet-Rich-Plasma (PRP)	30
2.2.3	ELISA zur quantitativen Bestimmung von Wachstumsfaktoren	31
2.2.4	Der Versuchsansatz	32
2.2.5	BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Proliferationstest	34
2.2.6	RNA-Isolierung mittels TRIZOL <sup>®</sup>	35
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.7.1	ReverseTranskription (RT)	36
2.2.7.2	PCR	37
2.2.8	Western Blot zum Nachweis von Collagen I	40
2.2.8.1	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	40
2.2.8.2	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	41
2.2.8.3	SDS-Page	42
2.2.8.4	Western Blot	42
2.2.8.5	Immunmarkierung	43
2.2.9	ELISA zur quantitativen Bestimmung von Collagen Typ II	44
<b>2.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Platelet-Rich Plasma (PRP)</b>	<b>47</b>
3.1.1	Herstellung von PRP	47
3.1.2	Thrombozytenzahlen	47
<b>3.2</b>	<b>Wachstumsfaktoren</b>	<b>48</b>
3.2.1	Ergebnisse für TGF- $\beta$ 2	48
3.2.2	Ergebnisse für BMP-2	48
3.2.3	Ergebnisse für BMP-7	48
<b>3.3</b>	<b>Mikroskopische Ergebnisse der Versuchsansätze mit Chondrozyten</b>	<b>49</b>
3.3.1	Versuche mit Plasma	49
3.3.2	Versuche mit PPP	50
3.3.3	Versuche mit PRP	52
<b>3.4</b>	<b>BrdU</b>	<b>54</b>
<b>3.5</b>	<b>PCR zur Bestimmung von Collagen Typ I</b>	<b>55</b>

## Inhaltsverzeichnis

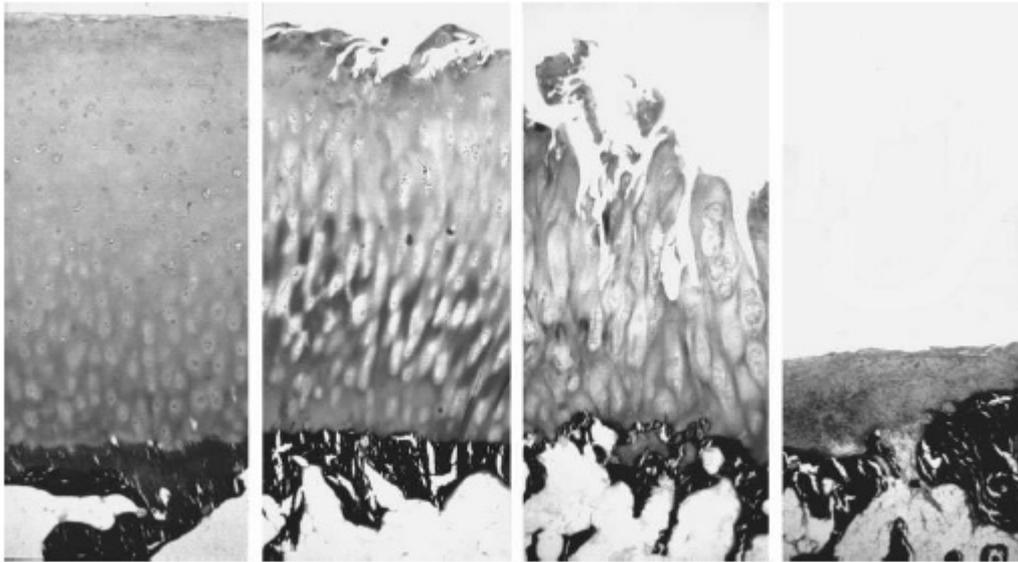
---

<b>3.6</b>	<b>Western Blot zur Bestimmung von Collagen Typ I</b>	<b>56</b>
<b>3.7</b>	<b>ELISA zur Bestimmung von Collagen Typ II</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>84</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund der Arbeit

Ärzte werden im chirurgischen Alltag immer häufiger mit Knorpelschäden und Arthrose im Kniegelenk konfrontiert. Dabei handelt es sich zum einen um ältere Patienten, die auf Grund von Verschleiß oder früheren Verletzungen im Bereich des Knies und daraus resultierender Arthrose im persönlichen Alltag oftmals stark eingeschränkt sind und zum anderen aber auch um jüngere, aktive Menschen zwischen 20 und 40 Jahren, welche meistens nach einem Trauma oder einer angeborenen Deformation einen erheblichen Knorpelschaden aufweisen (Davies-Tuck, Wluka et al. 2008). Die Prävalenz und der Schweregrad von Knorpeldefekten im Knie nehmen zum Einen mit steigendem Alter und zum Anderen bei steigendem Body Mass Index (BMI) auch bei jüngeren und ansonsten weitgehend gesunden Menschen zu (Basad, Ishaque et al. 2010). Assoziiert sind die Knorpelschäden mit einer Abnahme des Knorpelvolumens im Knie (Wild, Jacobi et al. 2000), einer gesteigerten Rate von Knorpelverlust und letztendlich einem Kniegelenkersatz (Fritz, Gaissmaier et al. 2006; Basad, Ishaque et al. 2010). Patienten mit Gelenkknorpeldefekten sind prädisponiert zur Entwicklung einer schmerzhaften und immobilisierenden Arthrose einschließlich den damit verbundenen Einschränkungen und sozioökonomischen Bedeutungen. Bei der Entstehung eines Knorpelschadens lassen sich fokale Läsionen von degenerativen Defekten unterscheiden. Fokale Läsionen sind gut umschriebene Defekte, die meist durch mechanische Faktoren wie Traumata oder Erkrankungen wie z.B. einer Osteochondrosis dissecans entstehen. Degenerative Defekte erscheinen typischerweise weniger gut abgegrenzt und beruhen in der Regel auf einer Bandinstabilität, Meniskusverletzungen oder auf Formabweichungen der Gelenke und Gelenkachsen, die wiederum zu einer chronisch überhöhten Belastung von Knorpelanteilen führen. Auch durch metabolische Prozesse, wie eine Ernährungsumstellung, Stoffwechselerkrankungen, sowie enzymatische Destruktion kann die Gelenksbiologie gestört werden und der Knorpel einer beginnenden Zerstörung ausgesetzt sein (Csaki, Schneider et al. 2008). Dabei sind die am meisten von Knorpeldestruktion betroffenen Stellen im Kniegelenk die Femurkondylen (Falah, Nierenberg et al. 2010).



**Abbildung 1 Knorpelschaden von links nach rechts: Grad I intakte Knorpeloberfläche, weicher Knorpel Grad II verletzte Knorpeloberfläche, Grad III freiliegender subchondraler Knochen, Grad IV vollständiger Verlust des Knorpels, Knorpelglatze (C.J.Wirth 2005).**

In den Gelenken findet man die häufigste der drei Knorpelarten des menschlichen Körpers, den hyalinen Knorpel. Dieser besitzt auf Grund seiner visko-elastischen Eigenschaften die Fähigkeit zur mechanischen Dämpfung und des fast reibungslosen Gleitens von Gelenkflächen (Basad, Ishaque et al. 2010). Nachteil des hyalinen Knorpels ist jedoch seine ausgesprochen schlechte Regenerations- und Selbstheilungsfähigkeit, weswegen gerade die Behandlung von traumatischen Knorpelschäden beim jungen Patienten Chirurgen und Orthopäden vor ein großes Problem stellt (Basad, Ishaque et al. 2010). Die heute möglichen operativen Behandlungen können unterteilt werden in ersetzende, Knochenmark stimulierende und regenerative Techniken (Basad, Ishaque et al. 2010). Alle operativen Therapien von Gelenkflächendefekten haben das Ziel durch lokale Stimulation oder durch die Transplantation von autologem Chondrozytenmaterial eine Füllung des Defektes zu erreichen. Eine Einteilung der Defekte nach Schweregrad ist in Abbildung 1 dargestellt. Die osteochondrale Anbohrung, das Osteochondral Autograft Transfer System(OATS) und die Autologe Chondrozyten Transplantation(ACT) sind derzeit gängige Therapieansätze, welche jedoch zum Teil nicht unerhebliche Nachteile aufweisen. Bei der osteochondralen Anbohrung (Microfracturing nach Steadman (Fritz, Gaissmaier et al. 2006)) kommt es, durch partielle Freilegung des subchondralen Knochenmarks und Ein-

wanderung von mesenchymalen Stammzellen, allenfalls zur Bildung von minderwertigem Faserknorpel (Fritz, Gaissmaier et al. 2006). Ein erheblicher Entnahmedefekt mit weiteren Risiken muss bei der Transplantation von autologen osteochondralen Zylindern (OATS) in Kauf genommen werden. Die ACT ist mit hohen Kosten verbunden und erfordert mindestens zwei operative Eingriffe, scheint jedoch vor allem bei der Versorgung größerer Knorpeldefekte alternativen Verfahren überlegen zu sein (Fritz, Gaissmaier et al. 2006).

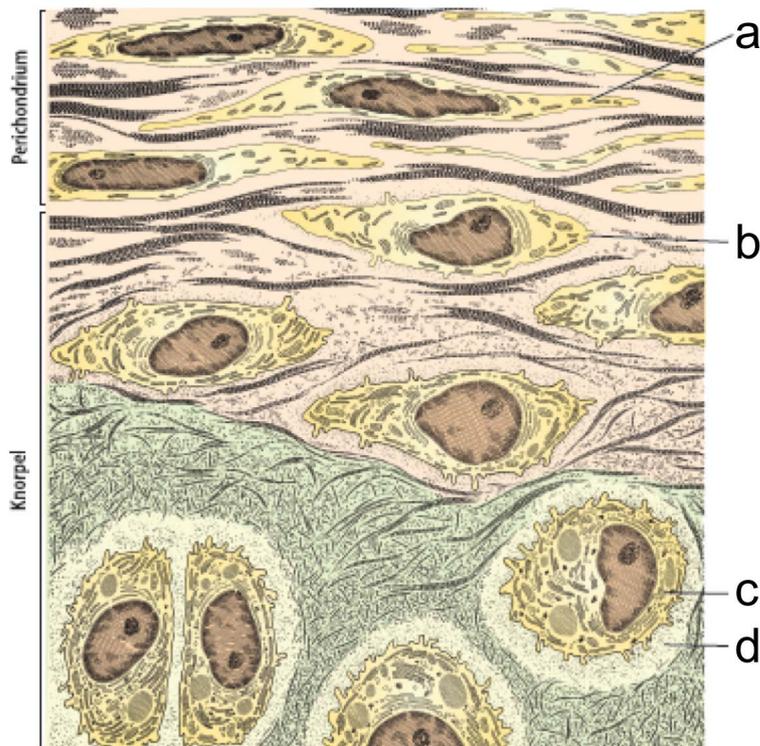
Neue alternative Behandlungsmöglichkeiten von osteochondralen Defekten stellen biphasische Matrices dar. Mit Hilfe dieser künstlich hergestellten dreidimensionalen Gerüste können Knorpel-/Knochendefekte durch die Neubildung von hyalinartigem Knorpelgewebe aus einsprossenden mesenchymalen Stammzellen therapiert werden. Ein weiterer Ansatz zur Therapie von Gewebedefekten und zur Anregung der endogenen Heilung ist der Einsatz von Wachstumsfaktoren, welche bei knöchernen Defekten oder Frakturheilungen (Pseudarthrosen) Anwendung finden. In der Unfallchirurgie, Orthopädie und Kieferchirurgie werden aus Platelet Rich Plasma (PRP) stammende Wachstumsfaktoren bereits eingesetzt (Dugrillon, Eichler et al. 2002; Kajikawa, Morihara et al. 2008; Lee, Wilson et al. 2011).

### **1.2 Knorpelgewebe**

Das Knorpelgewebe zählt histologisch zu den Binde- und Stützgeweben und wird in drei Typen unterteilt, den hyalinen, den elastischen und den Faserknorpel. Das bradytrophe Gewebe ist weitgehend sowohl gefäß- als auch nervenfrei und wird von der umgebenden Flüssigkeit (Synovia) durch Diffusion ernährt. Trotz dieses Umstandes ist Knorpelgewebe metabolisch sehr aktiv, um seine physiologische Funktion aufrecht zu erhalten (Hunziker, Quinn et al. 2002). Im Wesentlichen setzt sich das Knorpelgewebe aus hoch spezialisierten Chondrozyten (Knorpelzellen), welche 1-3% des Gewebavolumens ausmachen, und der Extrazellulärmatrix zusammen (Drengk, Zapf et al. 2009). Die wichtigsten Bestandteile der Extrazellulärmatrix, welche von den Chondrozyten synthetisiert werden, sind Proteoglykane und Kollagenfibrillen und diese variieren je nach Knorpeltyp in ihrer Zusammensetzung. Das Zusammenwirken von Proteoglykanen und Kollagenfibrillen gibt dem Gewebe die biomechanische Eigenschaft einer hohen Druckelastizität.

### 1.2.1 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel ist der im menschlichen Körper am häufigsten zu findende Knorpeltyp und kommt als Gelenkknorpel, aber auch im nasotrachealen Raum, dem Rippenknorpel und den Wachstumsplatten vor (Lüllmann-Rauch 2006). Der hyaline Knorpel hat einen spezifischen Aufbau, welcher in Abbildung 2 dargestellt ist. Die Extrazellulärmatrix des hyalinen Knorpels besteht zu 40 – 50 % aus Kollagenen (zu 90 % Kollagen-Typ-II) und zu 20 – 25 % aus verschiedenen Proteoglykanen, wie Aggrecan, Decorin, Biglycan und Fibromodulin (Falah, Nierenberg et al. 2010). Hyalines Knorpelgewebe besteht zu 60 – 80 % aus Wasser (Newman 1998). Das gefäßfreie Gewebe wird durch Diffusion von nährstoffreicher Synovia ernährt und ermöglicht den Gelenkflächen durch seine viskösen Eigenschaften ein reibungsfreies Gleiten. Die Bestandteile der Synovia werden von spezialisierten Fibroblasten, den Synovialozyten, synthetisiert. Diese befinden sich in der inneren Membran der Gelenkkapsel. Zum Großteil besteht die Synovia aus Hyaluron, Phospholipiden und dem Glycoprotein Lubricin. Der hyaline Knorpel des Gelenkes weist eine enorme Festigkeit und Druckelastizität auf, welche ihm erlauben einen gewissen Grad an Kompression zu tolerieren. Nach Dekompression kehrt er wieder in seine alte Form zurück. Diese Funktion als Stoßdämpfung für den darunter liegenden Knochen hängt sowohl von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Proteoglykane und Glukosaminoglykane, als auch vom Gefüge der Kollagenfibrillen ab (Lüllmann-Rauch 2006).



**Abbildung 2** Zeichnung des Aufbaus von hyalinen Knorpels; a: perichondrale Fibroblasten, b: Chondroblast, c: Chondrozyt, d: Knorpelhof (Luiz Carlos U. Junqueira 2005)

### 1.2.1.1 Chondrozyten

Chondrozyten sind als einziger Zelltyp nur im Knorpelgewebe zu finden. Sie entwickeln sich während der Embryogenese aus mesenchymalen Stammzellen. Im Erwachsenenalter verbleiben die Knorpelzellen in einem ausgereiften Stadium und werden nur noch begrenzt und meist funktionell unzureichend durch mesenchymale Stammzellen aus der subchondralen Membran regeneriert (Csaki, Schneider et al. 2008). Die Funktion der Chondrozyten besteht in der Synthetisierung der Komponenten der Knorpelmatrix. Dabei besteht ein besonderes Charaktermerkmal des Knorpelgewebes darin, dass die Chondrozyten keinen Zell-zu-Zellkontakt haben und jede Zelle als individuelle Einheit zur Aufrechterhaltung der Integrität der Extrazellulärmatrix in ihrer direkten Umgebung beiträgt. Der Bereich in welchem die einzelne Zelle durch anabole und katabole Metabolismen die Extrazellulärmatrix aufrechterhält, nennt man das Territorium oder die perizelluläre Matrix eines Chondrozyten. Die Einheit aus Chondrozyt und Territorium wird als Chondron bezeichnet (Choi, Youn et al. 2007; Csaki, Schneider et al. 2008). Die perizelluläre Matrix ist im allgemeinen

definiert durch das exklusive Vorkommen von Typ VI-Collagen, enthält daneben aber auch weitere Collagene wie Typ II, IX, XI, Aggrecan und Fibronectin (Choi, Youn et al. 2007).

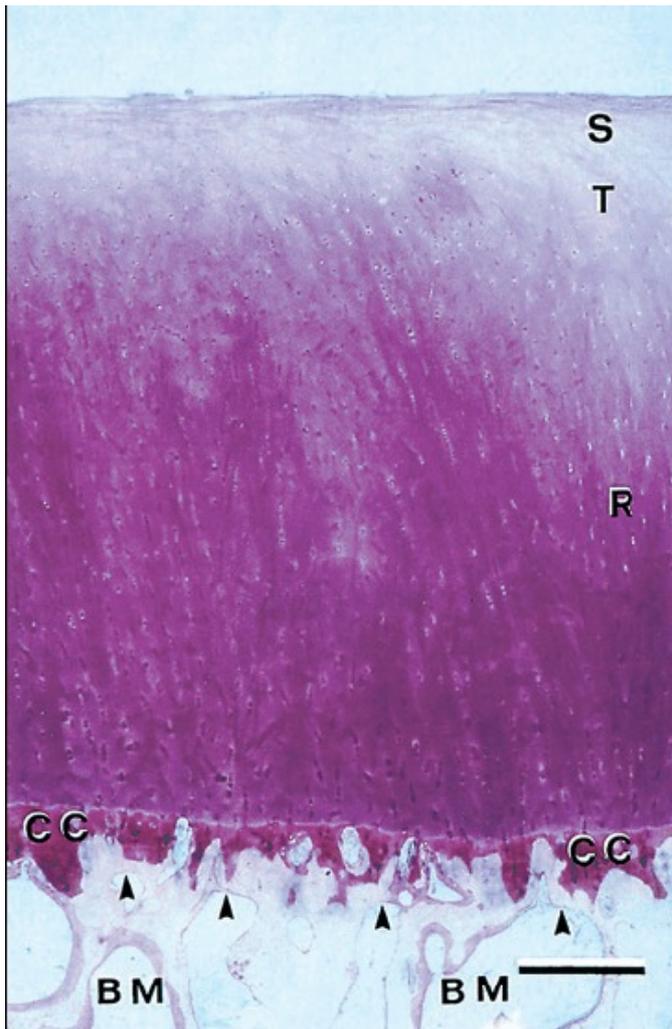
### 1.2.1.2 Extrazellulärmatrix

Die Fähigkeit des Gelenkknorpels Kompressionen, Zug- und Scherkräften zu widerstehen, beruht wie schon oben erwähnt, auf der Komposition und Struktur der Extrazellulärmatrix. Die primären Bestandteile der Matrix sind Wasser, Aggrecan und Collagen-Typ-II. Aggrecane sind reich an kovalent gebundenen sulfatisierten Glykosaminoglykanseitenketten, welche zwei wichtige physikalische Eigenschaften für das Knorpelgewebe hervorbringen. Zum einen geben die hydrophilen Proteoglykane der Matrix ein fixes negatives Potential und damit die Fähigkeit Wasser in das Gewebe einzulagern. Zum anderen stoßen sich die anionischen Seitenketten der Proteoglykane gegenseitig ab und sorgen so für den nötigen Abstand zwischen den Molekülen. Ein Netz aus verlinkten Collagenfibrillen begrenzt die Schwellung der Proteoglykane und sorgt so für die Zug- und Scherkräftfestigkeit. Durch Kompression der Proteoglykane durch das sie umgebende Collagennetzwerk, liegen die Glykosaminoglykane im hyalinen Knorpel nur partiell hydratisiert vor. Unter Druck kann interstitielle Flüssigkeit aus der permeablen Collagen-Proteoglykanmatrix ins umliegende Gewebe fließen und somit Stoffwechselmetabolite ausschwemmen und den Druck auf das Gelenk abfangen. Umgekehrt fließt mit Nährstoffen angereicherte Flüssigkeit unter Druckentlastung zurück in das Knorpelgewebe (Newman 1998; Asanbaeva, Tam et al. 2008; Gruber, Mauerhan et al. 2008).

### 1.2.1.3 Aufbau des hyalinen Knorpels

Als Gelenkknorpel hat die hyaline Knorpelschicht eine mittlere Höhe von 2,4 mm und eine Zelldichte von 1,65 % des Gesamtvolumens (Hunziker, Quinn et al. 2002). Das Gewebe zeigt eine charakteristische Gliederung in vier Zonen (siehe Abbildung 3). Die oberflächliche Zone (superfizielle Zone), die mittlere Zone (transitionale Zone), die tiefe Zone (radiale Zone) und als vierte Schicht den kalzifizierten Knorpel (Newman 1998; Karlsson and Lindahl 2009). Innerhalb dieser Zonen schwanken die Dichte und Morphologie der Chondrozyten. Ebenso unterscheidet sich die Zusam-

mensetzung der Extrazellulärmatrix je nach Schicht, was darauf schließen lässt, dass sich auch der Metabolismus der Chondrozyten in den jeweiligen Kompartimenten voneinander unterscheidet (Fukui, Miyamoto et al. 2008). Die superfizielle Schicht ist die dünnste Schicht des Knorpelgewebes. In ihr findet man parallel zur Oberfläche aufgereiht kleine, diskoidale Chondrozyten, welche Lubricin sezernieren (Newman 1998; Goldring, Marcu 2009). Dünne Collagenfibrillen sind parallel zu Oberfläche aufgereiht. Die Zellen in der mittleren Schicht (Transitionalzone) erscheinen hingegen abgerundet und unorganisiert. Die Collagenfibrillen sind länger und nicht mehr parallel angeordnet. Die Chondrozyten produzieren Cartilage Intermediate Layer Protein (CILP). Des Weiteren sind die Knorpelzellen der tiefen (radialen) Zone wesentlich größer und in Säulen angeordnet (Goldring, Marcu 2009). Parallel zu den Zellen und vertikal zur Oberfläche verlaufen in dieser Schicht die Collagenfibrillen. Die Chondrozyten exprimieren vermehrt Collagen-Typ X sowie alkalische Phosphatase. Im Bereich des Übergangs zur subchondralen Membran findet man zum Schluss die Kalzifizierungszone. Hier inserieren die Collagenfibrillen im kalzifizierten Knorpel und bieten sowohl eine mechanische Transition vom Knorpel zum Knochen, als auch eine Fixierung zwischen beiden Geweben. Die Mineralisierung des Knorpels ist auf die Matrix zwischen den Knorpelzellen beschränkt (Newman 1998; Gruber, Mauerhan et al. 2008).



**Abbildung 3** Lichtmikroskopischer Überblick über die Zoneneinteilung des humanen Gelenkknorpels. Superficial (S)- und Transitional (T)-Zone; Radialzone (R); calcifizierter Knorpel (CC); Knochenmarkzone (BM); Färbung: Mc Neil's Tetrachrome, Fuchsin und Toluidin Blau (Hunziker, Quinn et al. 2002)

### 1.2.2 Elastischer Knorpel

Der elastische Knorpel ist im Grundaufbau dem hyalinen Knorpel sehr ähnlich. Zusätzlich besitzt er Netze aus elastischen Fasern in der Extrazellulärmatrix, welche ihm neben der Druck-Elastizität auch eine Biege-Elastizität verleihen. Man findet diese Form des Knorpelgewebes in der Ohrmuschel, dem äußeren Gehörgang, der Tubula auditiva, der Epiglottis, den kleinen Kehlkopfknorpeln und den kleinsten Bronchien (Lüllmann-Rauch 2006).

### **1.2.3 Faserknorpel**

Als Musterbeispiel für das Vorkommen von Faserknorpel dienen die Bandscheiben (Disci intervertebrales). Der Faserknorpel enthält neben den Bestandteilen des hyalinen Knorpels einen großen Anteil an Collagen Typ-I Fasern, die typisch für straffes Bindegewebe sind. Dadurch wird der druckelastische Faserknorpel zusätzlich zugfest (Chou, Reza et al. 2008).

## **1.3 Platelet-Rich Plasma (PRP)**

### **1.3.1 Allgemeines und Definition von PRP**

Autologes Platelet-Rich Plasma (PRP) findet zunehmend Anwendung in fast allen Feldern der Chirurgie zur Behandlung von weichen und harten Geweben, bei Pseudarthrosen sowie Frakturen zur Verbesserung des Knochenaufbaus und bei der Behandlung von chronischen Wundheilungsstörungen. PRP kombiniert dabei sowohl die Vorteile eines autologen Fibrinkoagulates, das unterstützend auf die Blutgerinnung wirkt, als auch die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren in hoher Konzentration, welche positiv auf das Wachstum von Knochen und anderen Geweben wirken (Marlovits, Mousavi et al. 2004). Die Plättchenkonzentrate stellen eine kostengünstige Alternative zu den teureren rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren dar und umgehen als autologes Produkt die Unsicherheiten einer immunogenen Reaktion oder der Krankheitsübertragung zwischen Individuen (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). PRP ist definiert als ein Volumen von autologem Plasma, welches eine Thrombozytenkonzentration über dem Normwert hat (Marx 2001; Weibrich, Kleis et al. 2002). Die normale Thrombozytenzahl des humanen Vollblutes liegt zwischen 150000/ $\mu\text{l}$  und 350000/ $\mu\text{l}$  und damit beträgt die Thrombozytenzahl im Durchschnitt 200000/ $\mu\text{l}$  (Kleis et al. 2002). Die heute gültige Arbeitsdefinition von PRP wurde als 1.000.000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  in einem Plasmavolumen von 5ml festgesetzt, was einer Steigerung der Plättchenkonzentration um 300 – 400 % zum Ausgangswert entspricht. Diese Konzentration wurde wissenschaftlich an Hand der positiven Wirkung der Plättchenkonzentration auf die Heilung von Knochen und weichem Gewebe bestimmt (Marx 2001; Weibrich, Kleis et al. 2002; Slapnicka, Fassmann et al. 2008).

### 1.3.2 Bestandteile von PRP

#### 1.3.2.1 *Thrombozyten*

Der Hauptbestandteil des PRP ist eine hohe Konzentration an Thrombozyten. Thrombozyten sind Zellen, die im Rahmen der Blutgerinnung durch Aggregation zu einem weißen Plättchenthrombus den ersten Wundverschluss herbeiführen. Die Konsolidierung des primären Verschlusses erfolgt durch die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems, welches aus verschiedenen Faktoren besteht. Bei einer Gefäßverletzung lagern sich die Blutplättchen über verschiedene Gewebsbestandteile und Faktoren an die freigelegten Kollagene des Endothels an und werden so aktiviert. Sie verändern dabei ihre Form indem sie kugelig werden und Fortsätze, so genannte Pseudopodien, entwickeln. Durch diese Verwandlung erwerben sie die Fähigkeit miteinander zu aggregieren. Dieser Vorgang ist Calcium-abhängig. Ein weiterer Effekt der Aktivierung ist die Sekretion der Inhalte der elektronendichten  $\alpha$ -Granula des Plättchenplasmas. Die  $\alpha$ -Granula enthalten sekretorische Proteine, wie verschiedene Gerinnungsfaktoren, Plättchenfaktor 4 (PF4), Interleukin-1 (IL-1), von Willebrand-Faktor (vWF), Thrombospondin-1 (TSP-1), Fibrinogen, Vitronektin, Fibronektin, Osteokalzin (Oc), Osteonektin (On) und die, für die Wirkung von PRP als wichtig angenommenen, Wachstumsfaktoren wie z. B. PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF oder IGF (Lacci and Dardik 2010). Außerdem bilden die aktivierten Blutplättchen weitere Substanzen, wie das vasokonstriktorisch wirkende Thromboxan A<sub>2</sub>, Platelet Activating Factor (PAF) und ein Phosphoglycerin, welche sie exozytotisch freisetzen. Die elektronendichten Granula beinhalten ATP, ADP, Serotonin, Ca<sup>2+</sup>, Lysosomen, Heparitinase und saure Hydrolasen (R. Klink 2005).

Auch in vitro werden zu Forschungszwecken die Thrombozyten zur Exozytose ihrer Granulainhalte stimuliert. Man provoziert die Sekretion der Wachstumsfaktoren mit Hilfe von Thrombin oder anderen starken Stimuli wie Calcium. In den Exsudaten der Thrombozyten findet man die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Insuline-Like-Growth-Factor I (IGF-I), Basic Fibroblast-Growth-Factor-2 (bFGF-2), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Platelet-derived Angiogenesis Factor (PDAF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet-derived Endothelial Growth Factor (PDEGF), Epithelial Cell Growth

Factor (ECGF) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) (Han, Woodell-May et al. 2009; Spreafico, Chellini et al. 2009; Lacci and Dardik 2010). Innerhalb der ersten zehn Minuten nach der Aktivierung der Plättchen werden 95 % der Faktoren ausgeschüttet und die restlichen 5 % im Anschluss über mehrere Tage (Slapnicka, Fassmann et al. 2008; Lee, Wilson et al. 2011).

### 1.3.2.2 *Eigenschaften der Wachstumsfaktoren im PRP*

Für die Wirkung des PRP sind unter Anderem verschiedene Wachstumsfaktoren verantwortlich, deren Eigenschaften im Folgenden aufgeführt sind.

TGF- $\beta$  ist eine Superfamilie von aktiven Dimeren, die alle an Knorpel- und Knochenbildungsprozessen beteiligt sind. Die Subtypen TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 sind multifunktionale Zytokine, die in die Regulationsvorgänge und die Proliferation von Zellen involviert sind. Sie spielen, ebenso wie VEGF und EGF, eine Rolle bei der Regulierung von inflammatorischen Prozessen, bei der Wundheilung und der Zelldifferenzierung (Chang, Su et al. 2010). Des Weiteren ist TGF- $\beta$ 1 beteiligt an der Zellmigration, der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen und steigert die Kollagen Typ-II Expression in Chondrozyten (Giannoni and Cancedda 2006; Spreafico, Chellini et al. 2009). Das Zytokin hat jedoch einen negativen Effekt auf die Angiogenese (Anitua, Andia et al. 2004) und einen inhibitorischen Effekt auf die epitheliale Zellproliferation (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007).

Die BMP-Familie ist eine Untergruppe der größeren TGF- $\beta$ -Superfamilie und spielt wie diese, sowohl beim Knochen- als auch beim Knorpelwachstum und der Regeneration dieser Gewebe eine Rolle. Auswirkungen auf die lokale Aktivität von Osteoblasten, als auch auf die Einwanderung und Differenzierung von Stammzellen, wird vor allem BMP-7 nachgesagt (Han, Woodell-May et al. 2009; Hakimi, Jungbluth et al. 2010). BMP-2 und BMP-4 sind für die Stimulation der Knorpelbildung in verschiedenen Konzentrationen und Kultursystemen bekannt und haben ebenso osteoinduktive Eigenschaften (Giannoni and Cancedda 2006; Han, Woodell-May et al. 2009). Des Weiteren ist BMP-2 dafür bekannt die Dedifferenzierung von Chondrozyten in Monolayerkultur zu unterdrücken (Grunder, Gaissmaier et al. 2004).

IGF-1 ist ein Protein, welches aus einer Aminosäurekette besteht und in Chondrozyten, Osteoblasten, Leber, glatter Muskulatur und Plazenta synthetisiert

wird. Es stimuliert autokrin über Bindung an spezifische Rezeptoren auf Zelloberflächen das Knorpelwachstum, die Knochenmatrixsynthese und Replikation von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen (Anitua, Andia et al. 2004; Giannoni and Cancedda 2006; El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). Im wesentlichen stimuliert IGF-1 die Zellproliferation und die Synthese von wesentlichen Matrix-Bestandteilen, wie Aggrecan, Collagen Typ II und nicht-collagenen Proteinen (Shi, Mercer et al. 2009).

PDGF ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer und erscheint vor allem in der frühen Phase der Thrombusbildung während des Wundheilungsprozesses. Dieser Faktor wird von Thrombozyten, Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert und ist ein potentes Mitogen für Zellen mesenchymalem Ursprungs. Ebenso wird PDGF eine chemotaktische Wirkung auf verschiedene Abwehrzellen nachgesagt und ist wichtig für die Modifizierung der Bestandteile der Zellmatrix (Yazawa, Ogata et al. 2004). PDGF ist so wie bFGF-2 ein starker Stimulator der Zellproliferation und ein Promotor für die osteochondrale Defektheilung (Shi, Mercer et al. 2009).

Alle bereits genannten Wachstumsfaktoren sind Stimulatoren der Angiogenese und potente Mitogene für Endothelzellen (Anitua, Andia et al. 2004).

EGF spielt eine Rolle bei der Regulation des Wachstums vieler Zellen ektodermalen und mesenchymalen Ursprungs (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007).

Für die Bildung neuer Blutkapillaren in heilenden Wunden und die Integrität des Endothels ist VEGF ein wichtiger Faktor (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007).

### 1.3.2.3 *Thrombin*

Thrombin (Faktor IIa) ist ein zentraler Bestandteil der Blutgerinnungskaskade und entsteht aus der inaktiven Vorstufe Prothrombin durch Aktivierung mittels des Enzymkomplexes Prothrombinase. Die Bestandteile des Komplexes sind die aktivierte Form von Faktor X, Faktor V, Phospholipide und Calcium. Thrombin ist ein sehr potenter Thrombozytenagonist, der die Plättchen schon in sehr geringen Konzentrationen aktiviert (Angiolillo, Ueno et al. 2010). Dabei spielt Thrombin eine Schlüsselrolle in der Verstärkung der Antwort auf Verletzungen durch die Aktivierung von zusätzlichen Thrombozyten und der Initiierung von Rückkopplungsschleifen. Diese triggern wiederum die Formation von aktiviertem Faktor Xa und Thrombin (Chattopadhyay, Iacob et al. 2009). Der Gerinnungsfaktor wird lokal auf der Oberfläche der durch

Tissue Faktor aktivierten Thrombozyten produziert und bewirkt die Bildung eines okklusiven plättchenreichen Thrombus. Die für die Hämostase wichtigere Funktion des Faktors ist die Generation von Fibrin aus Fibrinogen, welches bei der Formation und des Wachstums des hämostatischen Thrombus mitwirkt (Angiolillo, Ueno et al. 2010).

#### 1.3.2.4 Calcium

Der Gesamtbestand an Calcium des menschlichen Körpers liegt bei ca. 1 kg. Davon liegen 99 % als Apatit in Knochen und Zähnen und nur 1 % als ionisiertes Calcium im Extrazellulärraum vor. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Serum beträgt 2,5 mmol/l (Dhouib, Turki et al. 2011). Ein Teil des ionisierten Serumcalciums spielt als Faktor IV in der Blutgerinnung bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin als Bestandteil des Prothrombinasekomplexes eine zentrale Rolle (R. Klink 2005). Es ist ebenso obligater Bestandteil des Exozytose-Vorgangs bei der Degranulierung der Thrombozyten während der primären Hämostase (Spreafico, Chellini et al. 2009). Calcium spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Energieproduktion der Zelle, dem intrazellulären Transport und der Signaltransduktion. Reguliert wird der Calciumhaushalt sowohl über das in den Glandulae parathyroidea gebildete Parathormon als auch durch das antagonistisch regulierende Hormon Calcitonin welches in den der C-Zellen der Schilddrüse produziert wird (Slinin, Blackwell et al. 2010).

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Grenzen der in vitro Kultivierung autologer Chondrozyten zur Reimplantation bei Gelenkknorpeldefekten sind heute immer noch eng gesteckt. Aktuelle Daten belegen, dass Chondrozyten unter Kulturbedingungen einer Dedifferenzierung unterliegen und auch die Proliferation der Zellen auf Grund der Eigenschaften des bradytrophen Gewebes sehr eingeschränkt ist. Dadurch kann z.B. in gedeckten Defekten von hyalinem Knorpel oftmals nur minderwertiger Faserknorpel gefunden werden. Viele Forschungsgruppen beschäftigen sich deshalb damit neue Ansätze zur Verbesserung der in vitro Kulturbedingungen zu entwickeln und für die in vivo Nutzung zu etablieren. Ein vielversprechender Ansatz liegt in der Nutzung von aus PRP stammenden autologen Wachstumsfaktoren zur Optimierung der Proliferation von Chond-

## Einleitung

---

rozyten in Monolayerkultur. Ziel dieser Arbeit ist es daher nach Optimierung der PRP-Herstellung, den Einfluss von aus PRP stammenden autologen Wachstumsfaktoren auf Proliferation und Differenzierung von primären porcinen Chondrozyten in Monolayerkultur zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Zellkulturmedien und Zusätze

- RPMI-1640-Medium with stable glutamine, Biochrome + 10% FCS + 1% P/S/N
- Fetal Calf Serum (FCS), PAA Laboratories
- Penicillin/Streptomycin/Neomycin (P/S/N), GIBCO
- Einfriermedium RPMI-1640+ 90% FCS und 10% DMSO

#### 2.1.2 Chemikalien

- Trypanblau 0,5 %, Biochrome
- PonceauS, Serva
- Bromphenolblau, Roth
- Coomassie Brilliant Blue, Serva
- Citrat-Dextrose-A (Antikoagulanzen)
- Calciumchlorid 5,5% Pfrimmer 20ml, Baxter Deutschland GmbH
- Thrombin T4648, Sigma Aldrich
- Bovine Serum Albumine (BSA), PAA Laboratories
- Trizol<sup>®</sup>, Sigma
- Isopropanol, Sigma
- Ethanol, Merck
- Essigsäure 96 %, Merck
- Methanol, Merck
- Chloroform, Sigma
- Ammoniumpersulfat(APS), Sigma
- Sodiumdodecylsulfat(SDS), Sigma
- Tween 20, Sigma
- Tris, Roth
- Glycin, Roth
- Glycerol, Roth

- Na-Deoxycholat, Roth
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin), Roth
- 30 % Acrylamide/Bis Solution 37, 5:1, Roth
- DEPC treated water, Invitrogen
- Roth-Mark Prestained Proteinmarker, Roth
- Molekularbiologisch reines Wasser, 5 Prime
- SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain, invitrogen
- Nonidet-P40, Biomol
- Complete, Mini, Roche

### 2.1.3 Lösungen

- Ponceau S
  - 0,1 % Ponceau
  - 3% Essigsäure
  
- Coomassie
  - 90 ml Methanol/H<sub>2</sub>O (50 ml Methanol + 40 ml H<sub>2</sub>O)
  - 10 ml Eisessig (=96 % Essigsäure)
  - 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250
  
- Entfärber-Lösung für Coomassie
  - 60 ml Methanol
  - 20 ml Eisessig
  - ad 200 ml H<sub>2</sub>O
  
- Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 1 x
  - 7,7 mM Tris (pH 7,5)
  - 150 mM NaCl
  - ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

### 2.1.4 Puffer

- PBS (Phosphate Buffered Saline) w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Biochrome

- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) 50x
  - Tris ultrapure 2,00 M
  - Eisessig 1,00 M
  - EDTA \* Na<sub>2</sub> 0,05 M
  
- Hank`s Buffered Salt Solution (plus P/S/N)
  - NaCl 5 M
  - KCl 0,20 g
  - Glucose 0,50 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,021 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,027 g
  - CaCl<sub>2</sub> 0,096 g
  - MgCl<sub>2</sub> 0,111 g
  - NaHCO<sub>3</sub> 0,176 g
  - 400 ml H<sub>2</sub>O
  - Streptomycin
  - Penicillin
  - Neomycin

**für Proteinisolation:**

- RIPA-Puffer
  - 1 % NP-40
  - 0,5 % Na-deoxycholat
  - 0,1 % SDS
  - ad 100 ml PBS

**für Western Blot:**

- Laufpuffer (Elphopuffer) 1 x
  - 25 mM Tris, pH 8,3-8,8
  - 192 mM Glycin
  - 0,1 % SDS
  - ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

- Transferpuffer 1 x
  - 25 mM Tris-Base, pH 8,0-10,5
  - 192 mM Glycin
  - ad 1000 ml H<sub>2</sub>O
  
- Blottingpuffer
  - 10 x Transferpuffer
  - 10 % Methanol
  - H<sub>2</sub>O
  
- Trenngelpuffer 4 x
  - 1,5 M Tris
  - 0,4 % SDS
  - ad 500 ml H<sub>2</sub>O
  
- Sammelgelpuffer 4 x
  - 0,5 M Tris
  - 0,4 % SDS
  - ad 100 ml H<sub>2</sub>O
  
- Laemmli-Puffer 4x
  - 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
  - 40 % Glycerol
  - 8 % SDS
  - 0,1 % Bromphenolblau
  - 20 % Mercaptoethanol
  
- Stripping-Puffer
  - 62,5 mM Tris (pH 6,8)
  - 2% SDS
  - 100 mM Mercaptoethanol

- ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### 2.1.5 Antikörper

- Polyclonal Goat anti-Mouse-HRP, Dako
- Monoclonal mouse anti-Collagen Type 1, Acris Antibodies
- Polyclonal rabbit anti-Aktin Antibody, Santa Cruz Biotechnology
- Polyclonal Goat anti-Rabbit-HRP, Dako

### 2.1.6 Enzyme

- RNase Inhibitor 2500U, Ambion
- Collagenase Typ II, worthington biochrom
- Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Biochrome

### 2.1.7 Testkits

- Quantikine<sup>®</sup> Human BMP-7 ELISA, R&D Systems
- Quantikine<sup>®</sup> Human BMP-2 ELISA, R&D Systems
- Quantikine<sup>®</sup> Human TGF-β<sub>2</sub> ELISA, R&D Systems
- BrdU Cell Proliferation ELISA, Roche
- Collagen Type II ELISA, mdbiosciences
- Omniscript RT Kit 200, Qiagen
- Taq PCR Core Kit 1000U, Qiagen
- Dc Protein Assay, BioRad
- ECL Western Blotting Substrate, Pierce

### 2.1.8 Primer

Primer	Sequenz	Tm°	GC-Anteil
pAggrecan – F	5'- CCT CAG GGA AGG CAG TGG CCC T-3'	77,5	70%
pAggrecan – R	5'-TCC AGA CAG TGA CCT GGC CTG AC -3'	72,0	61%
pCollagen I - F	5'-AGT GGT TAC TAC TGG ATT GAC C-3'	58,5	45%
pCollagen I - R	5'-TTG CCA GTC TCC TCA TCC -3'	61,4	56%
GAPDH - F	5'-CAC CAC CAT GGA GAA GGC TGG -3'	71,1	61,9%
GAPDH - R	5'-GAA TCA GAG GAG ACC ACC AG -3'	62,8	57,14%
Oligo - dT15	5'-TTT TTT TTT TTT TTT-3'	41,9	0%

### 2.1.9 Sonstiges Material

- Feather® Disposable Scalpel, steril, No.15
- Petrischalen 94mm mit Nocken, greiner bio-one
- Polypropylen-Röhrchen Falcon 50ml, BD
- Pipetten Eppendorf Research und Reference; jeweils in den Größen
  - 0,5 - 10µl
  - 10 – 100µl
  - 100 – 1000µl
- Costar Stripetten in den Größen 5,0 ml, 10,0 ml, 25,0 ml
- Pipettenspitzen von StarLab
- Cellstar® Tissue Culture Flasks 75cm<sup>2</sup> 250ml, greiner bio-one
- Nalgene® Cryogenic Vials
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml
- costar® Multiwell Plate, 12 Well, With Lid
- Microplates 96 Well ELISA, greiner bio-one
- PCR Softstrips 0,2 ml, Biozym
- Glasplatten (1,5 mm), BioRad
- Casting Stands, BioRad
- Casting Frames, BioRad
- Filterpapier 2,5 mm, BioRad

- Fiber Pads, BioRad
- Ice Blocks, BioRad

#### 2.1.10 Geräte

- Hera Safe Sterilbank Thermo
- Hera Cell 150 Inkubator Thermo
- Heraeus Fresco 17 Zentrifuge, Thermo
- Megafuge 1.0R Heraeus
- KNFlab Vacuumpumpe, laboport
- Accujet pro Brand
- Wasserbad-medingen
- Medi-Maschine, BD
- Mikroskop Axiovert 40C, ZEISS
- Neubauer-Zählkammer
- Vortex Heidolph Reaxtop
- Sysmex K4500
- MyCycler, BioRad
- Photometer, Eppendorf
- Viktor 3 Perkin Elmer
- Mini-PROTEAN Tetra Cell / BioRad
- Criterion Blotter / BioRad
- PowerPac HC Power Supply / BioRad
- ChemiDoc-Anlage Universal Hood II, BioRad
- Rock´n Roll Mischer RM5, CAT
- Ultraschallgerät UP50H mit Sonotrode MS1, Hielscher
- Ultra-Turrax, Welabo

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von primären Chondrozyten

#### 2.2.1.1 Zellgewinnung und Kultivierung

Für die Gewinnung von Zellmaterial aus Schweineknieen wurden sechs frische Schweineläufe aus dem Schlachthof besorgt. Unter der sterilen Werkbank wurde die Haut der Schweineläufe mit Hilfe eines Skalpells abpräpariert. Nach Entfernung der Haut und des darüber liegenden Muskel- und Sehngewebes wurde das Kniegelenk entlang der Gelenkkapsel eröffnet. Mit Hilfe des Skalpells wurde tangential vorsichtig das Knorpelgewebe bis zur subchondralen Lamelle abgeschält, wobei darauf geachtet wurde, die subchondrale Membran nicht zu verletzen um eine Kontamination der Proben mit Osteozyten zu vermeiden.

Die präparierten Knorpelstückchen wurden in eine Petrischale mit Hank's Salt Solution gegeben, welche jeweils 1 % Penicillin, Neomycin und Streptomycin enthält. Mit Hilfe des Skalpells wurden die Knorpelstückchen in ca. 1mm<sup>3</sup> große Teile zerkleinert, um die Oberfläche zum Verdauen für das Enzym Collagenase zu vergrößern.



Abbildung 4 präparierte Knorpelstücke in Hank's Salt Solution

Der Inhalt der Petrischalen (Abbildung 4) wurde in 50 ml Falcon-Tubes überführt und bei 1800 U/min für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Pro Falcon-Tube mit Knorpelgewebe wurden jeweils 20 ml Collagenase Typ II (insgesamt 40 mg, Konzentration 2 mg/ml) gegeben. Über Nacht wurden die Tubes bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Während der Inkubation wurden die einzelnen Chondrozyten durch enzymatische Reaktionen des Enzyms Collagenase aus der Zellmatrix gelöst. Die Zellsuspensionen wurden anschließend bei 1800 U/min für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet hiernach in 1 ml RPMI-Kulturmedium mit 10 % FCS resuspendiert. Um nach dem Verdau noch verbliebene größere Knorpelstücke aus den Lösungen zu entfernen, wurden die Proben für eine Minute in einer Medimaschine (BD) mit einem 50 µm Mediconfilter filtriert. Die so gewonnenen Chondrozytensuspensionen wurden auf Zellkulturflaschen verteilt und mit RPMI-Medium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> solange dem Wachstum überlassen, bis unter dem Mikroskop ein geschlossener Zellrasen zu erkennen war. Damit optimale Wachstumsbedingungen für die primären Chondrozyten vorliegen, wurde zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem ein Teil des verbrauchten Zellkulturmediums aus den Flaschen entfernt und durch frisches Medium ersetzt wurde.

### 2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Für den Erhalt der Membranintegrität und der Vitalität der Chondrozyten bis zur Verwendung in den nachfolgenden Untersuchungen wurden die Zellen zunächst in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Dazu wurden die Knorpelzellen mit der Endopeptidase Trypsin aus dem Zellverband gelöst. Hierbei handelt es sich um eine Serinepeptidase, welche Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet und somit die im Zellverband vorliegenden Chondrozyten voneinander trennen kann. Bei der Trypsinierung wurde darauf geachtet, dass das Enzym nicht zu lange Kontakt mit den Zellen hatte, da die Peptidase mit der Zeit auch die Chondrozyten selbst angreifen kann. Das tiefgefrorene Trypsin wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Absaugen des Mediums aus den Zellkulturflaschen wurde in jede Flasche 5 ml Trypsin pipettiert. Zur Inkubation wurden die Kulturflaschen mit Trypsin in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Nach 5 bis 10 min wurde unter dem Mikroskop kontrolliert,

ob das Enzym Trypsin die Zellen von der Oberfläche gelöst hatte. Nachdem sich der Großteil der Zellen in Lösung befand, wurde die Reaktion mit 7 ml RPMI-Medium (+ 10 % FCS) pro Flasche gestoppt. Danach wurden die Suspensionen mit einer Pipette durchmischt und in Falcon-Tubes überführt. Diese wurden bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Mit 2 ml Medium wurde das Zellpellet resuspendiert. Für die Zellzählung in einer Neubauerkammer wurden die Zellen 1:4 mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau eignet sich sehr gut als Färbung für die Zellzählung, da es nur beschädigte Zellmembranen durchdringen kann und die vitalen Zellen dadurch auf dem blauen Hintergrund unter dem Mikroskop hell erscheinen und somit leicht zu identifizieren sind. Die Zellzahl wurde mit Einfriermedium auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspensionen auf Kryoröhrchen verteilt. Zunächst wurden diese für 3 Tage bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, bevor sie anschließend in flüssigem Stickstoff überführt und eingelagert wurden.

### 2.2.2 Herstellung von Platelet-Rich-Plasma (PRP)

Für die Herstellung von Platelet-Rich-Plasma (PRP) wurde frisches Schweineblut aus einem Schlachthof verwendet. Zur Vorbereitung wurden jeweils 5 ml Calciumcitrat zur Antikoagulation in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, was 10 % des Gefäßvolumens entsprach und einer Citratkonzentration von 1:9 in Anlehnung an die Methode von Anitua et al. (Anitua, Andia et al. 2004; Drengk, Zapf et al. 2009).

Direkt nach dem Eröffnen der Halsschlagader während des Schlachtvorgangs wurden vor Ort ca. 50 ml Schweineblut steril in jedes Falcon-Röhrchen mit Calciumcitrat aufgenommen und die Proben anschließend gekühlt ins Labor transportiert. Das Blut wurde bei  $300 \times g$  für insgesamt 10 min in der Megafuge (Heraeus) zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde mit einer Pipette aufgenommen und in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit einer Umdrehungszahl von 3200 rpm ( $2140 \times g$ ) für 15 min. Während dieses Schrittes erfolgte eine Trennung zwischen dem Platelet-Poor-Plasma (PPP) als Überstand und dem PRP in Form eines Thrombozytenpellets. Das PPP wurde abpipettiert und in ein separates 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Zur Fertigstellung des PRPs wurde das Thrombozytenpellet in 125  $\mu\text{l}$ , des vorher gewonnenen und asservierten Blutplasmas resuspendiert. Um den Erfolg der Zentrifugationsschritte zu überprüfen wurden die

Thrombozytenzahlen im gewonnenen PRP, PPP und Plasma mit einem automatischen Zellcounter bestimmt. Als PRP gelten nur Lösungen mit einer Thrombozytenkonzentration von minimal 4,5 – 5 facher Steigerung der Ausgangsthrombozytenkonzentration (Marx 2001). Zur Vermeidung von Messfehlern bei der Bestimmung der Zellzahl wurden 200µl des PRP, PPP und Plasmas im Verhältnis 1 : 5 mit PBS-Lösung verdünnt. Nach der Bestimmung der Thrombozytenkonzentrationen wurde das PRP, PPP und Plasma zur Lagerung bei - 80°C eingefroren.

### **2.2.3 ELISA zur quantitativen Bestimmung von Wachstumsfaktoren**

Da man davon ausgeht, dass die Wirkung des PRP auf verschiedene Arten von Geweben auf dem hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren beruht, wurde der Gehalt an den wichtigsten im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren bestimmt. Alle Bestimmungen der Wachstumsfaktoren erfolgten mit kommerziellen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Kits von R&D-Systems, welche alle auf dem gleichen Prinzip beruhen (siehe Abbildung 5). Zunächst wurde mit Hilfe einer Standardlösung eine Verdünnungsreihe erstellt, anhand derer am Ende eine Standardkurve errechnet wird. Die Proben werden nach den Vorgaben für den jeweiligen ELISA vorbereitet und zusammen mit einem Verdünnungsmittel in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Auf einem Schüttler werden die Platten bei Raumtemperatur für die im Testkit angegebene Zeit inkubiert. Die in den Proben und im Standard enthaltenen Wachstumsfaktoren binden während dessen an spezifische monoklonale Antikörper mit welchen die Mikrotiterplatten vorbeschichtet sind. Mittels eines Waschvorgangs werden alle ungebundenen Substanzen aus den Wells gewaschen. Im Anschluss wird Konjugat dazu gegeben. Das Konjugat besteht aus einem für den jeweiligen Wachstumsfaktor spezifischen monoklonalen Antikörper, an den ein Enzym gebunden ist. Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt und Waschvorgang. Anschließend gibt man ein Substrat auf die Wells, welches von dem an den Antikörperkomplex gebundenen Enzym umgesetzt wird und als Farbumschlag in Erscheinung tritt. Je nachdem wie viel Wachstumsfaktor zu Beginn vorhanden war, desto intensiver oder weniger intensiv ist der Farbumschlag am Ende. Mit einer Stopplösung wird die enzymatische Reaktion gestoppt und das Ergebnis mit dem Photometer gemessen.

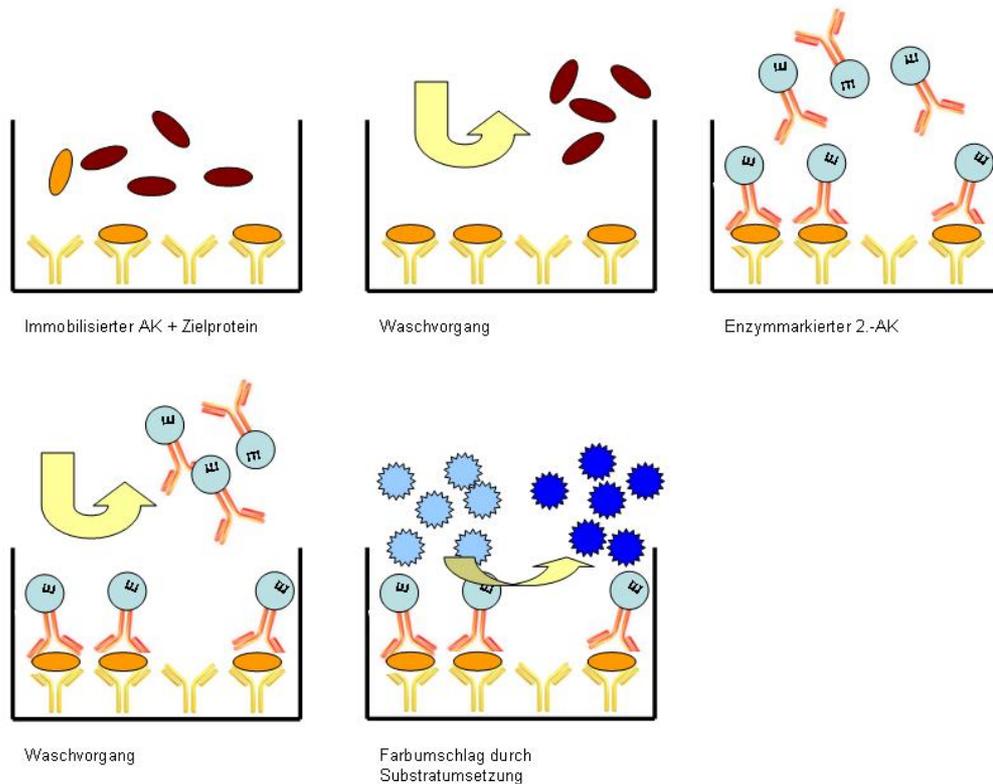


Abbildung 5 Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### 2.2.4 Der Versuchsansatz

Pro Schwein wurden zwei Kryoröhrchen mit Zellen für den Versuchsansatz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 12 ml RPMI-Medium aufgenommen. Die Suspensionen wurden direkt bei 1800 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen verteilt. Jede Kulturflasche wurde mit ca. 12 ml Medium aufgefüllt und anschließend im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurde unter der sterilen Werkbank ein Teil des verbrauchten Mediums aus den Kulturflaschen entfernt und mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden solange im Brutschrank belassen bis bei der regelmäßigen Kontrolle unter dem Mikroskop ein dichter Zellrasen zu erkennen war. Als die Zellen ausreichend herangereift waren, wurden diese mit Trypsin geerntet und eine Zellsuspension mit

einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml durch Verdünnen mit RPMI-Medium hergestellt. Für den Testansatz wurden 12-Well-Zellkulturplatten verwendet. Zunächst wurde in jede Vertiefung 1 ml der Zellsuspension pipettiert. Eppendorfgefäße mit eingefrorenem PRP, PPP und Plasma wurden aufgetaut und mit Calciumchlorid wie im Folgenden beschrieben aktiviert. Um eine 100 %ige Lösung zu erhalten wurden 150 µl PRP bzw. PPP oder Plasma mit 40 mM Calciumchlorid vermengt. Für die Herstellung einer ausreichenden Menge der Substanz wurden 900 µl PRP mit 40 mM Calciumchlorid in ein Eppendorfgefäß gegeben und der Ansatz gut durchmischt. Ebenso wurde mit dem PPP und Plasma verfahren. Die aktivierten Ansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 13300 U/min für 15 min scharf zentrifugiert. Der Überstand wurde für den Test verwendet. Auf der 12-Well Platte wurden PRP und PPP in Konzentrationen von 5 %, 10 % und 20 % aufgebracht (siehe Abbildung 6). Die Wirkung von aktiviertem Plasma auf die Chondrozyten wurde als Kontrolle in einer 5 %igen Konzentration untersucht. Als Kontrollgruppe diente des Weiteren ein Ansatz mit reinem Calciumchlorid. Es wurden jeweils 40 mM des Aktivierungsmittels in ein Well gegeben. Thrombin wurde in den Konzentrationen 1,8 U/ml, 18 U/ml und 91 U/ml getestet. Jeweils 100 µl wurden zu den 1 ml Zellsuspension in den entsprechenden Vertiefungen der 12-Well-Platte gegeben. Die Zellansätze wurden für insgesamt vier Tage im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C bebrütet. Danach wurden die Chondrozyten mit Trypsin geerntet und die Zellen pro Well in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die Tubes wurden bei 13300 U/min für 1 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet bei - 80°C eingefroren.

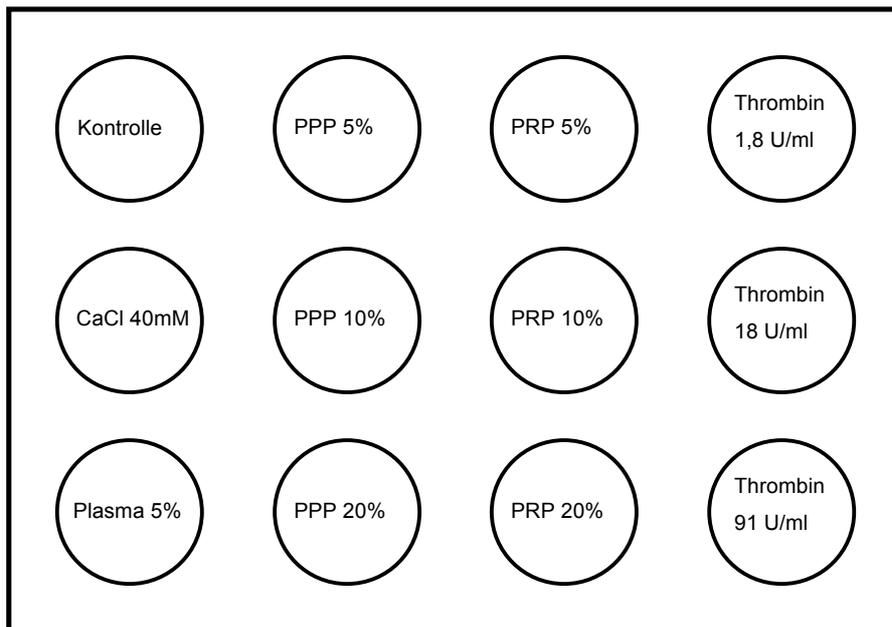


Abbildung 6 Layout einer 12-Well-Zellkulturplatte für den Versuchsansatz

### 2.2.5 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) Proliferationstest

Mit Hilfe des BrdU-Tests wurde die Quantifizierung der Zellproliferation vorgenommen. Dafür wurden zunächst Knorpelzellen der Schweine 1 - 5 (erste Passage) aufgetaut und in einer mittleren Zellkulturflasche mit RPMI-1640 +10 % FCS + 1 % P/S/N kultiviert. Nach Erreichen eines gedeckten Zellkulturrasens in der Monolayerkultur wurden die Chondrozyten mittels Trypsin/EDTA geerntet und die Zellsuspension auf eine Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Für den Testansatz wurden auf eine 96er-Mikrotiterplatte pro Well 100  $\mu$ l der Zellsuspension gegeben. PRP und PPP wurden in Konzentrationen von 5 %, 10 % und 20 % untersucht. Zusätzlich wurden 5 % Plasmaüberstand und 40 mM Calciumchlorid pipettiert. Thrombin wurde in Konzentrationen von 1,8 U/ml, 18 U/ml und 91 U/ml getestet. Die Ansätze wurden für vier Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Der BrdU-Assay wurde nach der Inkubationszeit nach Anleitung des Herstellers folgendermaßen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das BrdU-labeling reagent mit sterilem Zellkulturmedium 1 : 100 verdünnt und 10  $\mu$ l der verdünnten Lösung in jedes Well pipettiert. Der Ansatz wurde weitere 8 – 16 h im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Im folgenden Schritt wurde der Überstand über den adhärennten Zel-

len verworfen und pro Well 200 µl Fixierlösung in die Vertiefungen gegeben. Bei Raumtemperatur wurden die Platten für 30 min inkubiert. Im dritten Schritt wurde die Fixierlösung abgeschüttet und mit 100 µl Anti-BrdU POD-Verdünnung pro Well erneut für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Platte dreimal mit jeweils 300 µl Waschlösung pro Well gewaschen. Im fünften Schritt wurden 100 µl Substrat in jede Vertiefung gegeben, weitere 30 min inkubiert und am Ende der Inkubationszeit die Reaktion mit 25 µl Stopp-Lösung beendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm im Photometer (Victor 3, Perkin-Elmer).

### **2.2.6 RNA-Isolierung mittels TRIZOL®**

Für die weiterführenden Untersuchungen zur Überprüfung der Genexpression chondrozyten-spezifischer Proteine, wurde aus den Chondrozyten des Versuchsansatzes die mRNA isoliert. Dazu wurden die gefrorenen Zellpellets mit 1 ml auf  $5 \times 10^6$  Zellen Trizol®-Reagenz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgetaut und homogenisiert. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Phasenseparation wurden 200 µl Chloroform in die Tubes gegeben und diese für 15 sec auf dem Vortexer gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 3 - 15 min, bis sich deutlich eine wässrige Phase, welche die RNA enthielt, abgetrennt hatte. Die Suspensionen wurden bei 11200 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgezogen und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die weiße DNA-Phase und die Phenol-Chloroform-Phase mit Proteinen, die sich ebenfalls nach der Phasenseparation abzeichneten, wurden verworfen. Zu jeder Probe wurden 500 µl Isopropanol pro ml Trizol gegeben. Die Ansätze wurden kräftig gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit präzipitierte die RNA. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 11200 rpm und 4°C für 10 min wurde der Überstand abgezogen und die RNA blieb als Pellet zurück. Mit 1 ml 75 %igem Ethanol wurde die RNA gewaschen und anschließend bei 8800 rpm und 4°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und das Pellet anschließend im offenen Gefäß getrocknet bis das Ethanol verdampft war. Dabei war darauf zu achten, dass die RNA nicht völlig austrocknete, da es ansonsten nicht mehr möglich gewesen wäre diese zu resuspendieren. Mit 10 –

50 µl sterilem RNase-freiem H<sub>2</sub>O wurde die RNA gelöst und anschließend quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde mit jeder Probe eine Verdünnung von 1 : 50 mit Wasser hergestellt. Mittels Photometer (Eppendorf) wurden die Absorptionen gemessen. An Hand der Formel  $[RNA] = A_{260} \times 40 \times 50$  (Verdünnungsfaktor) (ng/µl bzw. µg/ml) wurde die Menge an RNA in den einzelnen Proben berechnet. Dabei stellt die Zahl 40 einen RNA-spezifischen Faktor dar, welcher einer Lösung mit einem Gehalt von ungefähr 40 ng/µl RNA und einer optischer Dichte von 1 entspricht. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 und 280 nm ist ein Maß für die Verunreinigung durch Proteine. Der Wert sollte größer als 1.7 sein, damit gewährleistet ist, dass nur RNA gleichmäßiger Reinheit in den Versuchen eingesetzt wird.

### 2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.7.1 Reverse Transkription (RT)

Das Verfahren der reversen Transkription (RT) wird genutzt um instabile mRNA in stabile komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben und wird meistens der PCR vorgeschaltet, wenn RNA amplifiziert werden soll (siehe Abbildung 7). Die mRNA wird unter Einsatz von oligo dT Primern, die sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in die cDNA umgeschrieben. Die aufgereinigte RNA wurde zunächst auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl mit Wasser verdünnt und der Mastermix (siehe Tabelle 1) für die RT-PCR angesetzt.

10 x RT-Buffer	2 µl
dNTP Mix (je 5 mM)	2 µl
Oligo dT (20 µM)	1 µl
RNase Inhibitors (40 U/µl)	0,25 µl
Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/µl)	0,25 µl
RNase-Free Water	4,5 µl
1µg RNA	10 µl

**Tabelle 1 Mastermix für die RT-PCR (20 µl)**

Die Ansätze wurden für 60 min bei 37°C in einem Blockcycler (MyCycler, BioRad) inkubiert. Anschließend wurde die gewonnene cDNA bis zur PCR bei - 20 °C gelagert.

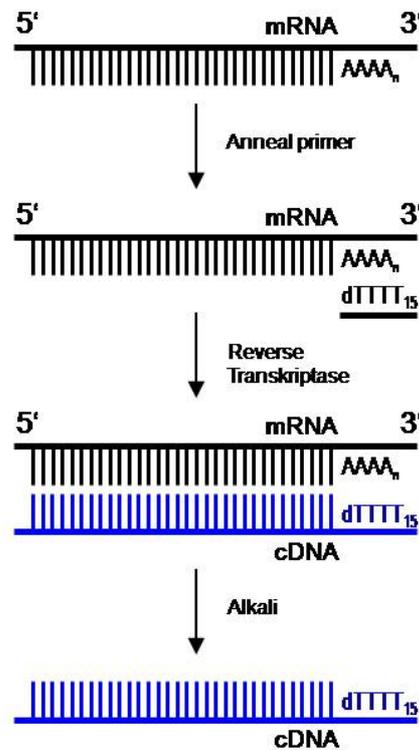


Abbildung 7 Prinzip der reversen Transkription

### 2.2.7.2 PCR

Die PCR ist eine im Jahre 1983 von Kary Mullis entwickelte und seitdem bewährte in vitro Methode zur Vervielfältigung von DNA (Mullis, Faloona et al. 1992). Sie besteht aus einem sich wiederholenden Zyklus aus drei Schritten, der Denaturierung (Melting), der Hybridisierung (Primerannealing) und der Elongation (Extending) (siehe Abbildung 8). Das Prinzip basiert vor allem auf der Verwendung des thermostabilen Enzyms Taq-Polymerase, die fähig ist auch unter hohen Temperaturen an einem DNA-Einzelstrang einen komplementären Strang zu synthetisieren. Alle zur DNA-Amplifikation notwendigen Substanzen werden vor Ablauf der PCR in einem so-

nannten Mastermix angesetzt (siehe Tabelle 2). Dazu gehören neben der Polymerase auch die Primer. Diese sind kurze DNA-Sequenzen, welche sich am DNA-Strang anlagern und als Start-Punkte für die Taq-Polymerase dienen. Mit ihrer Hilfe ist es möglich definierte Abschnitte der DNA für die Amplifikation festzulegen. Zu Beginn der PCR wird der Mastermix im Thermocycler auf 95°C erhitzt und die DNA und Primer damit denaturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotidtriphosphaten werden dabei aufgebrochen und sowohl DNA als auch Primer liegen am Ende des ersten Schrittes als Einzelstränge vor. Im zweiten Schritt wird die Temperatur herabgesetzt. Sie sollte möglichst 5°C unter dem Schmelzpunkt der verwendeten Primer liegen und wird von der Länge und Sequenz der Primer bestimmt. Während der Hybridisierung lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Im letzten Schritt wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase von ca. 72°C erhöht. Beginnend auf Höhe der Primer und auf dem Strang fortlaufend, synthetisieren die Polymerasen die komplementären Stränge, in dem sie die im Mastermix enthaltenen Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) in 5'→3'-Richtung aneinander reihen. Diese Schritte werden in einem Zyklus 20 - 40 mal wiederholt, bis sich, limitiert durch den Verbrauch der Substanzen im Mastermix, eine Plateauphase einstellt. In jedem Zyklus wird die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt und steigt mit jeder Amplifikation exponentiell.

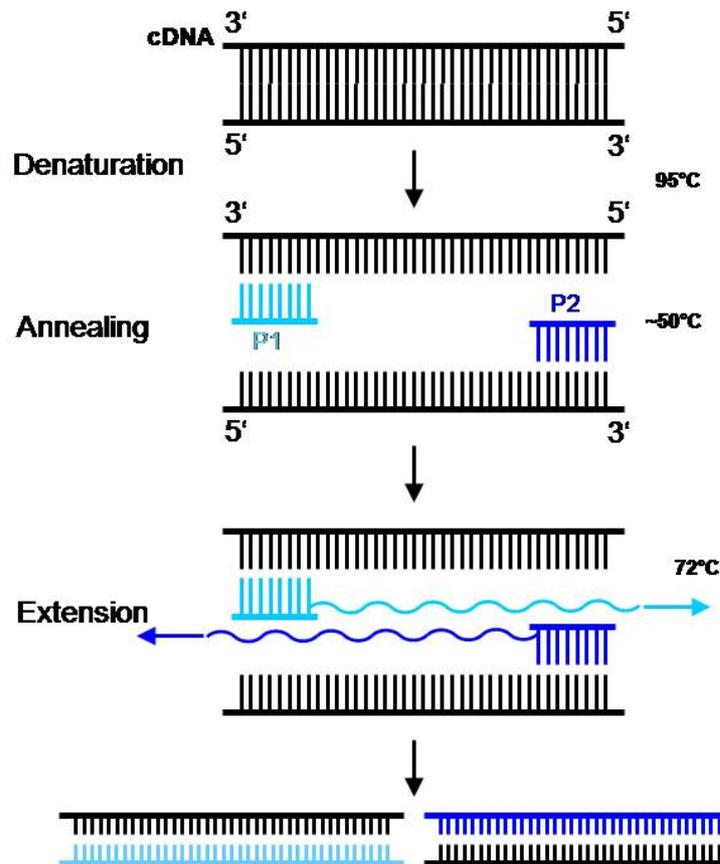


Abbildung 8 Prinzip der PCR

Während der Durchführung der PCR zur Amplifikation der Genabschnitte für Collagen Typ 1 und Aggrecan wurde GAPDH, da es als Housekeeping-Gen keiner Veränderung im Wachstum unterliegt, zur Kontrolle mit vervielfältigt. Der Mastermix wurde unter Nutzung von Taq PCR Core Kit (Qiagen) angesetzt.

RT-Ansatzes (cDNA)	5 µl
10 x PCR Buffer (+15 mM MgCl <sub>2</sub> ),	5 µl
dNTP Mix (je 10 µM),	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl),	0,25 µl
Wasser (Eppendorf),	36,75 µl
Primer sense (20 pmol/µl)	1 µl
Primer antisense(20 pmol/µl)	1 µl

Tabelle 2 Mastermix für PCR (50 µl)

Die PCR lief in einem Thermocycler ab und startete mit einer Denaturierung für 5 min bei 94°C. Das Annealing im zweiten Schritt erfolgte jeweils für 1 min bei 56°C für Collagen-I, 68°C für Aggrecan bzw. 59°C für GAPDH. Im letzten Schritt wurden die Proben noch einmal für 5 min auf 72°C für die Elongation erhitzt. Für die Amplifikation von Collagen-I wurden 16 Zyklen durchlaufen, für GAPDH 18 und für Aggrecan 28 Zyklen. Jeweils 20 µl der PCR-Produkte wurden im Anschluss mit 2,5 µl SyBr Gold (Invitrogen) versetzt und auf ein 1,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Es wurde ein Gellauf von 45 min bei 80 Volt angeschlossen und das Gel anschließend mit der ChemiDoc-Anlage (BioRad) unter UV-Licht visualisiert. Die semiquantitative Auswertung erfolgte unter Verwendung der Quantity One Software (BioRad).

### 2.2.8 Western Blot zum Nachweis von Collagen I

#### 2.2.8.1 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Um Proteine einer Probe mit Hilfe des Western Blots nachzuweisen, müssen diese zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Dazu wurden die Zellpellets mit einer der Pelletgröße entsprechenden Menge an RIPA-Puffer und Proteasen-Inhibitoren (Complete) resuspendiert und gut gemischt. Der RIPA-Puffer dient sowohl der Zellyse, als auch der Proteinstabilisierung. Die Zellsuspensionen wurden jeweils zwei Mal für 30 sec sonifiziert, wobei durch Ultraschall die Zellstrukturen aufgebrochen wurden. Der gesamte Vorgang fand auf einem Eisblock statt um die Struktur der Proteine zu erhalten. Der Proteinstandard, an Hand dessen die Quantifizierung der Konzentrationsbestimmung erfolgte, wurde mit RIPA-Puffer 1 : 2 verdünnt. Die Verdünnung entsprach einer Konzentration von 5 µg/µl Protein. Nach folgendem Schema (Tabelle 3) wurde eine Verdünnungsreihe aus der Standardlösung für die Standardkurve hergestellt.

Konzentration (µg/µl)	BSA-Standard (µl)	RIPA-Puffer (µl)
1,4	5,6	14,4
1,2	4,8	15,2
1,0	4	16

0,8	3,2	16,8
0,5	2	18
0,2	2	48
0	0	PBS als Blank

**Tabelle 3** Pipettierschema für Standardverdünnungsreihe

Auf einer 96 Well-Mikrotiterplatte wurden jeweils 5 µl der Proben (1 : 4 Verdünnung) bzw. der Standardverdünnungen im Doppelansatz aufgetragen und die Proteinkonzentrationsbestimmung unter Verwendung des DC-Protein-Assay-Kit (BioRad) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 2.2.8.2 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Dem Western Blot wird eine Gelelektrophorese vorangestellt, durch welche die Proteine an Hand ihrer Größe in kDa und ihrer Ladung aufgetrennt werden. Dabei wird eine Spannung an das Gel angelegt und die negativ geladenen Proteine wandern im Gel zur positiv geladenen Anode. Je kleiner die Moleküle sind und je größer ihre negative Ladung, desto schneller wandern sie in Richtung des positiven Pols und werden dadurch während des Gellaufs aufgetrennt. Collagen-I ist ein Protein mit einer Größe von 90 kDa und lässt sich am besten in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel von den anderen Proteinen separieren. Für den Gießvorgang wurden die zu verwendenden 1,5 mm dicken Glasplatten mit 70 %igem Ethanol gereinigt und in die Gelgießapparatur eingespannt. Die Komponenten des Trenngels (siehe Tabelle 4) wurden in einem Becherglas vermischt und die Lösung mit einer Pipette zwischen die Glasplatten gegossen. Das Trenngel, welches dem eigentlichen Gellauf dient, wurde mit 70 %igem Ethanol überschichtet und zur Polymerisation 15 min stehen gelassen. Das Ethanol wurde anschließend abgegossen und durch das Sammelgel (siehe Tabelle 4) ersetzt. In das festere Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, der als Spacer für die Slots diente und das Gel für 10 min der Polymerisierung überlassen. Die Slots sind Geltaschen, in welche die Proben für den Gellauf aufgetragen werden.

Komponenten	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid	2,5 ml	650 µl
H <sub>2</sub> O	3,125 ml	3 ml
4 x Puffer	1,875 ml (Trenngelpuffer)	1,25ml (Sammelgelpuffer)
TEMED	10µl	10µl
10 % APS	25 µl	25 µl

**Tabelle 4** Zusammensetzung der Gele

### 2.2.8.3 SDS-Page

Für den Gellauf wurden die Proben mit Laemmli-Puffer und 5 % Mercaptoethanol versetzt und auf einer Heizplatte für 5 min bei 95°C erhitzt. Der Puffer enthält den Farbstoff Bromphenolblau, der es ermöglicht den Endpunkt des Gellaufs zu bestimmen, da er das Probenmaterial sichtbar macht. Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad) eingespannt, die Kämme entfernt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Taschen des Sammelgels wurden mit den Proben und einem Standard-Marker beladen. Der Marker enthält Proteine in definierten Größen, an Hand deren Banden im Anschluss die gesuchten Proteine identifiziert werden können. An die Elektrophorese-Kammer (Power Pac HC, BioRad) wurde eine Spannung von zunächst 60 Volt angelegt und der Lauf gestartet. Die Proben sammelten sich auf einer Linie am Ende des Sammelgels. Kurz vor dem Übertritt der Proteine in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht. Nach 1 - 2 h wurde der Gellauf gestoppt. Der Laufpuffer wurde mit Hilfe von Wasser vom Gel gewaschen und das Gel anschließend für 15 min in Transferpuffer äquilibriert.

### 2.2.8.4 Western Blot

Als Western Blot oder Immunoblot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Es wurde ein Semi-Dry-Blot angewendet, bei dem ein kleineres Volumen an höher konzentriertem Transferpuffer verwendet wird als beim Wet-Blot. Zur Vorbereitung wurde eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm, BioRad) auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer durchtränkt. Ebenfalls wurden zwei Stücke Blotting Filterpapier von 2,5 mm Dicke in ein flaches Gefäß mit Transferpuffer gelegt und sämtliche Luftblasen mit einem Blotting-Roller

durch Druck auf das Filterpapier entfernt. Luftblasen können den Transfer der Proteine blockieren und sollten deshalb möglichst komplett entfernt werden. Die beiden Stücke des durchtränkten Filterpapiers wurden auf der Anodenplatte des Semi-Dry-Blotters platziert und die Luftblasen erneut mit dem Roller entfernt. Auf das Filterpapier wurde die nasse Nitrocellulose-Membran gelegt und die Luftblasen entfernt. Vorsichtig wurde das Gel aus dem Transferpuffer genommen und auf die Membran gelegt. Mit einem behandschuhten Finger wurden vorhandene Luftblasen ausgestrichen und zwei weitere durchtränkte Filterpapier-Stücke auf den Stapel gelegt und gerollert. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und unter Aufbau gleichmäßigen Druckes an allen Seiten mit Schrauben festgedreht. Eine Spannung von 24 Volt wurde vertikal zum Gel angelegt und der Transfer über 120 min vollzogen. Die Proteine wanderten dabei in Richtung der positiv geladenen Anode aus dem Gel und wurden von der darunter platzierten Blotting-Membran aufgefangen. Für die Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde das Gel für 2 min mit Ponceau-S angefärbt. Die Banden wurden als rote Streifen sichtbar und die Membran mit TBS/0,1 % Tween20 wieder entfärbt.

### 2.2.8.5 Immunmarkierung

Die Proteinbanden auf der Nitrocellulose-Membran wurden mit spezifischen Antikörpern für die Detektion mittels UV-Licht markiert. Die Blotting-Membran wurde zu diesem Zweck in einem Falcon-Tube für 1 h bei Raumtemperatur mit TBS/0,1 % Tween20 und 5 % BSA auf dem Rock'n Roll-Mischer geblockt. Zur Untersuchung der Collagen-I-Proteinexpression wurde die Membran mit einem monoklonalen Anti-Collagen-Typ1-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 1000 in 3 % BSA/TBS/T für 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran drei Mal für 5 min mit jeweils 5 ml TBS/T gewaschen. Mit einem HRP-gekoppelten Anti-Mouse-Antikörper, der an den ersten Antikörper bindet, in einer Verdünnung von 1 : 1000 und einem Anti-Western-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 2000 in TBS/T wurde der Blot ein zweites Mal für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten drei Waschvorgänge für jeweils 5 min mit 5 ml TBS/T. Der Blot wurde mit Pierce®ECL Substratlösung entwickelt und mit der ChemiDoc-Anlage unter UV-Licht detektiert.

Im zweiten Schritt der Immunmarkierung sollte das Protein Aktin auf der Membran markiert werden. Da Collagen Typ I bei 50 kDa liegt und Aktin eine Größe von 40 kDa aufweist, musste der Blot zunächst gestrippt werden. Dabei wurden die gebundenen Antikörper aus der ersten Immunmarkierung entfernt. Die Membran wurde dazu in Stripping-Puffer für 10 min bei 60°C im Wasserbad geschüttelt und anschließend wurden die Reste gründlich mit PBS auf dem Schüttler ausgewaschen. Erneut wurde der Blot mit 5 % BSA-TBS/T für 1 h geblockt um anschließend mit polyklonalem rabbit Anti-Aktin-Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 1000 in 3 % BSA/TBS/T für 1,5 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Drei Waschvorgänge folgten für jeweils 5 min mit 5 ml TBS/T. Eine zweite Inkubation mit Anti-Goat-Antikörpern in einer Verdünnung von 1 : 1000 und Anti-Western-Antikörpern in einer Verdünnung von 1 : 2000 in TBS/T für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde durchgeführt. Den Abschluss der Immunmarkierung bildeten drei Waschvorgänge für 5 min mit jeweils 5 ml TBS/T. Der Blot wurde erneut mit Pierce®ECL Substratlösung entwickelt und mit der ChemiDoc-Anlage unter UV-Licht detektiert und mit Hilfe des Programms Quantity One (BioRad) quantifiziert.

### **2.2.9 ELISA zur quantitativen Bestimmung von Collagen Typ II**

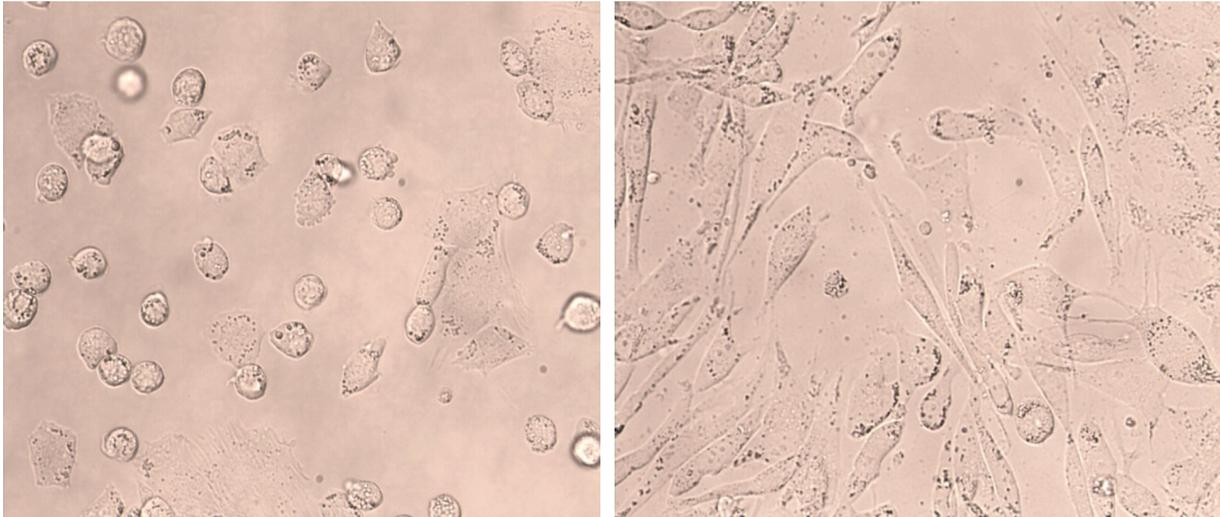
Mit Hilfe eines kommerziellen ELISA – Kits (mdbiosciences) wurde der quantitative Nachweis von Collagen Typ II in den Chondrozyten durchgeführt. Auf die mit Trypsin geernteten Zellen wurden zunächst 500 µl 0,05 M Essigsäure gegeben. Dazu wurden 50 µl Pepsin-Lösung (5 mg/ml aufgelöst in 0,05 M Essigsäure) pipettiert und das Collagen bei 2 - 8 °C unter leichtem Schütteln über Nacht verdaut. Nach der Inkubation wurden 50 µl TBS (10 x) zu den Zellen gegeben und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 8,0 eingestellt. Für den nächsten Schritt wurden 50 µl Pankreas Elastase Lösung (1 mg/ml in TBS 1 x, pH 7,8 – 8,0) zur Zellsuspension pipettiert und die Proben eine weitere Nacht bei 2 - 8 °C auf dem Schüttler inkubiert. In diesem Schritt wurden die Collagene durch das Enzym Elastase in Monomere getrennt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei 10000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand mit Assay Buffer 10fach verdünnt. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstellerangaben.

### **2.3 Statistische Auswertung**

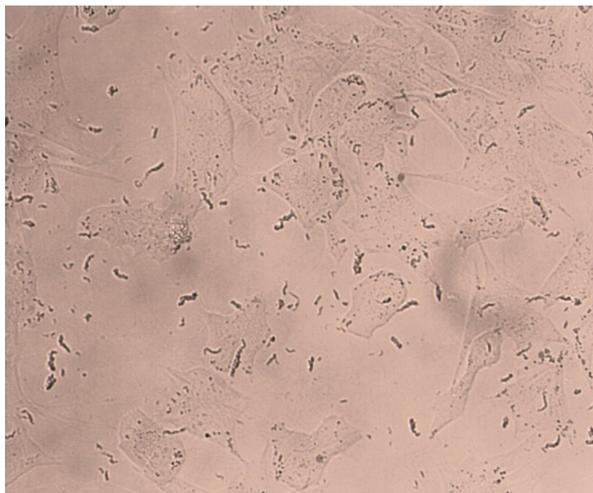
Zur statistischen Auswertung wurde für jede Gruppe von Versuchsergebnissen der Mittelwert ( $\bar{X}$ ) und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) ermittelt. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels ANOVA mit Newman-Keuls Post-Hoc-Test (Graph Pad Prism, Version 5.0, Graph Pad Software, San Diego, CA) bestimmt. P-Werte kleiner als 0,5 wurden als signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

Aus frischem autologem Schweineblut wurde Platelet-Rich Plasma hergestellt und dieses mit Calciumchlorid aktiviert. Der Einfluss des aktivierten PRP auf porcine Chondrozyten wurde an Hand verschiedener Parameter untersucht (Abbildung 9 und 10). Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.



**Abbildung 9 Chondrozyten in 400facher Vergrößerung mit Medium (links) und PRP (rechts) als Zusatz nach 4 Tagen Wachstum im Brutschrank.**



**Abbildung 10 Chondrozyten in 400facher Vergrößerung mit PPP als Zusatz nach 4 Tagen Wachstum im Brutschrank.**

### 3.1 Platelet-Rich Plasma (PRP)

Im Rahmen der experimentellen Studie wurde Platelet-Rich Plasma aus Schweinevollblut hergestellt und für die weiteren Experimente verwendet.

#### 3.1.1 Herstellung von PRP

Um PRP herzustellen folgten wir den Anleitungen von Marx, Weibrich und Spreafico et al., die eine Methode in zwei Zentrifugationsschritten beschreiben (Marx 2001; Weibrich and Kleis 2002; Spreafico, Chellini et al. 2009).

#### 3.1.2 Thrombozytenzahlen

Zur Evaluierung der Qualität des hergestellten PRP und PPP wurden die Thrombozytenzahlen der Proben mittels Zellzählung im Cellcounter (Sysmex) bestimmt.

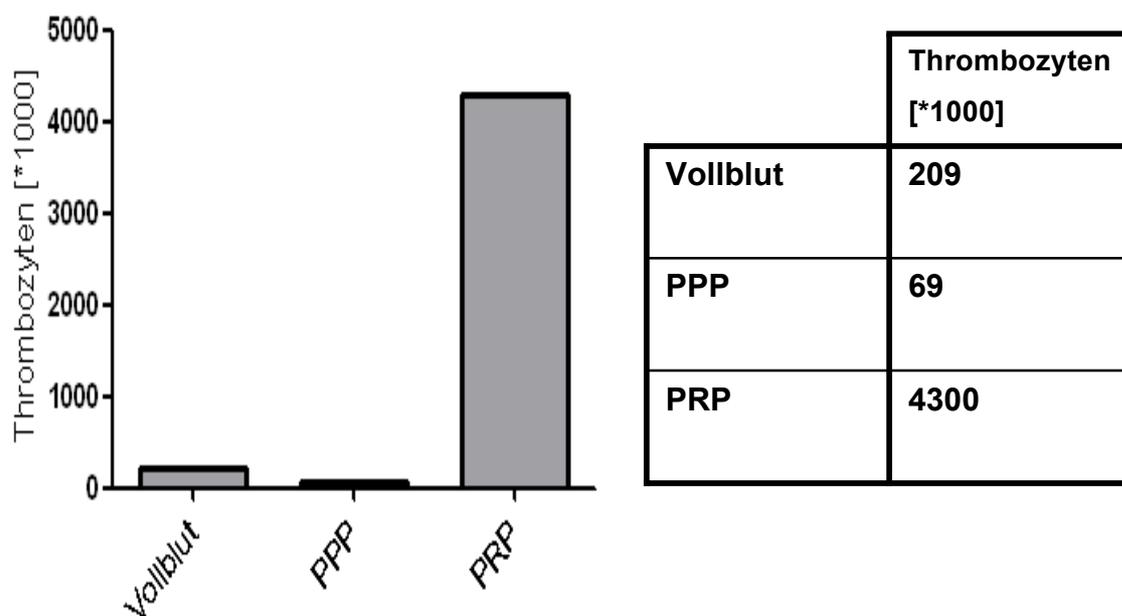


Abbildung 11 Anzahl der Thrombozyten in Vollblut, PPP und PRP

In Abbildung 11 sind die Thrombozytenzahlen als Balkendiagramm und in Tabellenform dargestellt. Die im Vollblut bestimmte Plättchenzahl lag bei 209000 Zellen/ $\mu$ l und damit im Normbereich. Das PRP zeigt eine Thrombozytenkonzentration von 4300000 Zellen/ $\mu$ l. Es konnte demnach eine 20fache Steigerung der Thrombozytenkonzentration durch die Herstellungsmethode erreicht werden. Das PPP enthielt am Ende der Herstellung nur noch 69000 Thrombozyten/ $\mu$ l, was einem Anteil von ca. 33 % der Ursprungskonzentration entspricht.

### 3.2 Wachstumsfaktoren

Wir bestimmten die Konzentrationen von TGF- $\beta$ 2, BMP-2 und BMP-7 im Überstand von mit Calciumchlorid aktiviertem Plasma, PPP und PRP. Dazu wurden kommerzielle ELISA-Testkits (Quantikine®, R&D Systems) verwendet. Die Plasma-, PPP- und PRP-Proben wurden zunächst wie im Versuchsansatz beschrieben mit 40 mM Calciumchlorid aktiviert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert um anschließend bei 13300 U/min zentrifugiert zu werden. Der Überstand der aktivierten Proben wurde im ELISA eingesetzt.

#### 3.2.1 Ergebnisse für TGF- $\beta$ 2

Im Plasma fanden wir eine TGF- $\beta$ 2-Konzentration von 5475,023 pg/ml, im PPP eine Konzentration von 2333,261 pg/ml und im PRP eine Konzentration von 11670,906 pg/ml. Dies entsprach einer Steigerung um das 2,1 fache vom Plasma zum PRP.

#### 3.2.2 Ergebnisse für BMP-2

An BMP-2 fanden sich insgesamt wesentlich geringere Konzentrationen in den Proben. Im aktivierten Plasma konnte der Wachstumsfaktor nicht nachgewiesen werden. Im PPP fand sich eine BMP-2 - Konzentration von 13,6236 pg/ml und im PRP eine Konzentration von 56,0738 pg/ml.

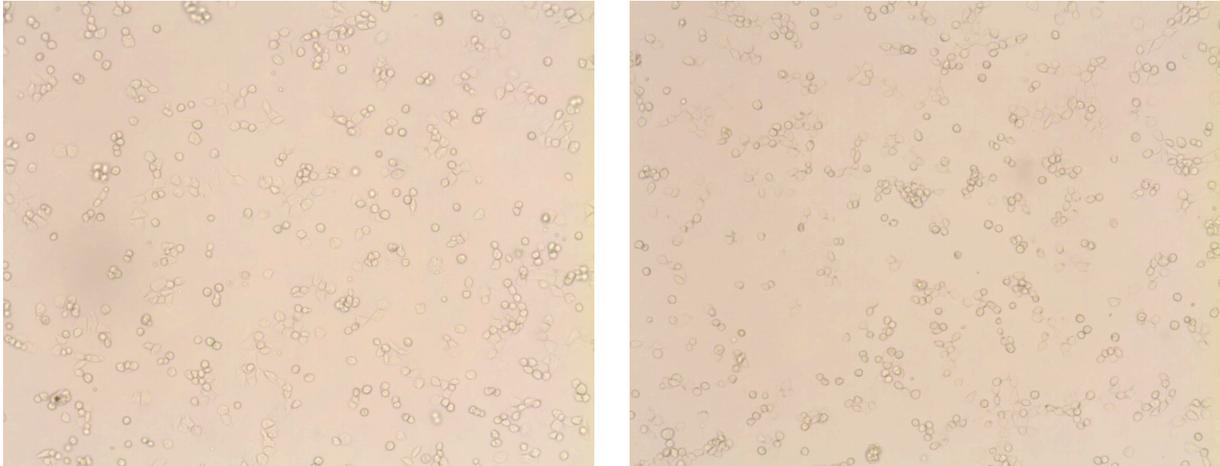
#### 3.2.3 Ergebnisse für BMP-7

Der Wachstumsfaktor BMP-7 konnte weder im Plasma noch im PRP nachgewiesen werden. Im aktivierten PPP wurde eine geringe BMP-7-Konzentration von 7,840 pg/ml gefunden.

---

### 3.3 Mikroskopische Ergebnisse der Versuchsansätze mit Chondrozyten

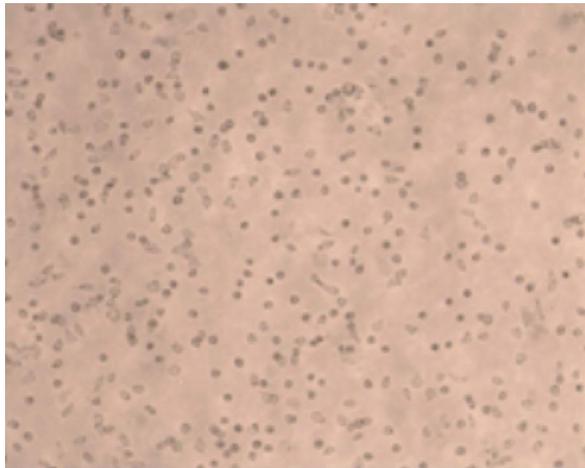
#### 3.3.1 Versuche mit Plasma



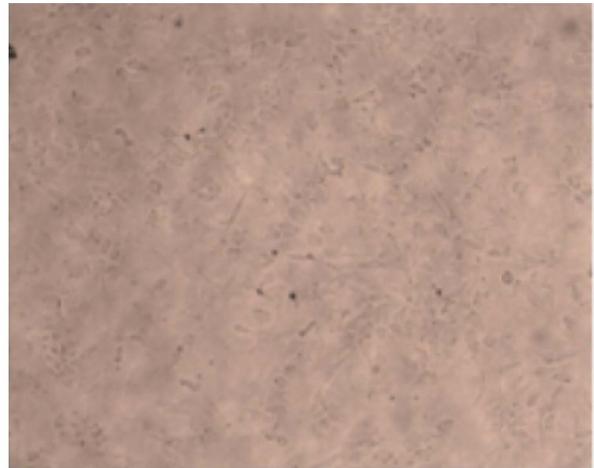
**Abbildung 12 Chondrozyten in Monolayerkultur nach 4 Tagen Wachstum; linkes Bild mit Medium; rechtes Bild mit 5% Plasma (100fache Vergrößerung Phasenkontrastmikroskop)**

Die Bilder mit dem Phasenkontrastmikroskop in Abbildung 12 stellen vergleichend Chondrozyten in Monolayerkultur mit reinem Zellkulturmedium und mit Plasma als Zusatz dar. Nach einer Wachstumszeit von 4 Tagen kam es unter dem Einfluss von 5 %igem Plasmazusatz zu keiner wesentlichen Wachstumsveränderung im Vergleich zu den Chondrozyten mit reinem RMPI-Medium.

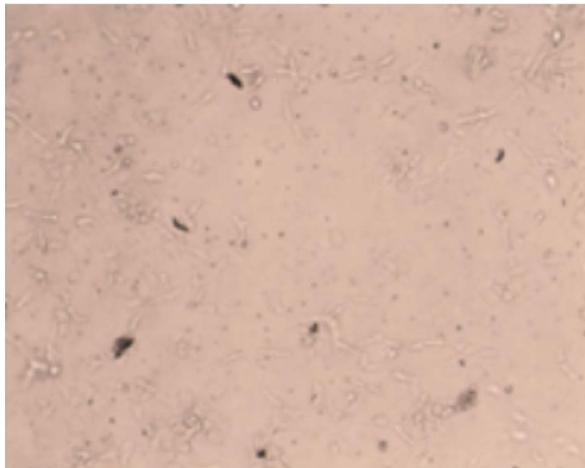
### 3.3.2 Versuche mit PPP



Medium

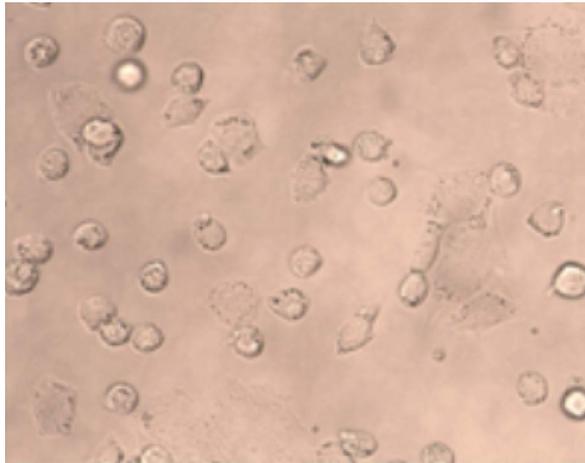


PPP 1%

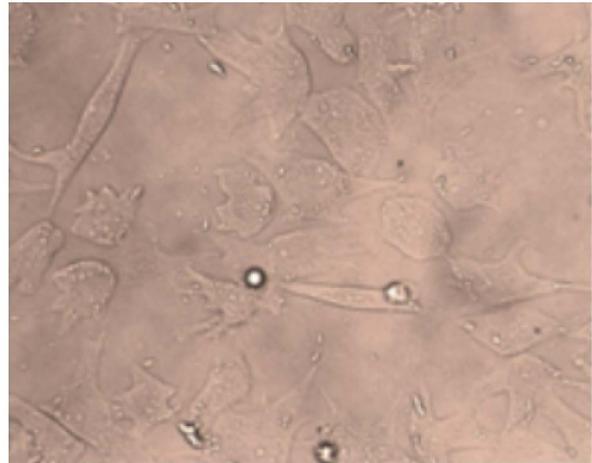


PPP 10%

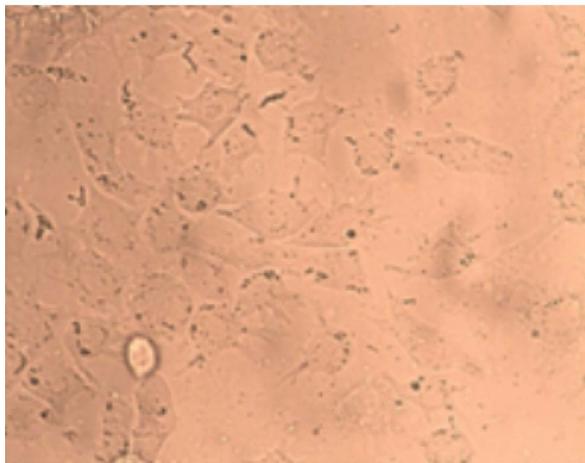
**Abbildung 13 Chondrozyten in Monolayerkultur nach 4 Tagen Wachstum; (100fache Vergrößerung Phasenkontrastmikroskop)**



Medium



PPP 1%

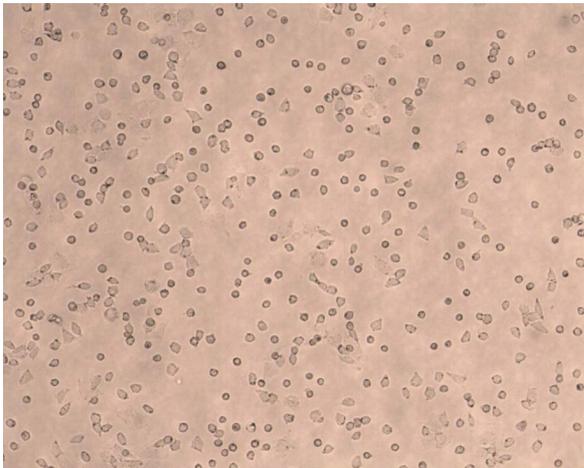


PPP 10%

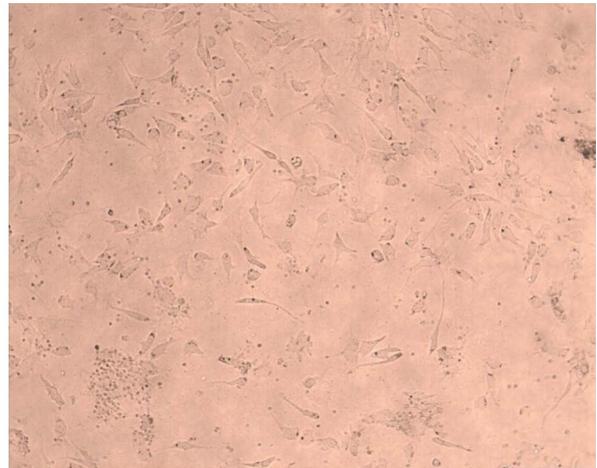
**Abbildung 14 Chondrozyten in Monolayerkultur nach 4 Tagen Wachstum; (400fache Vergrößerung Phasenkontrastmikroskop)**

Die Fotos der Monolayerkulturen der Chondrozyten in Abbildungen 13 und 14 zeigen die Veränderungen der Zellen nach viertägigem Wachstum und PPP-Einfluss unter dem Phasenkontrastmikroskop. Mikroskopisch war in der 400 fachen Vergrößerung sowohl eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zelldichte als auch eine Veränderung des Erscheinungsbildes der Chondrozyten sowohl unter 1 %igem als auch 10 %igem PPP als Zusatz zu erkennen. In der 100 fachen Vergrößerung wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zellprodukte im Kulturmedium sichtbar.

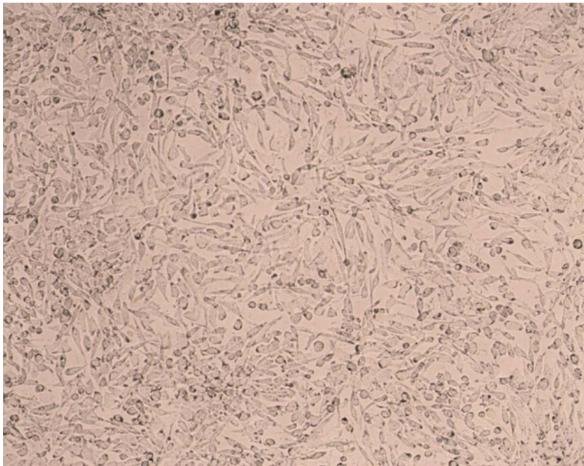
### 3.3.3 Versuche mit PRP



Medium



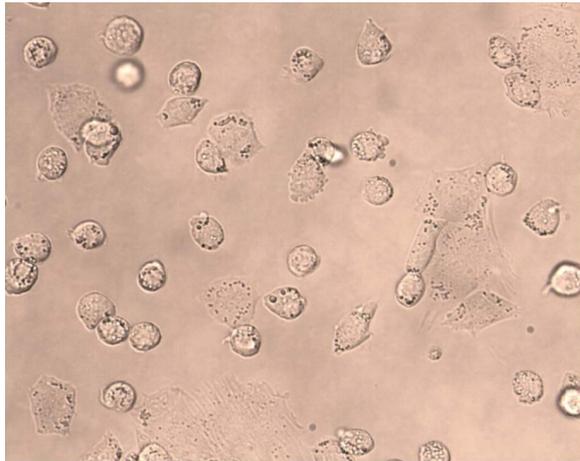
PRP 1%



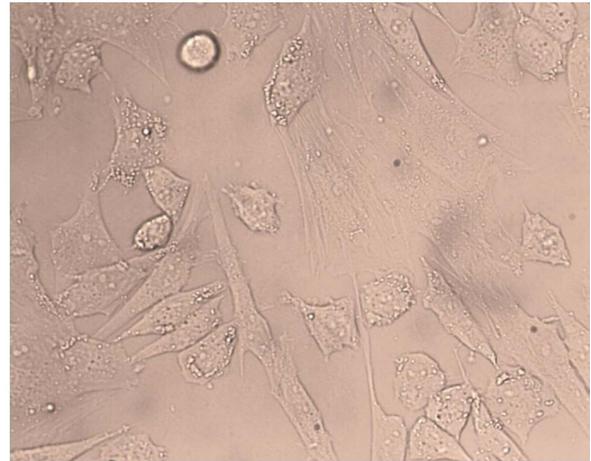
PRP 10%

**Abbildung 15 Chondrozyten in Monolayerkultur nach 4 Tagen Wachstum; (100fache Vergrößerung Phasenkontrastmikroskop)**

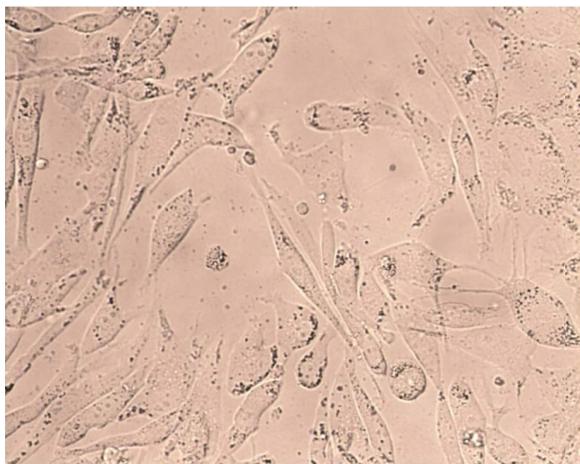
Die Bilder in Abbildung 15 zeigten im Phasenkontrastmikroskop eine deutliche Erhöhung der Zelldichte bei 10 %igem PRP Zusatz im Vergleich zur Kontrolle nach Wachstum mit reinem RPMI-Medium. Die Proliferation war mit 1 %igem PRP im Vergleich zur Kontrolle wenig gesteigert. Es zeigte sich mit steigender Konzentration eine Veränderung der Chondrozytenmorphologie unter PRP Einfluss.



Medium



PRP 1%



PRP 10%

**Abbildung 16 Chondrozyten in Monolayerkultur nach 4 Tagen Wachstum; (400fache Vergrößerung Phasenkontrastmikroskop)**

In Abbildung 16 zeigten sich die gleichen Phänomene wie in Abbildung 15. Deutlicher wurde in der höheren Vergrößerung die morphologische Veränderung der Zellen. Die Chondrozyten veränderten mit zunehmender PRP-Konzentration ihre Form und wurden Fibroblasten ähnlicher.

### 3.4 BrdU

Die Proliferation der Chondrozyten wurde mittels BrdU-Test an Hand der DNA – Vermehrung bestimmt.

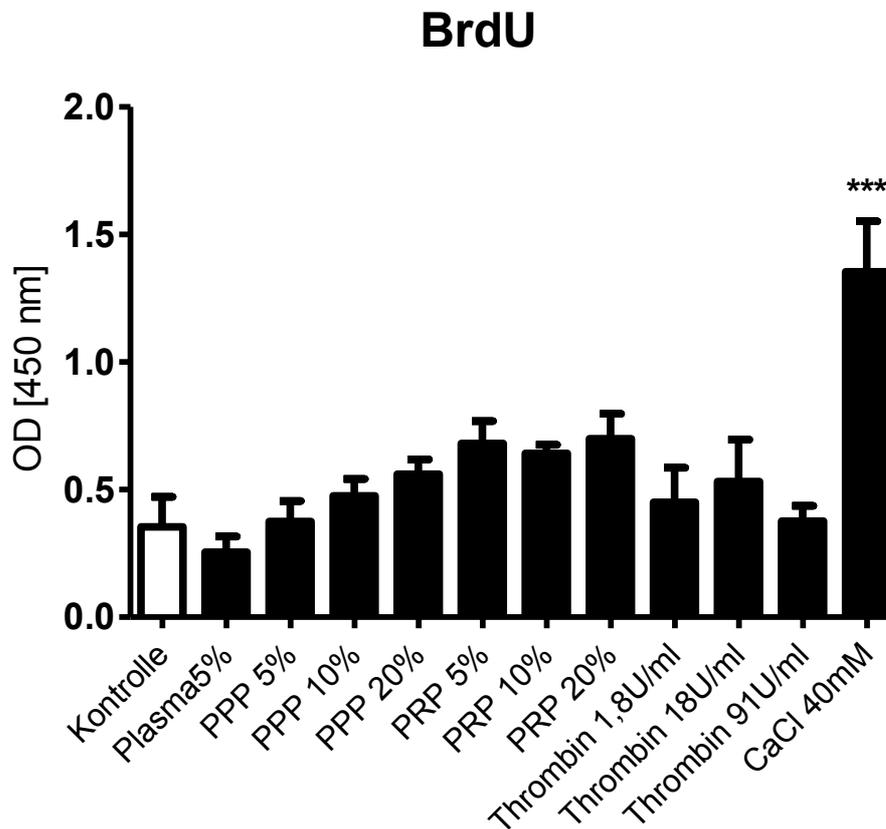


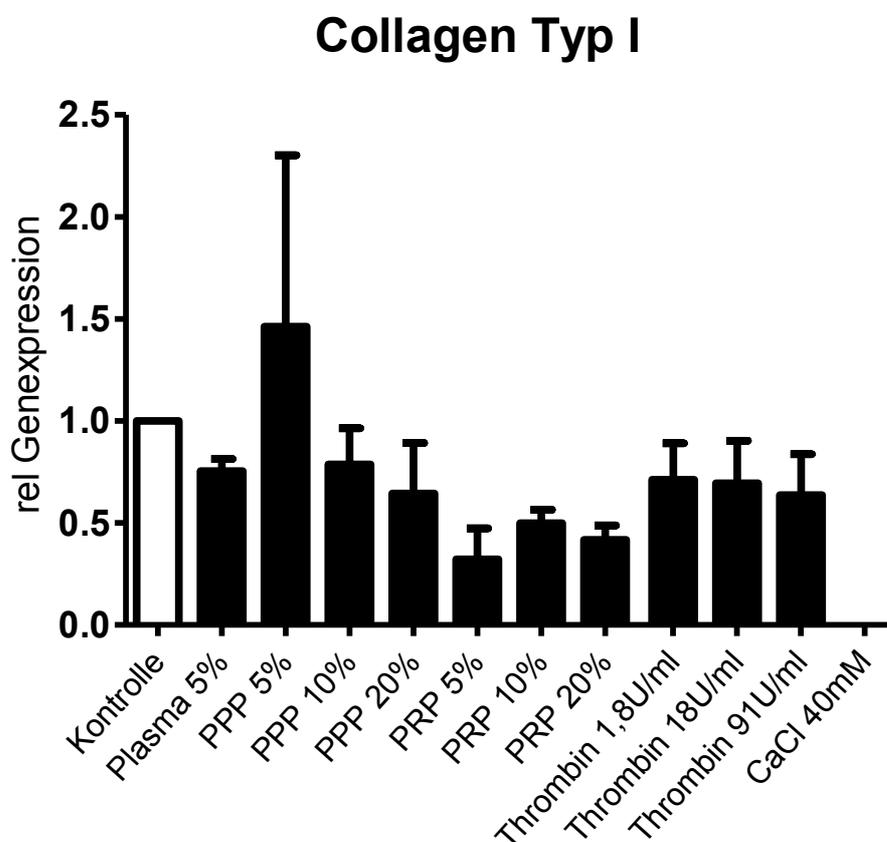
Abbildung 17 Ergebnisse des BrdU-Proliferationstests (\*\*\*)  $p < 0,001$  gegen Kontrolle)

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse des BrdU-Proliferationstestes dargestellt. In dem Balkendiagramm wurden die Proben zur Kontrolle mit reinem RPMI-Medium (+ 10 % FCS + 1 % P/S/N) ins Verhältnis gesetzt. Eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate zur Kontrolle zeigte sich lediglich bei 40 mM Calciumchlorid als Zusatz zum Zellkulturmedium. Plasma führte zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der Proliferationsrate. Eine konzentrationsabhängige Zunahme der Proliferation im Verhältnis zur Kontrolle zeigte sich unter PPP - Zusatz. Im Vergleich zum PPP konnte mit PRP eine weitere Steigerung der Wachstumsrate erreicht werden, welche sich jedoch nicht konzentrationsabhängig darstellte. Die Proliferationssteigerung unter

PRP war nicht signifikant. Die Zellen mit Thrombin zeigten keine Steigerung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.5 PCR zur Bestimmung von Collagen Typ I

Mit Hilfe der PCR wurde die relative Genexpression von Collagen Typ I in den Proben bestimmt. Collagen Typ I dient als Dedifferenzierungsmarker bei der Wachstumskontrolle der Chondrozyten. Als Housekeeping Gen diente GAPDH als Kontrolle.



**Abbildung 18** Relative Genexpression von Collagen Typ I

In Abbildung 18 ist die relative Genexpression der Proben von Collagen Typ I mit den jeweiligen Zusätzen im Vergleich zur Kontrolle mit reinem RPMI-Medium dargestellt. Die Proben wurden ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Bei keiner der Proben zeigte sich eine signifikante Änderung. Die Chondrozyten mit 5 % Plasma als Zusatz zeigten eine relative Abnahme der Collagen Typ I Genexpression im Verhältnis zur Kontrolle. Bei den Proben mit PPP als Zusatz stieg die Genexpression von Collagen Typ

I bei einer Konzentration von 5 % im Vergleich zu Kontrolle an. Unter einer Konzentration von 10 % PPP als Zusatz zeigte sich jedoch ein konzentrationsabhängiger Abfall der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. PRP zeigte keinen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Genexpression der Zellen. Bei allen drei Konzentrationen stellte sich ein Abfall der Collagen Typ I Genexpression dar. Thrombin als Zusatz zum Zellkulturmedium der Chondrozyten bewirkte einen nur leichten, nicht konzentrationsabhängigen Abfall der relativen Genexpression. In den Proben mit 40 mM Calciumchlorid konnte keine Genexpression des Collagens nachgewiesen werden.

### 3.6 Western Blot zur Bestimmung von Collagen Typ I

Die relative Proteinexpression von Collagen Typ I wurde mit Hilfe des Western Blots bestimmt. Dabei diente Aktin als Housekeeping Gen zur Kontrolle.

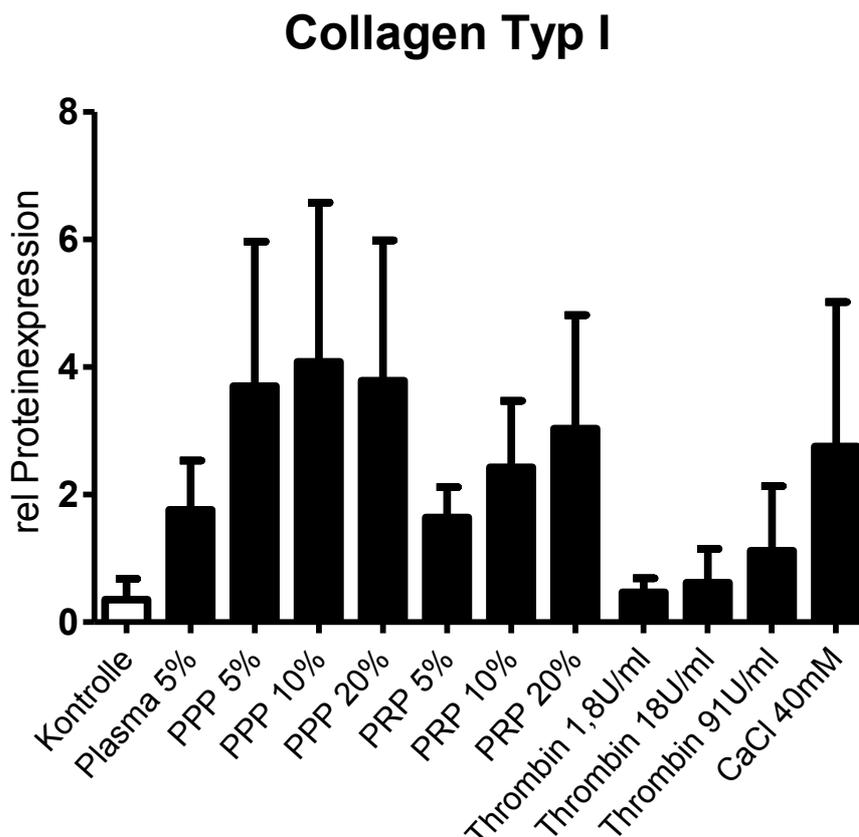


Abbildung 19 Relative Proteinexpression von Collagen Typ I

In Abbildung 19 ist die relative Proteinexpression von Collagen Typ I dargestellt. Dabei konnten keine signifikanten Änderungen unter Einfluss der verschiedenen Zusätze ermittelt werden. Nur bei einer der Proben konnte Collagen Typ I in der Kontrolle gefunden werden, während das Kontrollprotein Aktin durchgängig vorzufinden war. Unter 5 %igem Plasma als Zusatz zum Zellkulturmedium zeigte sich eine geringere Steigerung der Proteinexpression als unter PPP. Der Einfluss von PPP bewirkte im Vergleich zu allen anderen Zusätzen die größte relative Proteinexpression. Dieser Effekt war konzentrationsunabhängig. Eine von der Konzentration abhängige Steigerung der Collagen Typ I Expression im Vergleich zur Kontrolle konnte bei einem Zusatz von 5 – 20 % PRP nachgewiesen werden. Eine geringe, konzentrationsabhängige Steigerung der Expression des Dedifferenzierungsmarkers ließ sich auch unter Thrombin feststellen. Unter 40 mM Calciumchlorid war die relative Proteinexpression von Collagen Typ I ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle gesteigert.

### **3.7 ELISA zur Bestimmung von Collagen Typ II**

Die quantitative Bestimmung des Collagen Typ II Gehaltes der Proben erfolgte mittels kommerziellem ELISA-Kit. Die Änderungen der Konzentrationen des Differenzierungsmarkers unter den verschiedenen Zusätzen wurden ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt.

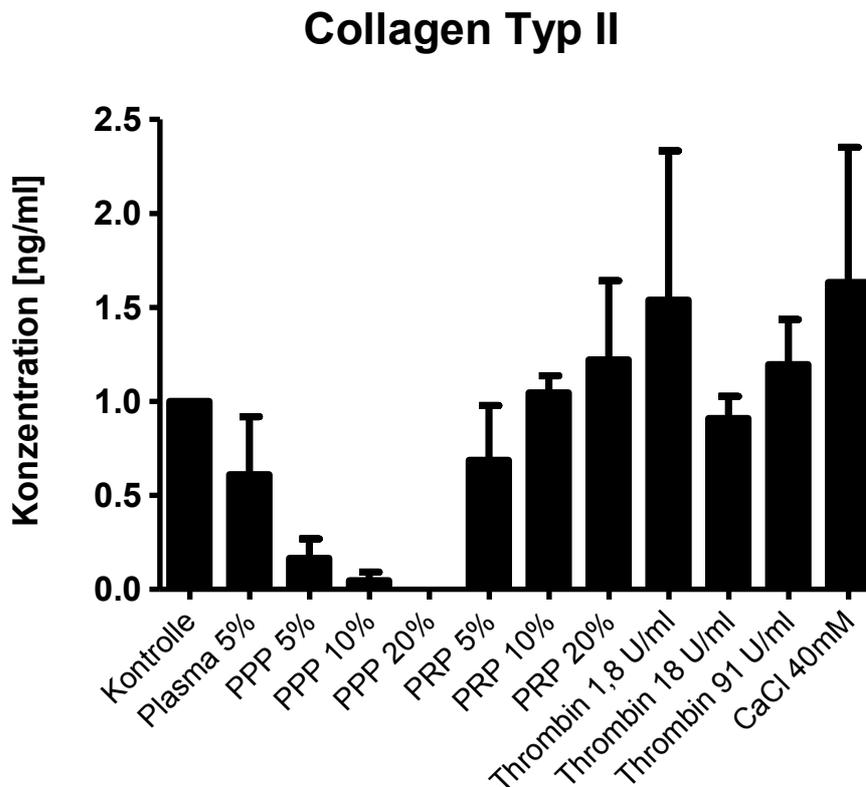


Abbildung 20 Konzentration von Collagen Typ II im Verhältnis zur Kontrolle

Abbildung 20 zeigte, dass es keine signifikante Änderung der Collagen Typ II-Konzentration unter Einfluss eines Zusatzes gab. 5 %iges Plasma bewirkte eine Abnahme der Collagen Typ II Konzentration im Verhältnis zur Kontrolle. Noch deutlicher zeigte sich ein Abfall des Collagen Typ II unter PPP Einfluss. Es ließ sich eine konzentrationsabhängige Abnahme feststellen. Unter 20 % PPP konnte kein Collagen Typ II nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PPP nahm die Konzentration von Collagen Typ II unter Zugabe von PRP zu. Dieser Einfluss zeigte sich unter allen drei PRP - Konzentrationen im Verhältnis zur Kontrolle. Thrombin zeigte in einer Konzentration von 1,8 U/ml und 91 U/ml einen positiven Einfluss auf die Zunahme an Collagen Typ II, während Thrombin in einer Konzentration von 18 U/ml eine leichte Abnahme des Differenzierungsmarkers bewirkte. Die größte Konzentrationszunahme unter allen Zusätzen im Vergleich wurde unter Einfluss von 40 mM Calciumchlorid gefunden. Die Zunahme war aber nicht signifikant.

## 4 Diskussion

Unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage war das Ziel unserer Studie eine eigene und zugleich wirkungsvolle Methode zur Produktion von PRP zu entwickeln und sowohl die Wirkung des Thrombozytenkonzentrates als auch die der Gerinnungsaktivatoren Thrombin und Calciumchlorid auf die Proliferation und Differenzierung porciner Chondrozyten zu überprüfen.

Zur Heilung von Knorpeldefekten gibt es die Möglichkeit sowohl autologe Knorpelzellen *in vitro* zu vermehren und in den Defekt zu injizieren, als auch implantierbare autologe Knorpelzell-Transplantate zu konstruieren. Verschiedene technische Probleme limitieren heute die klinische Anwendbarkeit der *in vitro* Züchtung von humanen Chondrozyten. Darunter fallen die geringe Ausbeute an Knorpelzellen aus den jeweiligen Biopsien, der Trend der Zellen ihre knorpelspezifischen Eigenschaften während der Expansionsphase unter Medium mit FCS-Zusatz zu verlieren und ihre geringe Kapazität zur Redifferenzierung nach der Expansionsphase (Spreafico, Chellini et al. 2009). Chondrozyten durchlaufen einen schnellen Wandel ihres Genexpressionsprofils sobald sie aus dem geweblichen Zusammenhang isoliert und in Monolayerkultur gebracht werden (Lin, Fitzgerald et al. 2008). Die Expression von wichtigen Differenzierungsmarkern wie Aggrecan und Collagen Typ-II nimmt mit steigender Passagezahl von Chondrozyten in Monolayerkultur ab und die Zellen durchleben eine morphologische Veränderung (Lin, Fitzgerald et al. 2008). Ihr typisch rundlicher Phänotyp ändert sich mit zunehmender Dedifferenzierung in einen fibroblastischen Phänotyp und ist sowohl mit einer Downregulation von Collagen Typ-II als auch mit einer gesteigerten Genexpression von Collagen Typ-I assoziiert (Grunder, Gaissmaier et al. 2004). Eine Verbesserung der *in vitro* gezüchteten und zu implantierenden Zellen mit dem Ziel einer höheren, längeren und möglichst sicheren Aufrechterhaltung des chondrogenen Potenzials während der Dedifferenzierungsphase ist nur durch Verbesserung der Kulturbedingungen während der Expansionsphase möglich (Giannoni and Cancedda 2006). Die typischen Veränderungen in der Collagensynthese scheinen die Hauptmerkmale des morphologischen Änderungsprozesses zu sein und können sowohl durch dreidimensionale *in vitro* Kultur-

bedingungen als auch durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren positiv beeinflusst werden (Kaps, Loch et al. 2002).

Heute ist es möglich Wachstumsfaktoren für die *in vitro* Züchtung von Zellmaterial rekombinant herzustellen, wobei der klinische Nutzen aktuell vor allem durch die immensen Kosten der Herstellung limitiert ist (Spreafico, Chellini et al. 2009). Des Weiteren stellen rekombinant hergestellte Wachstumsfaktoren, wie z.B. BMP2, ein Risiko für die Übertragung von Krankheiten dar (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). Eine Alternative zeigen unter dem Gesichtspunkt der hohen Kosten und der Sicherheitsprobleme mit genetisch produziertem Material, Thrombozytenkonzentrate wie PRP (Kaps, Loch et al. 2002; El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). Da PRP autogen hergestellt und eingesetzt wird, besteht hier kein Risiko einer Infizierung (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). Das spezifische Charakteristikum von PRP multiple Wachstumsfaktoren zu beinhalten und somit auf verschiedenen Signalwegen zu reagieren, unterscheidet das Plättchenkonzentrat von einfachen rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren, welche auf einen einzigen Signalweg fokussiert sind (van den Dolder, Mooren et al. 2006) und bietet somit vielfältige Einsatzmöglichkeiten.

Für die Herstellung von PRP verwendeten wir keine kommerziell erhältlichen Systeme sondern entwickelten unter Berücksichtigung einiger Protokolle vorausgegangener Studien eine eigene oben beschriebene Methode. Wir erreichten bei der Herstellung von PRP eine 20fache Steigerung der Thrombozytenzahlen im Vergleich zum porcinem Vollblut. Damit lag die Konzentration des von uns produzierten PRP mehr als 4 mal so hoch wie sie laut der Definition für therapeutisch wirksames PRP sein muss (Marx 2001).

In der Literatur wird postuliert, dass die Plättchenzahl im Vollblut mit der Thrombozytenanzahl im PRP korreliert und diese somit zur Abschätzung der Endkonzentration herangezogen werden kann (Kaps, Loch et al. 2002; Weibrich, Kleis et al. 2002; Nagata, Messori et al. 2010). Allerdings machen nur wenige Studien Angaben über die Höhe der Thrombozytenzahlen ihres verwendeten PRPs und die Techniken und Protokolle für die Herstellungsmethoden differieren enorm, was sich auch in den extrem unterschiedlichen Ergebnissen im Hinblick auf die Thrombozytenkonzentrationen widerspiegelt.

---

Zum Beispiel konnten Lorente-Pérez-Sierra et al. mit zwei Zentrifugations-schritten von 800 x g für 2 Minuten und 500 x g für 8 Minuten nur eine Verdopplung der Thrombozytenzahlen im PRP ihrer humanen Vollblutproben erreichen (Lorente-Perez-Sierra, Ortega-Aranegui et al. 2011). Unter Verwendung des herkömmlichen Systems SmartPReP wurde in einer Studie PRP mit um das 5-fache gesteigerten Thrombozytenzahlen produziert (Getgood, Henson et al. 2011). Ebenfalls eine 5,2-fache Konzentration der Plättchen im PRP im Vergleich zum humanen Vollblut erreichte die Forschungsgruppe um El-Sharkawy mit zwei Zentrifugationsschritten von 500 x g für 10 Minuten und 700 x g für 15 Minuten. Ihre Studie zeigte jedoch große Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Individuen (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). Luengo Gimeno et al. produzierten PRP aus Kaninchenblut mit einer mittleren Thrombozytenkonzentration von 807564 /  $\mu\text{l}$  und steigerten mit ihrer Methode den Gehalt an Plättchen um das 2,5-fache des Ausgangswertes. Dabei zentrifugierten sie die Blutproben zunächst nur leicht mit 72 x g für 15 Minuten und trennten dann das PRP vom PPP mit einem Hardspin von 1006 x g für 5 Minuten (Luengo Gimeno, Gatto et al. 2006). Sowohl Weibrich et al. als auch Kon et al. wendeten ein Produktionsprotokoll mit nur einem Zentrifugationsschritt von 1000 rpm über 5 Minuten an. Sie erreichten eine Thrombozytenkonzentration von ca. 900000 /  $\mu\text{l}$ , was einer mittleren Steigerung um 316 % entspricht (Weibrich, Hansen et al. 2004; Kon, Filardo et al. 2010). Einen Vergleich zweier Herstellungsmethoden für PRP aus dem Blut von New Zealand White Rabbits stellten Nagata et al. an. Mit einem Single-Zentrifugationsschritt von 160 x g über 6 Minuten konnten sie die Thrombozytenzahlen lediglich um 81 % auf im Durchschnitt 782000 /  $\mu\text{l}$  steigern. Ein deutlicher Anstieg der Plättchenkonzentration um 348 % (1987000 /  $\mu\text{l}$ ) dokumentierte sich bei der Produktion mit zwei Zentrifugationsschritten von zunächst 160 x g über 20 Minuten und im Anschluss daran 400 x g für 15 Minuten. Dazu wurde vor der zweiten Zentrifugation bereits ein Teil des Überstandes abpipettiert um eine bessere Konzentrierung der Plättchen zu erreichen (Nagata, Messori et al. 2010). Hakimi et al. verwendeten zur Herstellung von PRP aus humanem Vollblut eine GPS II Double Unit (Biomet Biologics, USA). Diese Methode erbrachte eine Konzentration der Thrombozyten um das 5- bis 7-fache der Ausgangszahl mit nur einem einzigen Zentrifugationsschritt von 3200 rpm über 15 Minuten (Hakimi, Jungbluth et al. 2010). In einer weiteren Studie

konnte mit Hilfe ebenfalls nur eines Separationsschrittes von 800 rpm für 15 Minuten eine Verdreifachung der Thrombozyten bei Ratten erreicht werden (van den Dolder, Mooren et al. 2006). Die Forschungsgruppe um Mazzucco et al. stellte einen Vergleich zwischen drei kommerziellen PRP-Kits (Fibrinet<sup>®</sup>, RegenPRP-Kit, Plateltex) und einer manuellen Methode an und erzielte stark voneinander abweichende Ergebnisse. Die finalen Thrombozytenkonzentrationen schwankten zwischen im Durchschnitt 430000 /  $\mu$ l mit dem RegenPRP-Kit und 1358000 /  $\mu$ l mit Fibrinet. Das entsprach einer 1,65- bis 4,4-fachen Steigerung der Plättchenzahlen (Mazzucco, Balbo et al. 2009). Ähnlich gravierende Unterschiede im Hinblick auf die absolute Plättchenzahl und die Effizienz der Thrombozytenkonzentrierung fanden Leitner et al. in einer vergleichenden Studie mit vier verschiedenen Herstellungssystemen (Vivostat PRF Preparation Kit<sup>®</sup>, PCCS Platelet Concentrate Collection System<sup>®</sup>, Harvest<sup>®</sup> SmartPRP 2 APC 60 Process und Fibrinet<sup>®</sup> Autologous Fibrin & Platelet System) (Leitner, Gruber et al. 2006).

Der Vergleich mit vorausgegangenen Studien zeigt nur einen Ausschnitt der Vielfalt an Herstellungsprotokollen und den immensen Differenzen zwischen den erreichten Thrombozytenkonzentrationen. Wir lagen mit einer Steigerung der Konzentration um das 20fache weit über den Ergebnissen der hier aufgeführten Studien, was darauf schließen lässt, dass unser Protokoll eine sehr wirkungsvolle Methode zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten darstellt. Auch wenn die porcinen Thrombozytenzahlen pro  $\mu$ l denen des humanen Vollblutes annähernd entsprechen, muss berücksichtigt werden, dass wir Blutproben von verschiedenen Schweinen poolten und unser Protokoll in diesem Punkt von denen anderer Experimente abweicht. Durch das Pooling verschiedener Blutproben erreichten wir gleichmäßige und vergleichbare Konzentrationen an Thrombozyten im PRP. Allerdings besteht bei dieser Methode auch das Risiko, dass man eine insgesamt sehr niedrige Plättchenkonzentration erreicht, wenn bei einigen der Schweine die Thrombozytenzahlen negativ von der Norm abweichen. Da beim Menschen auf Grund der Infektionsgefahr nur autologe Thrombozytenkonzentrate verwendet werden, müssen hier auch möglicherweise sehr niedrige Thrombozytenzahlen zur Herstellung von PRP verwendet werden. Unter Berücksichtigung der Schwankungen in den Thrombozytenkonzentrationen unterschiedlicher Probanden und Spezies, wäre dies ein weiterer zu diskutieren-

der Faktor (Kon, Filardo et al. 2010; Nagata, Messori et al. 2010) und deshalb müssen diesem Experiment noch weitere folgen, damit das Protokoll auf den Menschen zur Herstellung von autologen PRPs übertragen werden kann.

Nach unserem Herstellungsprotokoll verwendeten wir zur Aktivierung von Plasma, PPP und PRP kein Thrombin, da andere Studien bereits gezeigt haben, dass Thrombin selbst biologische Effekte im Rahmen der Zellproliferation und Differenzierung induziert oder sogar die osteoinduktiven Effekte von PRP negativ beeinflussen kann (Pagel, de Niese et al. 2003; Akeda, An et al. 2006; Nowak, Lopez et al. 2007; Han, Woodell-May et al. 2009; Bae, Kim et al. 2010). Um diesen Störfaktor zu umgehen, aktivierten wir die Zusätze mit Calcium. Eine andere Forschungsgruppe zeigte, dass auch ohne Zusatz von Thrombin eine signifikante Ausschüttung von Wachstumsfaktoren erreicht werden kann und dass durch die Zugabe von Thrombin keine zusätzlich gesteigerte Sekretion resultiert (Getgood, Henson et al. 2011). Um die Bildung eines Fibrinklumpens in der Zellkultur zu vermeiden, wurden die geronnenen, mit Calcium aktivierten Zusätze in Anlehnung an ähnliche Studien zentrifugiert und die isolierten Überstände zu den Zellen gegeben (Spreafico, Chellini et al. 2009).

Es wird angenommen, da keine in der Literatur belegte direkte Beziehung zwischen der Plättchenzahl und der Wachstumsfaktorenkonzentration gefunden werden konnte, dass nicht die Anzahl der Thrombozyten, sondern die Verfassung der Plättchen zum Zeitpunkt des Einsatzes die Menge der Wachstumsfaktoren beeinflusst und damit auch die Wirkung des PRP (Lorente-Perez-Sierra, Ortega-Aranegui et al. 2011). Während der Herstellungsphase des PRP muss die Integrität der Thrombozyten möglichst lange bewahrt werden, um eine vorzeitige Sekretion der  $\alpha$ -Granula und damit einen Verlust an wichtigen Wachstumsfaktoren zu verhindern (Efeoglu, Akcay et al. 2004; Lorente-Perez-Sierra, Ortega-Aranegui et al. 2011). Vorsicht ist vor allem bei der mechanischen Bearbeitung der Blutproben, wie Zentrifugation und Pipettieren geboten. Durch zu starkes Zentrifugieren können die Thrombozyten Schaden nehmen und so kann eine vorzeitige Ausschüttung von Wachstumsfaktoren getriggert werden (Nagata, Messori et al. 2010). Leitner et al. konnten elektronenmikroskopisch in einem Vergleich mehrerer Systeme einen erheblichen Einfluss des Herstellungsprozesses auf die Morphologie der Thrombozyten nachweisen. Dabei stellten

sie nicht nur den mechanischen, sondern auch den chemischen Einfluss z.B. des pH-Wertes während des Produktionsprozesses in den Vordergrund (Leitner, Gruber et al. 2006). Es muss kritisch hinterfragt werden, wie viele der sezernierten Wachstumsfaktoren sich schlussendlich im verwendeten Überstand unserer Proben befanden, da unsere Herstellungsmethode mehrere Punkte beinhaltet bei der Wachstumsfaktoren verloren gehen könnten. Insbesondere in Anbetracht der hohen Konzentration an Thrombozyten, die unser PRP enthält wäre eine größere Menge an Wachstumsfaktoren zu erwarten gewesen. Eine mechanische Aktivierung der Gerinnungskaskade könnte bereits beim Pooling zu Beginn der Herstellung erfolgt sein. Hierbei wurden die Blutproben mehrerer Schweine von einem Röhrchen in ein Sammelgefäß pipettiert und kamen dadurch mehrfach in Kontakt mit Gefäßen und Pipettenspitzen. Des Weiteren beinhaltet unsere Methode zwei Zentrifugationsschritte, die jeweils einen mechanischen Reiz darstellen und jeweils einen Pipettierschritt erfordern. Sollte es der Fall sein, dass in unserer Studie durch mechanische Aktivierung der Gerinnung schon frühzeitig Wachstumsfaktoren ausgeschüttet wurden und diese mit der zweiten Zentrifugation verworfen wurden, könnte dies ein Grund dafür sein, dass wir keinen signifikanten Effekt von PRP feststellen konnten und die von uns ermittelten Konzentrationen an Faktoren eher gering waren. Eine andere Studie, bei der eine Methode mit zwei Zentrifugationsschritten verwendet wurde, zeigte ebenfalls keinen positiven Effekt für PRP (Drengk, Zapf et al. 2009). Grundsätzlich besteht die Möglichkeit der mechanischen Gerinnungsaktivierung bei der Herstellung von PRP. Deshalb sollten auch die Ergebnisse anderer Studien, die keine oder nur geringe Wirkungen von PRP verzeichnen konnten, unter diesem Aspekt kritisch betrachtet werden.

In der Literatur wird auch die Art der verwendeten Antikoagulanzen bei der PRP-Herstellung kritisch diskutiert. Einige Studien zeigten, dass alle Antikoagulanzen die Thrombozyten aktivieren auch eine vorzeitige Degranulation auslösen können. EDTA und Heparin scheinen diesen Effekt jedoch besonders stark hervorzurufen (Efeoglu, Akcay et al. 2004). Nach der heutigen Datenlage ist Citrat das Antikoagulanzen der Wahl für die Produktion von PRP zur in vivo Applikation, da es den Thrombozyten ein hohes Maß an Membranintegrität bietet (Efeoglu, Akcay et al.

2004). In Anlehnung an diese Daten verwendeten auch wir in unserer Studie Citrat zur Vermeidung der Blutgerinnung.

Obwohl nachgewiesen wurde, dass viele Wachstumsfaktoren in der Lage sind die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten zu induzieren, variieren ihre biologischen Effekte doch sehr im Zusammenhang mit ihrer synergistischen Funktion und Kombination (Spreafico, Chellini et al. 2009). Wachstumsfaktoren können interagieren und als Konsequenz eine Kaskade aus verschiedenen Signalproteinen mit multiplen Ausgangswegen formieren, welche zu einer Aktivierung der Genexpression gefolgt von Proteinproduktion führen können (van den Dolder, Mooren et al. 2006). Die stimulierenden Eigenschaften verschiedener Wachstumsfaktoren scheinen abhängig zu sein von einer Kombination aus individuellen Faktoren, wie dem physiologischen Status der kultivierten Chondrozyten, deren Differenzierungspotentials und des Spenderalters. Diese können ausschlaggebend für die in der Literatur dargestellten unterschiedlichen Effekte von Wachstumsfaktorkonzentraten sein (Kaps, Loch et al. 2002; Barbero, Grogan et al. 2004). Sowohl Weibrich et al. als auch Everts et al. fanden deutliche Unterschiede im Wachstumsfaktorengehalt der Proben verschiedener Individuen und konnten keine Korrelation zwischen Plättchenzahl und Wachstumsfaktorkonzentration nachweisen (Everts, Hoffmann et al. 2006); (Weibrich, Kleis et al. 2002). Zudem ist eine vorherige Aktivierung der Thrombozyten notwendig um eine Freisetzung der Wachstumsfaktoren zur Bestimmung ihrer Konzentrationen durchzuführen (Yazawa, Ogata et al. 2004).

Wir untersuchten in unserer Studie den Gehalt an den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ , BMP-2 und BMP-7 in mit Calciumchlorid aktiviertem Plasma, PPP und PRP. Wir steigerten mit unserer Methode die Konzentration von TGF- $\beta$  um das 2,1-fache im Vergleich von Plasma zum PRP. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Akeda et al. In ihrem Experiment verwendeten sie ebenfalls porcines Blut zur Herstellung von PRP. Auch diese Arbeitsgruppe wendete ein Verfahren mit zwei Zentrifugationschritten an und erreichte eine Erhöhung der TGF- $\beta$ -Konzentration um das 2-fache (Akeda, An et al. 2006). Andere Forschungsgruppen dokumentieren im Gegensatz zu uns und Akeda et al. deutlich unterschiedlichere Daten. Eine enorme Erhöhung der Konzentration von TGF- $\beta$  im PRP um das 512-fache zum humanen Vollblut er-

reichten Lorente-Pérez-Sierra et al. mit ihrer PRP-Herstellungsmethode. Dabei stellen sie große Unterschiede zwischen den einzelnen Proben mit einer Standardabweichung von 201,3 fest (Lorente-Perez-Sierra, Ortega-Aranegui et al. 2011). Kon et al. konnten in einem Schafmodell mit ihrer Methode eine Steigerung der TGF- $\beta$ -Konzentration auf das 8,5-fache des Wertes im aktivierten PRP im Vergleich zum Plasma erringen (Kon, Filardo et al. 2010). Eine durchschnittliche Steigerung des TGF- $\beta$ -Gehalts im PRP um das 11,1-fache im Vergleich zum humanen Plasma dokumentierten Hakimi et al. unter Verwendung eines kommerziellen Herstellungskits (Hakimi, Jungbluth et al. 2010). Ebenfalls humanes Vollblut verwendeten El-Sharkawy et al. und konnten sowohl für TGF- $\beta$ , als auch für andere Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF, VEGF und FGF einen signifikanten Anstieg im PRP im Vergleich zum Vollblut und PPP dokumentieren (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007). Dass die Steigerung an Wachstumsfaktoren in dem von uns produzierten PRP nur 2,1-fach war und nicht mehr, obwohl wir die Konzentration an Plättchen im PRP auf das 20-fache steigerten, könnte an einem Verlust von Faktoren während der Herstellung, wie bereits diskutiert, liegen.

In der Literatur wird wenig über den Zusammenhang zwischen PRP und den BMPs veröffentlicht. BMP-7 und BMP-2 stimulieren die Matrixsynthese und arbeiten dem durch katabole Mediatoren induzierten Knorpelabbau entgegen. Eine direkte Steigerung der Proliferation von Chondrozyten ist durch die BMPs alleine jedoch nicht möglich und beruht auf einem kontinuierlichen Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren und Signalwegen (Giannoni and Cancedda 2006). Weitere Studien zeigten, dass eine optimale biologische Antwort auf BMP auf einer möglichen Kombination mit Wachstumsfaktoren beruht (Jung, Schmoekel et al. 2005). Gaissmaier et al. stellten eine Reduktion der Expression von BMP-2 unter Einfluss von PRP fest (Gaissmaier, Fritz et al. 2005; Jung, Schmoekel et al. 2005; Elshaier, Hakimiyan et al. 2009). In einer Analysestudie von Anitua et al. wurden die Inhalte der verschiedenen Granula von Thrombozyten sehr genau untersucht. BMPs gehören laut ihren Ergebnissen nicht zu den Wachstumsfaktoren, die in den Granula gespeichert werden. Vielmehr sind sie bei Bedarf exprimierte Signalproteine, die die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren unterstützen können (Anitua, Andia et al. 2004). Diese Aussage wird auch durch unsere Daten unterstützt. Im Überstand der aktivierten Proben konn-

ten wir BMP-2 und BMP-7 nur minimal nachweisen, was deutlich gegen eine Konzentrationsmöglichkeit der Proteine durch unser Verfahren zur Herstellung von PRP spricht.

Ein weiterer Aspekt unserer Experimente war die Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher PRP-Konzentrationen auf die Proliferation und die Differenzierung von Chondrozyten. Für die Effekte von PRP als Zusatz zu verschiedenen biologischen und synthetischen Biomaterialien wurden bislang diskordante Ergebnisse dokumentiert und in aktuellen Studien kontrovers diskutiert. Einige Daten belegen, dass Thrombozytenkonzentrate eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Knochen- und Knorpelgewebe spielen. Dieses ist durch die initiale Rekrutierung von Knochenmarkszellen zur Migration, Mitogenese, Differenzierung zu Osteoblasten und Angiogenese und zum anderen durch die Steigerung der Proliferation von Chondrozyten und Ankurbelung der Biosynthese von Knorpelmatrixproteinen bedingt (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007; Kon, Filardo et al. 2010). Schon die Studie von Angele et al. im Jahre 1998 zeigte, dass unter Verwendung von Kombinationen bestimmter Wachstumsfaktoren eine signifikante Steigerung der Zellzahl von humanen Chondrozyten möglich ist (Angele, Faltermeier et al. 1998). Mishra et al. entdeckten unter Zusatz von PRP einen positiven, konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Proliferation mesenchymaler Stammzellen (Mishra, Tummala et al. 2009). In 6 von 9 Proben von Schafen zeigte sich bei Drengk et al. in einer zweidimensionalen Kultur eine 14-fache Steigerung der Proliferation von mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluss von PRP im Vergleich zu Kulturen ohne diesen Zusatz. Für autologe Chondrozyten unter gleichen Bedingungen fand die Gruppe eine 10-fache Expansion der Zellzahl. Im Gegensatz zu Mishra et al. konnten sie eine dramatische Reduzierung der Collagen Typ-II mRNA-Expression unter Zugabe von PRP dokumentieren (Drengk, Zapf et al. 2009). Die Studie von Spreafico et al. zeigte, dass die Zellen unter 5 % PRP eine Proliferationssteigerung um 96 % aufwiesen im Vergleich zu den mit PPP behandelten Zellen. Eine weitere Erhöhung der PRP oder PPP Konzentrationen auf 10 % zeigte keine signifikante Steigerung der Proliferation. Des Weiteren stellte die Forschungsgruppe auf zellulärer und molekularer Ebene fest, dass der Zusatz von PRP zur Zellkultur die Collagen Typ-II-Transkription im Vergleich zu Zellen die in FCS-Medium gezüchtet wurden auf einem höheren Niveau hält und damit die

Differenzierung der Chondrozyten unterstützt (Spreafico, Chellini et al. 2009). Akeda et al. fanden in ihrer Studie mit porcinen Chondrozyten in Kultur eine minimale, aber doch mit 11 % signifikante Steigerung der Proliferation unter Zusatz von 10 % PRP (Akeda, An et al. 2006). In einem Experiment mit humanen Monozyten belegten El-Sharkawy et al. einen dosisabhängigen positiven Einfluss von PRP auf die Chemotaxis. Ein maximaler Effekt zeigte sich unter einer Konzentration von 5 % PRP, danach erreichte die Wirkung ein Plateau. Mit einer weiteren Steigerung der Konzentration konnte kein gesteigerter Effekt dargestellt werden (El-Sharkawy, Kantarci et al. 2007).

Im Gegensatz dazu dokumentierten andere Studien an Hand ihrer Forschungsergebnisse nicht nur einen fehlenden positiven Effekt von PRP auf die Geweberegeneration, Kon et al. zeigten sogar einen negativen Einfluss der Thrombozytenkonzentrate auf Knochen- und Knorpelgewebe in einem Schafmodell (Kon, Filardo et al. 2010). Weibrich et al. entdeckten auf der einen Seite bereits in einer Studie im Jahre 2002 eine konzentrationsabhängige Wirkung von PRP auf Osteoblasten. Mit einer mittleren Plättchenkonzentration von 1000000 Zellen /  $\mu\text{l}$  erreichten sie einen positiven Effekt des Konzentrates auf die Proliferation von Osteoblasten. Auf der anderen Seite erreichten sie mit steigender Konzentration ein Wachstumsplateau und größere Mengen PRP schienen die Regenerationsrate sogar zu senken. Im Jahre 2003 untermauerte die Forschungsgruppe ihre Daten mit einem weiteren Experiment. Auch in dieser Studie verzeichneten sie einen paradoxen inhibitorischen Effekt von hoch konzentriertem PRP (2000000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$ ) auf die Osteoblastenaktivität. Als mögliche Ursachen für diese Ergebnisse sahen die Forscher inhibitorische und zytotoxische Effekte von Wachstumsfaktoren in zu hohen Konzentration an (Weibrich, Hansen et al. 2004). Diese These wurde bereits durch weitere Daten untermauert. In einem Experiment zur Wirkung von verschiedenen PRP-Konzentrationen auf humane Fibroblasten und Osteoblasten zeigten die Ergebnisse eine maximale Proliferationssteigerung der Zellen mit der Zugabe von aktiviertem Plasma nach 24 Stunden Inkubationszeit. Eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation wurde als Wirkung steigender PRP-Konzentrationen in diesem Zeitraum offenbart. Anders zeigten sich die Auswirkungen von PRP nach 72 Stunden Wachstumszeit. Eine maximale Proliferationsrate konnte zu diesem Zeit-

punkt für PRP in einer Konzentration von im Durchschnitt 500000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  eruiert werden (Graziani, Ivanovski et al. 2006). Gaissmaier et al. stellten ebenfalls einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss von autologem PRP auf das Wachstum von humanen Chondrozyten in Monolayerkultur fest. Eine Zugabe von 1 % und 10 % PRP erhöhte die Proliferation der Zellen mit steigender Tendenz nach vier und sieben Tagen. Eine weitere Erhöhung der PRP-Konzentration brachte keinen weiteren positiven Effekt auf die Proliferation. Die Forschungsgruppe belegte zu dem eine Abnahme des Differenzierungsmarkers Kollagen Typ-II, welche ebenfalls konzentrations- und zeitabhängig war und konnten die morphologischen Veränderungen der Chondrozyten unter Einfluss des Thrombozytenkonzentrates mikroskopisch und immunhistochemisch nachweisen (Gaissmaier, Fritz et al. 2005). Kaps et al. konnten mit Hilfe ihrer Experimente einen positiven Effekt von PRP auf die Proliferation von bovinen Gelenkknorpelzellen und humanen Nasenseptumchondrozyten nachweisen. Jedoch waren die Chondrozyten unter PRP nicht mehr in der Lage Knorpelmatrixproteine zu produzieren und damit sich zu differenzieren (Kaps, Loch et al. 2002).

Für die Quantifizierung der Proliferation der Chondrozyten wendeten wir in unseren Experimenten den BrdU-Proliferationstest an. Eine signifikante Steigerung der Zellteilungsrate zeigte sich nur unter Zugabe von 40 mM Calciumchlorid. Die Zugabe von PPP in den Konzentration 5 %, 10 % und 20 % führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Proliferationsrate. Eine im Vergleich mit PPP höhere Steigerung der Zellteilungsrate konnte unter Zusatz von PRP dargestellt werden. Diese war jedoch in allen drei Konzentrationen annähernd gleich. Zieht man einen Vergleich zu den oben genannten Studienergebnissen wäre eine konzentrationsabhängige Zunahme der Proliferation unter PRP zu erwarten gewesen. Dass diese ausblieb, könnte an der hohen Thrombozytenkonzentration unseres PRP liegen, welche inhibitorische Wirkungen auf die Chondrozyten in Monolayerkultur gehabt haben könnte.

Bereits 1992 beschreiben McCarty et al. Calcium als ein Signalübertragungsmolekül, welches eine Rolle als Kontrollfaktor in der Zellvolumenregulation von tierischen Zellen spielt (McCarty and O'Neil 1992). Dabei soll Calcium im Rahmen eines von vielen Signalwegen bei der regulatorischen Volumenabnahme mitwirken und

neben der Produktion von sekundären intrazellulären Signalmolekülen auch die Einbringung von mit Ionenkanälen gefüllten Vesikeln in die Plasmamembran beeinflussen (McCarty and O'Neil 1992). Man nimmt an, dass extrazelluläres Calcium als Lieferant für das intrazelluläre Calcium dient und die regulatorischen Effekte im Rahmen von Signaltransduktionen dem intrazellulären Calcium obliegt (McCarty and O'Neil 1992). Des Weiteren soll das extrazelluläre Calcium einen stabilisierenden Effekt auf die Zellmembran haben, so dass bei längerer Abwesenheit von Calcium die Membranfunktion und Zellmorphologie möglicherweise irreversibel geändert werden können (McCarty and O'Neil 1992). Chao et al. verdeutlichten, dass aus der Kompression des Gelenknorpels im Laufe eines Tages zeitliche Schwankungen der Osmolarität entstehen, welche Einfluss auf die Wandlung von Zellform und Zellvolumen der Chondrozyten in situ nehmen (Chao, West et al. 2006). Sie stellten unter anderem fest, dass das Volumen der Chondrozyten mit der osmotischen Ladung korreliert und Calcium eine wichtige Rolle als Signalmolekül im Rahmen der Mechanotransduktion darstellt. Durch dynamisch osmotische Ladung steigerte die Studiengruppe die Genexpression von Aggrecan in Chondrozyten (Chao, West et al. 2006). Alford et al. zeigten bereits 2003 an bovinen Gelenksknorpelzellen eine Beziehung von intrazellulärem Calcium und der Genexpression von Aggrecan auf (Alford, Yellowley et al. 2003). Die Gruppe postulierte, dass Calcium die mRNA von Aggrecan in einer dosisabhängigen Art und Weise regulieren könne. In diesem Rahmen würde eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration ein sich im stabilen Gleichgewicht befindliches Level von Aggrecan mRNA reduzieren (Alford, Yellowley et al. 2003). Eine neuere Studie zeigte, dass Calcium die Expression von mRNA in humanen paradontalen Zellen steigert (An, Ling et al. 2011). Vergleicht man die dargestellten Ergebnisse früherer Studien mit unserem Ergebnis und nimmt man an, dass Calcium auf die meisten Zellen ähnliche Auswirkungen hat, so würde die positive Wirkung von Calcium auf die mRNA-Expression die signifikante Steigerung der Proliferation erklären. Da jedoch in allen Proben eine identische Menge an Calcium enthalten ist, müssten unter diesen Umständen die Zusätze wie PPP und PRP hemmend auf die Proliferation der Chondrozyten wirken um die nicht signifikanten Ergebnisse deuten zu können. In der Literatur konnten keine vergleichbaren Studien gefunden werden, die Calcium ebenfalls als Kontrolle zu PRP und PPP verwendeten. In vielen Studien wird Calcium als

Aktivator der Gerinnung verwendet, jedoch wird die Wirkung von Calcium selbst nicht diskutiert. Deshalb müssten um die Hypothese einer proliferationssteigernden Wirkung von Calcium zu untermauern noch weitere Studien zur Klärung dieser Zusammenhänge durchgeführt werden.

Wir bestimmten die Protein- und die Genexpression von Collagen Typ-I als Dedifferenzierungsmarker in den Chondrozyten nach vier Tagen Wachstum in Monolayerkultur um das Ausmaß der morphologischen Veränderung der Chondrozyten zu bestimmen. Die Genexpression von Collagen Typ-I im Vergleich zur Kontrolle unterlag sowohl mit PPP als auch mit PRP nach vier Tagen Wachstum einer Suppression. Diese war nicht signifikant und nicht konzentrationsabhängig. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine deutliche, jedoch nicht signifikante Steigerung der Proteinexpression unter Zugabe von PPP. Da kein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von PRP und PPP gefunden werden konnte, muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass die Menge an Wachstumsfaktoren im von uns hergestellten PRP nicht ausreichend war um einen wesentlichen Wirkungsunterschied zum PPP zu erzielen.

Für die Diskrepanz zwischen Gen- und Proteinexpression von Collagen Typ-I könnten, wie Gaissmaier et al. bereits beschrieben haben, zeitlich abhängige Einflüsse ursächlich sein (Gaissmaier, Fritz et al. 2005). Unter der Annahme, dass die Genexpression vielleicht nur in der frühen Phase der Zellproliferation durch PRP gesteigert wird, ließe sich der Zusammenhang dadurch erklären, dass zum Zeitpunkt der Messung die Genexpression schon wieder reduziert war, die Proteine jedoch noch nachweisbar waren. Die gesteigerte Collagen Typ-I Synthese spricht, wie in der Literatur beschrieben, für eine Dedifferenzierung der Chondrozyten. Um diesen Prozess weiter beurteilen zu können, bestimmten wir mittels ELISA den Gehalt an Collagen Typ-II in den Proben.

Wir fanden unter PPP einen konzentrationsabhängigen Abfall der Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle und unter dem Einfluss von PRP eine konzentrationsabhängige Zunahme des Differenzierungsmarkers. Auch hier erzielten wir keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Unsere Ergebnisse sind jedoch nur bedingt mit den vorliegenden Studien zu vergleichen, da wir PRP mit einer Thrombozytenkonzentration von 4300000 /  $\mu$ l ver-

wendet haben. Zu berücksichtigen sind in diesem Fall die auch schon in anderen Studien dokumentierten negativen Einflüsse von zu hoch konzentriertem PRP (Spreafico, Chellini et al. 2009), wobei jedoch Angaben über den Gehalt an Wachstumsfaktoren des PRP in diesen Studien nicht gemacht werden. Weitere Daten aus in vivo und in vitro Studien haben ergeben, dass PRP über die bekannten Faktoren hinaus, auch die Überexpression von endogenen Wachstumsfaktoren stimulieren kann (Lee, Wilson et al. 2011). Graziani et al. argumentieren an Hand ihrer Daten, dass eine moderate Steigerung der normalen Plättchenzahl die optimalen Bedingungen für die Wundheilung durch eine ideale Balance zwischen Proliferation und Differenzierung bietet (Graziani, Ivanovski et al. 2006).

Ein weiterer Faktor ist der Unterschied zwischen den verschiedenen Spezies, welcher sich sowohl in der Konzentration der Wachstumsfaktoren als auch in der Variation der vorliegenden Wachstumsfaktoren, bemerkbar machen könnte. Daten einer Studie von van den Dolder et al. zeigten große Unterschiede im Gehalt von Wachstumsfaktoren bei einem Vergleich zwischen PRP von Ratten, Ziegen und Menschen (van den Dolder, Mooren et al. 2006). Da die Regulation der Gewebshheilung ein komplexer Prozess ist, können schon kleinere Abweichungen der Menge an Wachstumsfaktoren zu gegenteiligen Ergebnissen führen (Kon, Filardo et al. 2010). Welche Wachstumsfaktoren sich nun genau in dem von uns produzierten porcinen PRP in hoher Konzentration befanden und welche Auswirkungen das Zusammenspiel dieser Faktoren auf die Differenzierung der Knorpelzellen hatte, wurde von uns nicht näher untersucht und bietet sicherlich Anlass zur Weiterführung der Studien.

Des Weiteren berichten einige Autoren über einen nicht unerheblichen Gehalt an Leukozyten im PRP, deren Anteil abhängig von der jeweiligen Herstellungsmethode ist (Everts, Hoffmann et al. 2006; Lee, Wilson et al. 2011). Innerhalb unserer Studie untersuchten wir den Gehalt an Leukozyten des von uns hergestellten PRPs nicht. Demnach können sowohl inflammatorische als auch Abwehrprozesse ebenfalls einen Einfluss auf Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten ausüben. Nagata et al. konnten in mikroskopischen Ausstrichen ihres PRPs Lymphozyten mit gesteigertem Zytoplasma nachweisen. Dies spricht für eine aktivierte Immunantwort und kann zu vorzeitiger Degranulation der Thrombozyten führen (Nagata, Messori et al. 2010). Da wir gepooltes PRP in unserer Studie verwendeten, könnten die Ergeb-

nisse nachhaltig beeinflusst worden sein. Durch den Kontakt von nicht autologen Leukozyten mit Chondrozyten werden Abwehrmechanismen ausgelöst. Leukozyten bilden in diesem Rahmen Matrix-abbauende Enzyme und Sauerstoffradikale, die unselektiv Zellen zerstören und somit die Proliferation der Chondrozyten negativ beeinflussen können (Anitua, Sanchez et al. 2006).

Eine weitere Variable als Störfaktor der Vergleichbarkeit verschiedener Studien untereinander ist die Wahl der jeweiligen Zellen, welche zur in vitro Kultivierung verwendet werden. Wir untersuchten in unseren Experimenten frisch isolierte Chondrozyten von Schweinen. In der Literatur, die zur Diskussion herangezogen werden kann, werden viele verschiedene Spezies und zum großen Teil auch Zelllinien verwendet. Es muss in Betracht gezogen werden, dass die Chondrozyten heterogener Spezies unterschiedlich auf den Einfluss von PRP reagieren und dass sowohl das Alter des Zellspenders als auch die physiologische Verfassung der Zellen einen Einfluss haben (Kaps, Loch et al. 2002).

Neben seiner Rolle in der Gerinnungskaskade wurden für Thrombin auch regulatorische Eigenschaften bei Entzündungsreaktionen, Allergien, Tumorwachstum, Angiogenese, Apoptose, Expression von Wachstumsfaktoren und Gewebsneubildung postuliert (Bae, Kim et al. 2009; Han, Woodell-May et al. 2009; Bae, Kim et al. 2010). In einer Studie konnten unter Einsatz von Thrombin als Aktivierungsmittel von PRP gesteigerte Entzündungsreaktionen im Vergleich zu nicht aktiviertem PRP nachgewiesen werden (Han, Woodell-May et al. 2009). Regulatorische Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von in vitro Zellen, sowie die Sekretion von endogenen Zytokinen (IL-1 und IL-8), Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF und Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selectin wurden unter dem Einfluss von Thrombin beobachtet (Roussy, Bertrand Duchesne et al. 2007; Bae, Kim et al. 2009; Han, Woodell-May et al. 2009; Hsieh, Tung et al. 2009). Die zellulären Effekte von Thrombin werden durch die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, welche als Protease-Activated-Rezeptors (PARs) bekannt sind, vermittelt. Diese Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Endothelzellen und vielen anderen Zelltypen exprimiert (Hsieh, Tung et al. 2009; Bae, Kim et al. 2010). Eine gesteigerte Zellproliferation und Zellmigration wird durch Modulation der Calcium-Signalwege durch Thrombin

bedingt (Sacks, Firth et al. 2008). Diese Mechanismen erklären die Effekte, welche Thrombin als Zusatz zum Kulturmedium auf Zellen in vitro Kultur hat.

Wir konnten in unserer Studie unter Zusatz von Thrombin in den Konzentrationen 1,8, 18 und 91 U / ml zu den Chondrozyten in Monolayerkultur eine geringe Steigerung der Proliferation nachweisen. Die Auswirkungen von Thrombin auf den Differenzierungsmarker Collagen Typ-I wurden im Rahmen unserer Studie ebenfalls untersucht. Mit Hilfe der PCR konnte die Genexpression von Collagen Typ-I dargestellt und mittels Western-Blot die Bestimmung der relativen Proteinexpression durchgeführt werden. Deutlich wurde eine Tendenz der Chondrozyten zur Dedifferenzierung unter dem Einfluss von Thrombin. Da jedoch auch die Collagen-Typ-II-Synthese eine Zunahme unter dem Faktor zeigte, kann angenommen werden, dass Thrombin die Expression von Proteinen eher unselektiv steigert.

Calcium spielt wie Thrombin eine große Rolle bei intrazellulären Signalwegen und zeigt eine Wirkung auf Zellen in vitro (Sacks, Firth et al. 2008). Gelenkknorpelzellen von Kaninchen zeigten unter Einfluss von Calcium im Medium den höchsten Gehalt an Kollagen Typ-I, während sie unter Abwesenheit von Calcium Kollagen Typ-II bildeten (Deshmukh and Sawyer 1977). Dieser Effekt wird darauf zurückgeführt, dass extrazelluläres Calcium über verschiedene Kommunikationswege intrazelluläre Signalwege aktiviert und somit in die Gen- und Proteinexpression von Zellen eingreift (Deshmukh and Sawyer 1977).

Auch unsere Studie zeigte deutliche Einflüsse durch den Zusatz von Calcium zu den Chondrozyten in Kultur. Eine signifikante Zunahme der Zellwachstumsrate wurde im BrdU-Proliferationstest unter Zusatz von 40 mM Calciumchlorid beobachtet. Auch die Synthese von Collagen Typ-II wurde gesteigert, wo hingegen der Gehalt an Collagen Typ-I unter Zugabe von Calciumchlorid wenig beeinflusst wurde. Calciumchlorid scheint demnach einen deutlichen Einfluss auf die Proliferation von Zellen zu haben und einer Dedifferenzierung von Chondrozyten positiv entgegen zu wirken. Diese Ergebnisse sind im Hinblick auf die vielfältigen Aufgaben von Calcium innerhalb der Zellen und biologischen Stoffwechselprozesse nicht verwunderlich, bedürfen jedoch sicherlich noch einer genaueren Untersuchung in weiteren Experimenten.

## 5 Zusammenfassung

Der Einfluss von Platelet Rich Plasma (PRP – plättchenreiches Plasma) in verschiedenen Konzentrationen auf die Differenzierung und Proliferation primärer porciner Chondrozyten in Monolayerkultur wurde im Rahmen dieser Studie untersucht.

PRP als Ressource für autologe Wachstumsfaktoren wurde in den Konzentrationen 5, 10 und 20 % getestet. Als Kontrollgruppen dienten Platelet Poor Plasma (PPP – plättchenarmes Plasma) in gleicher Konzentration und zur Überprüfung der Wirkung der reinen Plasmakomponenten und der Aktivatoren der Blutgerinnung wurden Calciumchlorid (40 mM) und Thrombin (1,8, 18 und 91 U / ml) evaluiert.

Die Proliferationsrate der Knorpelzellen wurde durch den BrdU-Test quantifiziert. Bei Zugabe von Calciumchlorid konnte eine signifikante Steigerung der Proliferation festgestellt werden. PRP zeigte keine signifikante Steigerung der Proliferationsrate der Chondrozyten im Vergleich zu PPP und war nicht konzentrationsabhängig. Unter Zugaben von Thrombin alleine zu den Chondrozyten in Monolayerkultur als Kontrolle kam es nur zu einer geringfügigen, nicht-signifikanten Steigerung der Proliferation.

Anhand der Untersuchung der Genexpression und der relativen Proteinexpression von Collagen Typ-I konnte nachgewiesen werden, dass Chondrozyten unter dem Einfluss von PRP, PPP, Calciumchlorid und Thrombin dedifferenzieren.

Mittels ELISA wurde eine Quantifizierung des Differenzierungsmarkers Collagen Typ-II durchgeführt. Der Zusatz von reinen Plasmakomponenten als PPP bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proteinsynthese. Gesteigert wurde der Gehalt an Collagen Typ-II unter Thrombin, Calciumchlorid und konzentrationsabhängig unter PRP-Zugabe.

Im Rahmen unserer Studie konnte ein proliferations- und differenzierungsteigernder Effekt von Calciumchlorid auf Chondrozyten in Monolayerkultur festgestellt werden. Durch PRP und Thrombin kam es zu einer Erhöhung von Collagen Typ-I und Typ-II. Diese Ergebnisse lassen auf eine Differenzierungstendenz durch PRP und Thrombin schließen. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse unserer Arbeit keine Steigerung der Proliferationsrate und der Proteinexpression durch PRP und Throm-

bin. Die reinen Plasmakomponenten (PPP) steigern zwar die Proliferation der Chondrozyten, bewirken jedoch im gleichen Zuge eine Dedifferenzierung selbiger.

Die Ergebnisse unserer Experimente unterscheiden sich zum Teil von den Ergebnissen anderer Studien. Unterschiede zeigen sich in der in unserer Studie erreichten Konzentrationssteigerung der Thrombozyten im PRP, die durchaus zu einem hemmenden Effekt auf die Chondrozyten geführt haben kann.

Im Hinblick auf den Gehalt an Wachstumsfaktoren im Thrombozytenkonzentrat wurden Abweichungen beschrieben, welche als speziesabhängig und probandenabhängig postuliert werden können (Lorente-Perez-Sierra, Ortega-Aranegui et al. 2011). Ferner scheint der Erhalt der Integrität der Thrombozyten große Auswirkungen auf den Gehalt an Wachstumsfaktoren im PRP zu haben. Negative Effekte können in diesem Zusammenhang eine zu starke Zentrifugation, die Art der Kühlung und die Lagerungszeit ausüben (Efeoglu, Akcay et al. 2004).

Abschließend kann anhand der Ergebnisse festgestellt werden, dass Calciumchlorid einen positiven Einfluss auf Chondrozyten zu haben scheint, jedoch konnten durch PRP keine Veränderungen in der Proliferation und im Differenzierungsmuster demonstriert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akeda, K., H. S. An, et al. (2006). "Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis." Osteoarthritis Cartilage **14**(12): 1272-1280.
- Alford, A. I., C. E. Yellowley, et al. (2003). "Increases in cytosolic calcium, but not fluid flow, affect aggrecan mRNA levels in articular chondrocytes." J Cell Biochem **90**(5): 938-944.
- An, S., J. Ling, et al. (2011). "Effects of varied ionic calcium and phosphate on the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells in vitro." J Periodontal Res. **47**(3):374-82.
- Angele, P., H. Faltermeier, et al. (1998). "[Improvement of the amplification rate of human chondrocytes with IGF-I and RGD]." Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd **115**(Suppl I): 205-208.
- Angiolillo, D. J., M. Ueno, et al. (2010). "Basic principles of platelet biology and clinical implications." Circ J **74**(4): 597-607.
- Anitua, E., I. Andia, et al. (2004). "Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration." Thromb Haemost **91**(1): 4-15.
- Anitua, E., M. Sanchez, et al. (2006). "New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies." Trends Biotechnol **24**(5): 227-234.
- Asanbaeva, A., J. Tam, et al. (2008). "Articular cartilage tensile integrity: modulation by matrix depletion is maturation-dependent." Arch Biochem Biophys **474**(1): 175-182.
- Bae, J. S., I. S. Kim, et al. (2010). "Thrombin down-regulates the TGF-beta-mediated synthesis of collagen and fibronectin by human proximal tubule epithelial cells through the EPCR-dependent activation of PAR-1." J Cell Physiol **225**(1): 233-239.
- Bae, J. S., Y. U. Kim, et al. (2009). "Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase." J Cell Physiol **219**(3): 744-751.

- Barbero, A., S. Grogan, et al. (2004). "Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity." Osteoarthritis Cartilage **12**(6): 476-484.
- Basad, E., B. Ishaque, et al. (2010). "Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. **18**(4):519-27
- C.J.Wirth, L. Z., D. Kohn (2005). Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, (ISBN 3-13-126231-1) Georg Thieme Verlag Stuttgart.: 361-363.
- Chang, W. W., H. Su, et al. (2010). "Association between transforming growth factor-beta1 T869C polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis." Rheumatology (Oxford) **49**(4): 652-656.
- Chao, P. H., A. C. West, et al. (2006). "Chondrocyte intracellular calcium, cytoskeletal organization, and gene expression responses to dynamic osmotic loading." Am J Physiol Cell Physiol **291**(4): C718-725.
- Chattopadhyay, R., R. Iacob, et al. (2009). "Functional and structural characterization of factor Xa dimer in solution." Biophys J **96**(3): 974-986.
- Choi, J. B., I. Youn, et al. (2007). "Zonal changes in the three-dimensional morphology of the chondron under compression: the relationship among cellular, pericellular, and extracellular deformation in articular cartilage." J Biomech **40**(12): 2596-2603.
- Chou, A. I., A. T. Reza, et al. (2008). "Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture." Tissue Eng Part A **14**(12): 2079-2087.
- Csaki, C., P. R. Schneider, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering." Ann Anat **190**(5): 395-412.
- Davies-Tuck, M. L., A. E. Wluka, et al. (2008). "The natural history of cartilage defects in people with knee osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **16**(3): 337-342.
- Deshmukh, K. and B. D. Sawyer (1977). "Synthesis of collagen by chondrocytes in suspension culture: modulation by calcium, 3':5'-cyclic AMP, and prostaglandins." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(9): 3864-3868.

- Dhouib, N., Z. Turki, et al. (2011). "Hypocalcaemia due to hypoparathyroidism in B-thalassemia major . A study of a new case." Tunis Med **89**(3): 302-304.
- Drengk, A., A. Zapf, et al. (2009). "Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells." Cells Tissues Organs **189**(5): 317-326.
- Dugrillon, A., H. Eichler, et al. (2002). "Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration." Int J Oral Maxillofac Surg **31**(6): 615-619.
- Efeoglu, C., Y. D. Akcay, et al. (2004). "A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study." J Oral Maxillofac Surg **62**(11): 1403-1407.
- El-Sharkawy, H., A. Kantarci, et al. (2007). "Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties." J Periodontol **78**(4): 661-669.
- Elshaier, A. M., A. A. Hakimiyan, et al. (2009). "Effect of interleukin-1beta on osteogenic protein 1-induced signaling in adult human articular chondrocytes." Arthritis Rheum **60**(1): 143-154.
- Everts, P. A., J. Hoffmann, et al. (2006). "Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation." Transfus Med **16**(5): 363-368.
- Falah, M., G. Nierenberg, et al. (2010). "Treatment of articular cartilage lesions of the knee." Int Orthop. **34**:621–630
- Fritz, J., C. Gaissmaier, et al. (2006). "[Cartilage repair in the knee joint]." Unfallchirurg **109**(7): 563-574; quiz 575-566.
- Fukui, N., Y. Miyamoto, et al. (2008). "Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage." Arthritis Rheum **58**(12): 3843-3853.
- Gaissmaier, C., J. Fritz, et al. (2005). "Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures." Biomaterials **26**(14): 1953-1960.
- Getgood, A., F. Henson, et al. (2011). "Platelet-rich plasma activation in combination with biphasic osteochondral scaffolds-conditions for maximal growth factor production." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. **19**(11):1942-7.

- Giannoni, P. and R. Cancedda (2006). "Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives." Cells Tissues Organs **184**(1): 1-15.
- Graziani, F., S. Ivanovski, et al. (2006). "The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts." Clin Oral Implants Res **17**(2): 212-219.
- Gruber, H. E., D. Mauerhan, et al. (2008). "Three-dimensional culture of human meniscal cells: extracellular matrix and proteoglycan production." BMC Biotechnol **8**: 54.
- Grunder, T., C. Gaissmaier, et al. (2004). "Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads." Osteoarthritis Cartilage **12**(7): 559-567.
- Hakimi, M., P. Jungbluth, et al. (2010). "[Platelet-rich plasma combined with autologous cancellous bone : An alternative therapy for persistent non-union?]." Unfallchirurg. **114**(11):998-1006
- Han, B., J. Woodell-May, et al. (2009). "The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity." J Bone Joint Surg Am **91**(6): 1459-1470.
- Hsieh, H. L., W. H. Tung, et al. (2009). "Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(10): 1594-1601.
- Hunziker, E. B., T. M. Quinn, et al. (2002). "Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **10**(7): 564-572.
- Jung, R. E., H. G. Schmoekel, et al. (2005). "Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2." Clin Oral Implants Res **16**(6): 676-682.
- Kajikawa, Y., T. Morihara, et al. (2008). "Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing." J Cell Physiol **215**(3): 837-845.
- Kaps, C., A. Loch, et al. (2002). "Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes." Med Biol Eng Comput **40**(4): 485-490.

- Karlsson, C. and A. Lindahl (2009). "Articular cartilage stem cell signalling." Arthritis Res Ther **11**(4): 121.
- Kon, E., G. Filardo, et al. (2010). "Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model." BMC Musculoskelet Disord **11**: 220.
- Lacci, K. M. and A. Dardik (2010). "Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing." Yale J Biol Med **83**(1): 1-9.
- Lee, K. S., J. J. Wilson, et al. (2011). "Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future?" AJR Am J Roentgenol **196**(3): 628-636.
- Leitner, G. C., R. Gruber, et al. (2006). "Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems." Vox Sang **91**(2): 135-139.
- Lin, Z., J. B. Fitzgerald, et al. (2008). "Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation." J Orthop Res **26**(9): 1230-1237.
- Lorente-Perez-Sierra, A., R. Ortega-Aranegui, et al. (2011). "Quantification of growth factors by using a new system for obtaining platelet-rich plasma." Med Oral Patol Oral Cir Bucal. **16**(4):e614-8
- Luengo Gimeno, F., S. Gatto, et al. (2006). "Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits." Thromb J **4**: 18.
- Luiz Carlos U. Junqueira, J. C. (2005). Histologie, Springer Medizin Verlag Heidelberg. **6**.: 83.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). "Histologie 2. Auflage." Thieme: 137-143
- Marlovits, S., M. Mousavi, et al. (2004). "A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note." Eur Spine J **13 Suppl 1**: S102-106.
- Marx, R. E. D. D. S. (2001). "Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? [Article]." Implant Dentistry December **10**(4): 225-228.
- Mazzucco, L., V. Balbo, et al. (2009). "Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure." Vox Sang **97**(2): 110-118.

- McCarty, N. A. and R. G. O'Neil (1992). "Calcium signaling in cell volume regulation." Physiol Rev **72**(4): 1037-1061.
- Mishra, A., P. Tummala, et al. (2009). "Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation." Tissue Eng Part C Methods **15**(3): 431-435.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." Biotechnology **24**: 17-27.
- Nagata, M. J., M. R. Messori, et al. (2010). "Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits." Eur J Dent **4**(4): 395-402.
- Newman, A. P. (1998). "Articular cartilage repair." Am J Sports Med **26**(2): 309-324.
- Nowak, G., M. Lopez, et al. (2007). "[Thrombin induced tumour growth - pharmacological control]." Hamostaseologie **27**(2): 105-110.
- Pagel, C. N., M. R. de Niese, et al. (2003). "Inhibition of osteoblast apoptosis by thrombin." Bone **33**(4): 733-743.
- R. Klinke, H.-C. P., S. Silbernagel (2005). Physiologie: 245-254.
- Roussy, Y., M. P. Bertrand Duchesne, et al. (2007). "Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation." Clin Oral Implants Res **18**(5): 639-648.
- Sacks, R. S., A. L. Firth, et al. (2008). "Thrombin-mediated increases in cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **295**(6): L1048-1055.
- Shi, S., S. Mercer, et al. (2009). "Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes." J Biol Chem **284**(11): 6697-6704.
- Slapnicka, J., A. Fassmann, et al. (2008). "Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro." J Oral Maxillofac Surg **66**(2): 297-301.
- Slinin, Y., T. Blackwell, et al. (2010). "Serum calcium, phosphorus and cardiovascular events in post-menopausal women." Int J Cardiol. **149**(3):335-40.

- Spreafico, A., F. Chellini, et al. (2009). "Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes." J Cell Biochem **108**(5): 1153-1165.
- van den Dolder, J., R. Mooren, et al. (2006). "Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells." Tissue Eng **12**(11): 3067-3073.
- Weibrich, G., T. Hansen, et al. (2004). "Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration." Bone **34**(4): 665-671.
- Weibrich, G. and W. K. Kleis (2002). "Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma." Clin Oral Implants Res **13**(4): 437-443.
- Weibrich, G., W. K. Kleis, et al. (2002). "Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count." J Craniomaxillofac Surg **30**(2): 97-102.
- Wild, M., Jacobi, V., J. Windolf et al. (2000). "The quantitative detection of posttraumatic osteoarthrosis after fractures of the tibial plateau using MRI-based chondrovolumetry." Eur J Trauma **26**: 15-24.
- Yazawa, M., H. Ogata, et al. (2004). "Influence of antiplatelet substances on platelet-rich plasma." J Oral Maxillofac Surg **62**(6): 714-718.

## **7 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

07.05.2012 Annika Licht