

Aus der Orthopädischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Krauspe

Zellbiologische Untersuchung der Auswirkung von Platelet Releasate
auf die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen
Stammzellen

Dissertation

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

vorgelegt von

Melanie Vogl

2016

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Zilkens

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. Adjaye

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Vogl, Melanie, Johannes Fischer, Marcus Jäger, Christoph Zilkens, Rüdiger Krauspe, und Monika Herten. 2013. "Can thrombin-activated platelet releasate compensate the age-induced decrease in cell proliferation of MSC?" *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 31 (11) (November): 1786–1795. doi:10.1002/jor.22433.

Zusammenfassung:

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) sind eine wichtige Komponente für den medizinischen Eingriff in die zelluläre Knochenregeneration. Bei älteren Patienten werden eine verlängerte Frakturheilung, sowie eine reduzierte Proliferation der MSZ beschrieben. *Platelet rich plasma* (PRP) enthält viele Wachstumsfaktoren, welche wichtig für die Knochenregeneration sind. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die reduzierte Proliferation von alternden Stammzellen durch die Zugabe von gefiltertem Überstand des Thrombin aktiviertem PRP (tPR) kompensiert werden kann.

Dazu wurden MSZ von drei verschiedenen Altersgruppen verwendet (Gruppe A: jung, 14-16 Jahre, Gruppe B: mittelalte, 36-46 Jahre, Gruppe C: ältere, 74-83 Jahre). Die MSZ wurden in 5 verschiedenen Mediumansätzen kultiviert. 1. 20% fetales Kalbserum (FKS) mit 1% PRP, 2. 20% FKS mit 2,5% PRP, 3. 20% FKS mit 5% PRP, 4. 20% FKS mit 5% Platelet poor Plasma (PPP) und als Kontrolle 5. nur mit 20% FKS. An Tag 0, 3 und 7 wurde die Zellproliferation und Differenzierung gemessen.

Die Zellproliferation stieg signifikant in Gruppe A und B durch die Addition von tPR, in Gruppe C war nur ein Trend zu einer verbesserten Proliferation erkennbar. Die Differenzierung der MSZ war an Tag 3 signifikant für Gruppe A und B reduziert, an Tag 7 zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kulturen. Gruppe C zeigte eine signifikante Generationszeitenverlängerung im Vergleich zu Gruppe A, wohingegen es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Generationszeiten von Gruppe A und B gab.

Die Zugabe auch von niedrigen tPR Konzentrationen stimuliert die Proliferation von MSZ aller Altersklassen. Für junge und mittelalte Patienten gibt es eine signifikante Verbesserung, für ältere nur einen Trend. Die Differenzierung der Knochenmarkzellen wird durch die Zugabe von tPR nicht beeinflusst.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	IgG	Immunglobulin G
α-Granula	alpha Granula	Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
α-MEM	alpha-Medium	iPS	induzierte pluripotente Zellen
ADP	Adenosindiphosphat	ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
ALP	Alkalische Phosphatase	IU	<i>International units</i>
ATP	Adenosintriphosphat	KDR	VEGF-Rezeptor
BMP-2-7	<i>Bone morphogenetic protein 2, -7</i>	μl	Mikroliter
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>	μm	Mikrometer
Cbfa 1	<i>core binding factor subunit alpha 1= Runx2</i>	MEF2	<i>myocyte-enhancer factor 2</i>
CD 40 L	Oberflächenmarker	MRF	<i>myogenic regulatory factors</i>
CD 62P	Oberflächenmarker	MSZ	Mesenchymale Stammzellen
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>	OC	Osteocalcin
Col-I/III/X	Kollagen I/III/X	ONK	Osteonektin
CFU	<i>Colony forming units</i>	OPN	Osteopontin
CUB Region	Complement subcomponents C1r/C1s, Uegf, BMP-1 Region	Osx	Osterix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	PAI-1	<i>Plasminogen-Aktivator - Inhibitor 1</i>
FLT-1	VEGF-Rezeptor	PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
FKS	fetales Kälberserum	PDGFR-α, β	<i>Platelet derived growth factor receptor alpha, beta</i>
GH	<i>Growth hormone</i>	PDGF-β	<i>Platelet derived growth factor receptor beta</i>
HPZ	Hämatopoetische Stammzelle	Pg	Pikogramm
IGF1, 2, 3	Insulin like growth factor 1, 2, 3	PL	Platelet lysate

PPARg	<i>peroxisome proliferator-activated receptor g</i>	TGF-β, -α	<i>Transforming growth factor beta, alpha</i>
PPP	<i>Platelet poor plasma</i>	TPR	<i>Thrombin activated platelet releasate</i>
PR	<i>Platelet Releasate</i>		
PRP	<i>Platelet rich plasma</i>	VEGF	<i>vascular endothelium growth factor</i>
Runx2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	vWF	<i>von Willebrand Faktor</i>
STAT1	<i>signal transducers and activators of transcription-1</i>		

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Adulte Stammzelltherapie	2
1.2 Mesenchymale Stammzellen	4
1.3 Thrombozytenkonzentrate.....	6
1.3.1 Thrombozyten.....	8
1.3.2 Aktivierung von Thrombozyten	8
1.3.3 Speichergranula.....	9
1.3.4 Thrombozytäre Oberflächenmarker: P-Selektine.....	10
1.4 Wachstumsfaktoren.....	10
1.4.1 PDGF	11
1.4.2 TGF- β	11
1.4.3 IGF.....	12
1.4.4 VEGF.....	13
1.5 Osteoblast.....	14
1.6 Alkalische Phosphatase	15
1.7 Runx2.....	16
1.8 Anwendungsgebiete von PRP.....	16
2. Ziele der Arbeit	17
3. Can Thrombin-activated Platelet Releasate compensate the age-induced decrease in cell proliferation of MSC? Melanie Vogl, Johannes Fischer, Marcus Jäger, Christoph Zilkens, Rüdiger Krauspe, Monika Herten, Journal of Orthopedic Research, Volume 11: 1786-95 .	18
4. Diskussion	31
4.1 Proliferation von MSZ.....	31
4.2 Alternde MSZ.....	31
4.3 Differenzierung von MSZ.....	33
4.4 Autologes oder allogenes tPR.....	34
4.5 Morphologische Unterschiede der Zellen	35
4.6 Anwendungsformen des Thrombozytenkonzentrats.....	35
4.7 Aktivierung der Thrombozytenkonzentrate	37
4.8 <i>In vivo</i> Anwendung von Thrombozytenkonzentraten	38
5. Schlussfolgerung	38
6. Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

Der Mensch besteht aus einer überwältigenden Anzahl von Zellen. Für die Funktion des menschlichen Körpers ist es von großer Bedeutung, dass eben jene Zellen sowie die Verbindungen und Systeme in denen sie wirken unbeschadet oder regenerationsfähig sind. Aber wer kleine Kinder in ihrem Forschungsdrang beobachtet oder mit älteren Menschen arbeitet, deren Sehkraft und Stabilität langsam nachlässt, weiß, dass diesen Zellen viel abverlangt wird und die Zellregeneration nicht nur bei diesen Altersgruppen eine wichtige Fähigkeit des menschlichen Körpers ist. Abschürfungen der Haut und Knochenbrüche sind einige der am häufigsten vorkommenden Verletzungen.

Für jedes Gewebe gibt es eine optimale Behandlung um die Regeneration zu unterstützen. In der Orthopädie, wo sich insbesondere Oberschenkelhalsfrakturen im älteren Patientenkollektiv finden, wird ein besonderes Augenmerk auf die Erneuerung von Knochenzellen zur Heilung der Knochenbrüche gelegt.

Ein wichtiges Problem im Hinblick auf den demographischen Wandel - im Jahr 2020 werden 39,2 % der Bevölkerung von Deutschland über 60 Jahre alt sein (Statistisches Bundesamt Deutschland)- ist, dass ältere Patienten eine deutlich verlängerte Frakturheilung haben (Lu et al. 2005). Dies und die Physiologie des alternden Körpers führt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität nach Frakturen (Cauley et al. 2000; Vestergaard, Rejnmark, und Mosekilde 2009). Die Mortalität im ersten Jahr nach einer Oberschenkelhalsfraktur beträgt bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, 3 % und steigt mit dem Alter. Bei über 90 jährigen Patienten betrug die Mortalität ein Jahr nach Fraktur in dieser Studie bis zu 51% (Keene, Parker, und Pryor 1993). Ziel der medizinischen Therapie sollte eine Schmerzreduktion, eine Reduktion der Mortalität sowie Morbidität und somit der Erhalt der selbstständigen Lebensführung sein. Um diese Ziele zu erreichen gibt es viele Ansatzpunkte, wie die frühe Rehabilitation mit Hilfe der Physiotherapie, (Binder EF et al. 2004) sowie die Stoßwellentherapie (Wang, Liu, und Fu 2007) aber auch die peri-operative Applikation von Wachstumsfaktoren. Alle diese Verfahren zeigen eine Verbesserung der Knochenheilung, greifen aber an unterschiedlichen Zeitpunkten der Knochenheilung an.

Gerade die Applikation von Wachstumsfaktoren fördert das Wachstum der Zellen direkt. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die verlängerte Frakturheilung bei älteren Patienten wichtig. Zum einen ist bei diesem Patientenkollektiv die Anzahl der mesenchymalen Vorläuferzellen im Knochenmark reduziert (Katsara et al. 2011) und zum anderen scheinen die vorhandenen Zellen in ihrer Biologie verändert zu sein. Das Potential dieser

Zellen sich zu Osteoblasten weiterzuentwickeln ist reduziert (Leskelä et al. 2003, D'Ippolito et al. 1999). Außerdem zeigt sich *in-vitro* eine deutliche Proliferationsminderung im Vergleich zu Zellen von jungen Patienten (Zhou et al. 2008, Roobrouck, Ulloa-Montoya, und Verfaillie 2008). Zusätzlich findet sich neben der verminderten Proliferation eine erhöhte Apoptoserate (Stolzing und Scutt 2006).

Das heißt, dass die Zellen langsamer wachsen und zudem auch noch vermehrt absterben, da es zusätzlich zu DNA Veränderungen kommt. Die Telomerenlänge, die bei dem Prozess des Alterns eine wichtige Rolle spielt, ist verkürzt (Baxter et al. 2004). Der Einfluss des Alters auf die Differenzierung von MSZ ist noch nicht ausreichend geklärt und wird kontrovers diskutiert, da es unterschiedliche Forschungsergebnisse bei unterschiedlichen Forschungsmethoden gibt (Sethe, Scutt, and Stolzing 2006).

1.1 Adulte Stammzelltherapie

Die adulte Stammzelltherapie kann an den oben genannten Punkten eingreifen. Sie ist ein sehr wichtiger und vielversprechender Teil der regenerativen Medizin und des *tissue engineering*. Stammzellen sind in der Lage, sich in viele verschiedene Zellarten zu entwickeln. Sie könnten der Jungbrunnen sein, nach dem die Menschheit fortwährend sucht. Nicht ohne Grund zielt die Vermarktung verschiedener Kosmetika und Nahrungsergänzungsmittel darauf ab, uns glauben zu lassen, dass jedes einzelne dieser Produkte der seit Jahrhunderten gesuchte Jungbrunnen ist. Jedoch sind die Zellen der adulten Stammzelltherapie pluripotent und können sich nicht mehr in alle Zellarten differenzieren. Verwendet werden mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen (HPZ). MSZ können sich über eine Reihe von Vorläuferzellen zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten entwickeln. HPZ können alle Blutzellen bilden und befinden sich primär im Knochenmark. Sie werden als Therapie bei Leukämien und Lymphomen eingesetzt. MSZ finden sich auch vorwiegend im Knochenmark, aber auch in der Leber, dem Fett, der Haut, dem Perichondrium, der Synovialflüssigkeit und in geringerer Anzahl im ganzen Körper - insbesondere in gut durchbluteten Geweben (Meirelles, Chagastelles, und Nardi 2006). Auch das humane Ovar scheint Stammzellen zu enthalten, aus welchen sich Oozyten entwickeln können. Dadurch könnten sich die Möglichkeiten der Reproduktionsmedizin in Zukunft verbessern (Duke und Taylor 2013). Ein weiteres Beispiel sind die Stammzellen im Riechepithel, welche im Tierversuch an Ratten ihr Potential für eine Regeneration zerstörter Axone im Rückenmark zeigten (Keyvan-Fouladi, Raisman, und Li 2003). Dies könnte in Zukunft eine bessere Therapierbarkeit querschnittsgelähmter Patienten bedeuten.

Ein ganz neuer Ansatz sind die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), die von John Gurdon und Shinya Yamanaka entdeckt und auf Grund ihrer herausragenden Wirkung auf die Zukunft der Stammzelltherapie mit dem Nobelpreis prämiert wurden. IPS entstehen aus ausdifferenzierten Zellen wie z.B. Mäusefibroblasten, welche durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren wieder omnipotent werden (Takahashi und Yamanaka 2006). Die Entdeckung der iPS ermöglicht die weitere Stammzellforschung ohne das ethische Dilemma der embryonalen Stammzellen tangieren zu müssen. Ob die iPS in allen Eigenschaften mit den natürlich vorkommenden Stammzellen übereinstimmen, ist jedoch noch nicht geklärt.

Bei einer Stammzelltherapie werden dem Patienten Stammzellen entnommen und in defekte Gewebe transplantiert. Bisher wurden regelhaft nur Knochenmarkstammzellen bei Leukämien und Lymphomen eingesetzt. In allen anderen Bereichen wie Knochen-, Knorpel-, Herz-, Diabetes- und gastrointestinalen Krankheiten, Neurodegenerative und Immunerkrankungen sowie der Krebstherapie werden MSZ bisher nur im Rahmen klinischer Studien eingesetzt (s.Abb. 1) (Trounson et al. 2011). So sind derzeit (Stand 12. September 2016) bei Clinical Trials Gov (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mescnchymal+stem+cells>) 650 Studien mit MSZ registriert. Diese umfassen alle Studienstadien von Phase I; der Testung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, Phase II; der Überprüfung der Therapie und Dosistestung; bis hin zum signifikanten Wirkungsnachweis und der Marktzulassung in Phase III (s. Abb. 2).

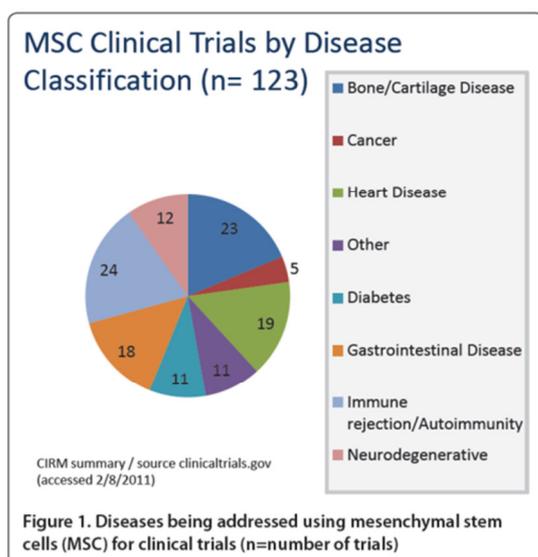


Abb. 1: Anzahl und Verteilung klinischer Studien mit Mesenchymalen Stammzellen
 Mesenchymale Stammzellen werden derzeit für ein breites Spektrum an Krankheiten getestet (Trounson et al. 2011).

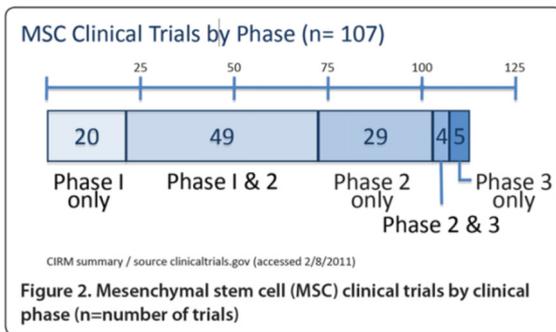


Abb. 2: Klinische Studien mit mesenchymalen Stammzellen nach Studienstadien sortiert

Studien mit mesenchymalen Stammzellen sind in allen Studienstadien vertreten (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=meseenchymal+stem+cells>).

Beispiele verschiedener Studien mit MSZ berichten über erfolgsversprechenden regenerativen Einsatz. 2003 konnte Stamm zeigen, dass einzelne Herzmuskelzellen nach einem Herzinfarkt mit Hilfe einer Transplantation von MSZ ersetzt und dadurch die linksventrikuläre Funktion verbessert werden konnte (Stamm et al. 2003). Jüngste Studienergebnisse belegen, dass Knorpeldefekte in Gelenken durch die Applikation von Knochenmark und seinen Zellen regeneriert werden können (Buda et al. 2013). Dies bedeutet für die Patienten die Möglichkeit auf ein schmerzfreies Fortbewegen. In einer Arbeit von Goel et al. aus 2005 wurden MSZ erfolgreich in der Therapie von Knochenbrüchen eingesetzt, um das Zusammenwachsen der Knochenfragmente zu beschleunigen und einer Pseudarthrosebildung vorzubeugen (Goel et al. 2005).

1.2 Mesenchymale Stammzellen

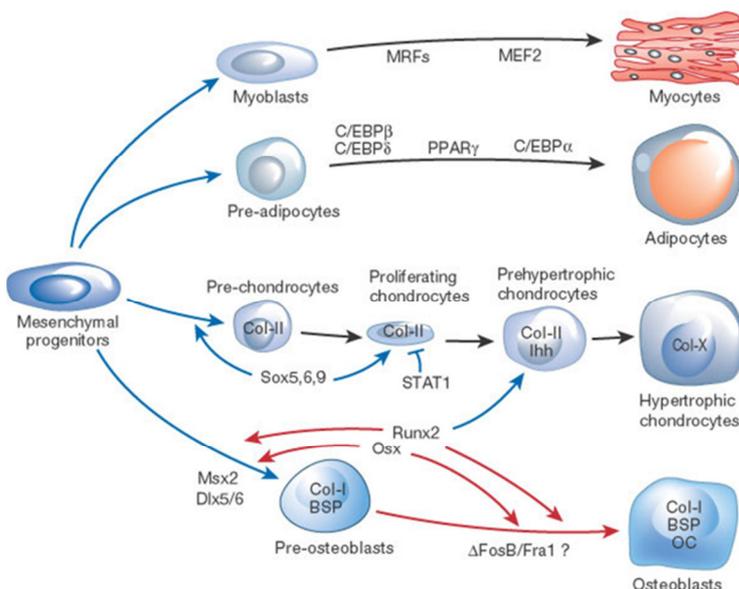


Abb. 3 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen können sich über eine Reihe von Vorläufern zu Myozyten, Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten entwickeln. MRFs, *myogenic regulatory*; MEF2, *myocyte-enhancer factor 2*; C/EBP, *CCAAT-enhancer-binding protein*; PPAR γ , *peroxisome proliferator-activated receptor g*; STAT1, *signal transducers and activators of transcription-1*; Runx2, *runt-related transcription factor 2*; Col-I/III/X, Kollagen I/III/X; Ihh, *Indian hedgehog*; BSP, *bone sialoprotein*; OC, osteocalcin. (Harada and Rodan 2003).

Für die Knochenregeneration in der Orthopädie sowie in der Oralchirurgie werden neben MSZ aus dem Fettgewebe insbesondere MSZ aus dem Knochenmark verwendet. MSZ sind spindelförmige Zellen und können sich über eine Reihe von Vorstufen zu Adipozyten, Myozyten, Chondrozyten und Osteoblasten entwickeln (s. Abb.3). Die Ergebnisse der experimentellen sowie klinischen Studien sind vielversprechend. Eine aktuelle Übersicht findet sich in dem Artikel von Murphy und Caplan 2013.

MSZ können aus vielen verschiedenen Geweben isoliert werden, aber die einfache Erreichbarkeit durch eine Knochenmarkpunktion und die große Anzahl der MSZ aus dem Knochenmark sind der Grund für ihren vielfältigen therapeutischen Einsatz. Das große Potential der Stammzelltherapie mit MSZ wird jedoch von den Veränderungen der Zellen im Alter vermindert.

Die alternde MSZ weist spezifische Eigenschaften auf, welche im Folgenden kurz genannt werden. Mit steigendem Alter wird eine geringere Regenerationsfähigkeit des Knochens beobachtet (Gruber et al. 2006). Ein Grund dafür könnte die verminderte Anzahl der zur Verfügung stehenden Osteoblasten im Alter sein (D'Ippolito et al. 1999). Es scheint, dass die Differenzierung in die osteoblastäre Zellrichtung im Alter vermindert ist. Außerdem sind die *Colony forming Units* (CFU) vermindert. Die CFU beschreibt die Anzahl an Zellen, welche durch Zellteilung aus einer Vorläuferzelle entstehen (Sethe, Scutt, und Stolzing 2006). Die Wachstumsrate der Zellen von älteren Patienten ist reduziert, das heißt, dass die Verdopplungszeiten verlängert sind (Baxter et al. 2004).

Weiterhin zeigen MSZ von älteren Patienten eine andere Zellmorphologie. Sie sind *in-vitro* größer und zeigen keine Spindelform, welche bei MSZ von jüngeren Patienten schon früh vorhanden ist. Aber auch die MSZ der jungen Patienten verlieren ihre Spindelform bei verlängerter *in-vitro* Kultivierung (Baxter et al. 2004; Sethe, Scutt und Stolzing 2006). Dies ist ein Anzeichen für Seneszenz (Roobrouck, Ulloa-Montoya und Verfaillie 2008) und geht mit einer verkürzten Telomerenlänge einher. Die Verkürzung der Telomeren spielt eine wichtige Rolle bei dem molekularen Alterungsprozess. Mit jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomeren, bis sie eine Länge erreichen, bei welcher keine Zellteilung mehr stattfindet (Baxter et al. 2004). Dadurch begrenzt die Telomerenlänge das Alter einer Zelle.

Diese Forschungsergebnisse bedeuten, dass es eine verminderte Anzahl von osteoblastären Vorläuferzellen im Alter gibt, welche in ihrer Morphologie verändert sind und sich schlechter zu Osteoblasten differenzieren. Außerdem ist eine deutliche Wachstumsratenreduktion vorhanden. Ob die Änderungen in der Zellmorphologie eine physiologische Bedeutung haben, ist noch unklar. Genau an diesen Punkten könnte also angeknüpft werden, um die Stammzelltherapie im Alter zu verbessern. Mögliche Ansatzpunkte wären eine Förderung der Zellproliferation und der Differenzierung mit Zytokinen. Pountos et al. konnten 2010 zeigen, dass *Platelet derived growth factor-beta* (PDGF- β) und *Bone morphogenetic protein 7* (BMP-7) die Differenzierung und Proliferation von MSZ aus osteoporotischen Knochen erhöht. Thrombozyten enthalten eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie den *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), PDGF- β , und den *Transforming growth factor-beta* (TGF- β). Dies ist der Grund, warum sich Thrombozytenkonzentrate wie *Platelet rich plasma* (PRP) an einer immer größer werdenden Beliebtheit im Zusammenhang mit der regenerativen Orthopädie erfreuen.

1.3 Thrombozytenkonzentrate

PRP besteht aus Blutplasma mit hochkonzentrierten Thrombozytenzahlen. Dies eröffnet die Möglichkeit einer autogenen Herstellung mit einer einfachen Blutspende. Je nach Herstellungsverfahren variieren die Konzentrationsfaktoren und die Menge der Wachstumsfaktoren, welche im PRP enthalten sind (Mazzocca et al. 2012). Dennoch hat sich eine Thrombozytenzahl von 100000/ μ l Konzentrat in der Forschung etabliert.

Thrombozyten enthalten viele Wachstumsfaktoren, welche die Wundheilung fördern können (Fréchette, Martineau und Gagnon 2005). Diese Wachstumsfaktoren scheinen jedoch als Kombination, ohne Thrombozyten nicht so wirkungsvoll zu sein (Fekete et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass es noch andere wichtige Faktoren bzw. unbekannte Synergien in Thrombozyten gibt, die die Wundheilung beeinflussen. Daraus resultiert die große Bedeutung der Verwendung von Thrombozytenkonzentraten für die Wundheilung.

In vielen Studien wurde bisher ein positiver Effekt von PRP auf die Proliferation von MSZ nachgewiesen (Arpornmaeklong et al. 2004; Lei et al. 2009; van den Dolder et al. 2006). Eine Proliferationszunahme der MSZ verkürzt die Frakturreparaturzeit, ist aber auch bei dem Einsatz von Biomaterialien von Vorteil. So könnte PRP bei der *in-vitro* Vermehrung der Zellen durch eine Steigerung der Zellproliferation die Zellanzuchtzeit *in-vitro* reduzieren.

Die Hypothese, dass auch die Differenzierung von MSZ gesteigert werden kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert, da es viele verschiedene Forschungsergebnisse gibt. Konsens besteht jedoch darin, dass durch Thrombozytenkonzentrat die Differenzierungsmöglichkeit der MSZ in adipogene, chondrogene und osteoblastäre Zellreihen nicht negativ beeinflusst wird (Doucet et al. 2005; Azouna et al. 2012).

Zurzeit werden vier verschiedene Arten der Anwendung von konzentrierten Thrombozyten praktiziert: Die erste und klassische Anwendungsform ist aktiviertes PRP, welches als *Clot* – das sogenannte Platelet-Gel verwendet wird. Anwendung findet diese Form des aktivierten PRP *in-vitro* und auch *in-vivo* regelhaft bei der Wundheilung bei diabetischen Fußulcera (Martinez-Zapata et al. 2012). Das Platelet-Gel kann auch anstatt als *Clot* dazugegeben, den Boden eines Wells auskleiden. Eine weitere Methode ist, dass nicht-aktivierte Thrombozyten in drei aufeinanderfolgenden Gefrier- und Auftauphasen bei -80°C lysiert werden und dieses Lysat weiter verwendet wird (nicht aktiviert). Dies wird in der Literatur als Platelet-Lysat (PL) betitelt. Eine weitere Anwendungsform stellt das *Platelet Releaseate* (PR) dar, welches durch die Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin, entweder gleichzeitig autolog hergestelltem oder synthetisch produziertem, gewonnen wird. Nach Zentrifugation werden nur die freigesetzten Faktoren auf die Zellen gegeben. Als weiteres Verfahren kann das PRP schließlich auch direkt ohne Aktivierung zu den Zellen gegeben werden (Borzini und Mazzucco 2005).

Ein Resultat der verschiedenen Anwendungsformen könnten die verschiedenen Forschungsergebnisse sein.

Ein wichtiger Grund für die Verwendung von PRP in der Zellanzucht, ist neben der Proliferationssteigerung, die Möglichkeit, dies tiereserumfrei durchzuführen. Die Verwendung von bovinem Serum birgt das Risiko einer Immunreaktion, da das Transplantat nach der Anzucht körperfremde Proteine beinhaltet (Spees et al. 2004; Sundin et al. 2007). So kann es bei einer benötigten Zweitanwendung von in bovinem Serum gezogenen Zellen zu einer anaphylaktischen Reaktion kommen. Dies gefährdet nicht nur den Patienten, sondern wirkt sich negativ auf das Anwachsen der Zellen und somit auf die Wundheilung aus.

Durch die Verwendung von autologem Patientenserum und autologem Thrombozytenkonzentrat bzw. durch Insulin-Transferrin-Selen (ITS) als FKS Ersatz in Kombination mit autologem Thrombozytenkonzentrat kann eine Immunreaktion auf das Zelltransplantat verhindert (Kisiday et al. 2005).

1.3.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind der Hauptbestandteil des Thrombozytenkonzentrates und ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Gerinnungssystems, da sie an der primären sowie sekundären Hämostase beteiligt sind. Durch sie werden die Blutungszeit nach einer Verletzung sowie der potentielle Blutverlust reduziert. Schon 1865 entdeckte Max Schulze Thrombozyten als Bestandteil des Blutes. 1882 untersuchte Guilio Bizzozero Thrombozyten unter dem Mikroskop und postulierte, dass sie an geschädigten Blutgefäßen haften bleiben (Brewer 2006). Doch erst seit einigen Jahrzehnten ist eine weitere Aufgabe in den Blickwinkel der medizinischen Forschung gelangt: Thrombozyten als Träger von Wachstumsfaktoren. Auf dieser Eigenschaft beruht die therapeutische Anwendung von PRP.

Die physiologische, menschliche Thrombozytenzahl beträgt 150.000 - 300.000 Thrombozyten pro μl Vollblut. Thrombozyten sind diskusförmige, kernlose Fragmente der Megakaryozyten, die im Blut ca. 7-10 Tage zirkulieren. Danach werden sie im retikuloendothelialen System abgebaut. Sie sind $0,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ dick und haben einen Durchmesser von $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$. Ihr Gewicht beträgt ungefähr 10pg.

1.3.2 Aktivierung der Thrombozyten

Thrombozyten kommen in zwei Aktivitätszuständen vor: aktiviert, als Teil des Gerinnungssystems und nicht aktiviert, in welchem sie, beim gesunden Individuum, im Blut zirkulieren. Sie haben im nicht aktivierten Zustand eine Oberfläche von $8\mu\text{m}^2$, die sich nach Aktivierung auf $13 \mu\text{m}^2$ vergrößert (Gawaz 1999). Diese Oberflächenvergrößerung ist für die Funktion der Thrombozyten von großer Bedeutung.

Thrombozyten können im Körper durch Scherstress, Verletzungen des Endothels, Verlangsamung des Blutflusses sowie Kollagen, ADP, Calcium, Thrombin, Thromboxan A₂, Adrenalin, Matrix- Metalloprotease, Serotonin, Immunkomplexe, Komplementfaktoren, Vasopressin, Streptokinase, immobilisiertes Fibrinogen und den von Willebrand Faktor (vWF) aktiviert werden.

Für die experimentelle Aktivierung wird eine Kombination von 10.000 IU bovinem Thrombin und 10% Kalziumchlorid verwendet (Arpornmaeklong et al. 2004; Lei et al. 2009). Die Menge des bovinen Thrombin variiert jedoch und kann mit 300 IU deutlich niedriger sein (Van den Dolder et al. 2006; Tomoyasu et al. 2007). Einige Autoren verwenden nur Kalziumchlorid (Drengk et al. 2009). PL wird, wie oben beschrieben, nicht aktiviert, sondern nur in Gefrier- und Auftauschritten lysiert.

Die Aktivierung führt zu einer Formveränderung von einer diskusförmigen Scheibe zu einem stacheligen Thrombozyten mit vielen Pseudopodien. Letztere ermöglichen die Vernetzung der aktivierten Thrombozyten untereinander und helfen bei der Abdichtung des Defekts. Bei der Aktivierung erfolgt auch eine Degranulation der Speichergranula, was wiederum eine Verstärkung der Aktivierung und eine Rekrutierung weiterer Thrombozyten zur Folge hat.

1.3.3 Speichergranula

Thrombozyten besitzen sowohl α -Granula als auch dichte, sowie lysosomale Granula. Die α -Granula werden in verschiedene Subtypen aufgeteilt, welche bei der Aktivierung unterschiedlicher Rezeptortypen sezerniert werden können (Curotto et al. 2012). Thrombozyten sind nur kernlose Zellfragmente von Makrophagen und können daher selbst keine RNA synthetisieren, keine neuen Proteine herstellen und müssen deshalb auf ihre Enzymerstausstattung durch die Megakaryozyten zurückgreifen. Dennoch beinhalten α -Granula eine Vielzahl verschiedener Proteine. Einige davon, wie der vWF und *Platelet Factor 4*, sind Produkte der Megakaryozyten. Andere Proteine, wie das Fibrinogen, werden jedoch mit Hilfe rezeptorgesteuerter Endozytose aufgenommen. Durch Pinozytose können die Thrombozyten Plasmaproteine wie Albumin und Immunglobulin G (IgG) aufnehmen (George 2000). Wachstumsfaktoren wie PDGF- β , *Insuline-like growth factor* (IGF), *Epidermal growth factor* (EGF), *Transforming growth factor- α* (TGF- α) und VEGF entstammen den Makrophagen und sind weitere Bestandteile der α -Granula.

Dichte Granula enthalten Calcium-Ionen und ADP/ATP, welche wichtige Co-Faktoren für die Aktivierung von weiteren Thrombozyten darstellen. Das vorhandene Serotonin wirkt auf das Endothel von Blutgefäßen und führt dort zu einer Vasokonstriktion und einer Permeabilitätssteigerung. Während das enthaltene Histamin pro und anti-inflammatorisch wirken kann (Anitua et al. 2004). Weiterhin enthalten die dichten Granula noch Phosphat und Guaninnukleotide.

Die lysosomalen Granula enthalten Hydrolasen zur Auflockerung der subendothelialen Struktur. Die Sekretion der Granula während der Aktivierung der Thrombozyten erfolgt in der Reihenfolge: dichte Granula, α -Granula und lysosomale Granula.

Dichte Granula	α -Granula
ATP	Enzyme
ADP	Adhäsionsproteine: Fibrinogen, Thrombospondin, Fibronectin, Glykoprotein IIb/IIIa
Ca ⁺⁺	Wachstumsfaktoren:
Serotonin	PDGF- β , TGF, IGF-1, EGF, β -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4, VEGF
Phosphat	Gerinnungsfaktoren: Faktor V und Faktor XIII
Guaninnukleotide	Fibrinolysefaktoren: vWF, Fibrinogen, Faktor V Plasminogen, Plasminogen-aktivator-Inhibitor 1
Histamin	P-Selektin (CD 62-P)
	Proinflammatorische Faktoren: Interleukin-1, CD40-Ligand

Tabelle 1: **Aufstellung des Inhalts von dichten Granula sowie α -Granula von Thrombozyten**
 Inhalt der Thrombozytengranula: VWF (van Willebrand Faktor), PDGF (Platelet derived growth factor), TGF (Transforming growth factor), IGF-1 (Insuline like growth factor 1), EGF (Epidermal growth factor), VEGF (Vascular endothelien growth factor).

1.3.4 Thrombozytäre Oberflächenmarker: P-Selektine

Um die Aktivierung der Thrombozyten nachzuweisen gibt es verschiedene direkte und indirekte Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist der Nachweis des Glykoproteins P-Selektin auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten. Das P-Selektin, CD 62 P oder GMP-140 ist in α -Granula von Thrombozyten enthalten und wird nach Aktivierung an der Plasmamembran des Thrombozyten exprimiert (Stenberg et al. 1985). Zudem befindet sich das P-Selektin in den Weibel-Palade Körperchen von Endothelzellen (Bonfanti et al. 1989)

1.4 Wachstumsfaktoren

Die wichtigsten Inhaltstoffe der α -Granula, auf welchen die beobachtete Wirkung des PRP beruht, sind die Wachstumsfaktoren: PDGF-BB, TGF- β , IGF-1, VEGF. Sie haben eine Vielzahl von Aufgaben und Wirkungsorten und werden im Folgenden im Einzelnen kurz beschrieben.

1.4.1 PDGF

PDGF ist der Überbegriff für eine Familie von Wachstumsfaktoren; PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D. Schon 1970 wurden PDGF-A und B in den α -Granula von Thrombozyten entdeckt. Sie werden als aktive Liganden sekretiert. Erst Anfang des 21. Jahrhunderts wurden dann PDGF-C und D gefunden, welche erst durch eine proteolytische Spaltung der sogenannten CUB-Region aktiviert werden (Bergsten et al. 2001; Li et al. 2000). Jedes dieser Familienmitglieder ist ein dimeres Molekül, welches aus zwei Disulfid-gebundenen Polypeptidketten besteht. Dadurch können Homodimere aber auch Heterodimere gebildet werden (Johnsson et al. 1982), wobei nur PDGF-A und PDGF-B Heterodimere bilden können. Somit gibt es fünf verschiedene Isoformen: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD. Für alle PDGF-Isoformen fungieren die Rezeptor-Isoformen PDGFR- α und PDGFR- β als Tyrosin-Kinase Rezeptoren. Sie liegen als Homodimere vor, welche nach Bindung eines Liganden dimerisieren. Dies führt auch zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung (Heldin, Östman und Rönstrand 1998). Da auch sie als Homo - und Heterodimere existieren können resultieren daraus drei verschiedene Kombinationen. Die verschiedenen Liganden-Isoformen weisen unterschiedliche Affinitäten zu den Rezeptor-Isoformen auf.

Die Gene für PDGF-A liegen auf Chromosom 22 und für PDGF-B auf Chromosom 7 (Bonthon et al. 1988). Die Gene für PDGF-C und D liegen auf Chromosom 4 und 11.

PDGF ist wichtig für die Embryonalentwicklung (Li and Eriksson 2003). PDGF-C wird in glatter Muskulatur exprimiert, wohingegen PDGF-D zumeist in fibroblastischen Adventitiazellen gefunden wurde. Beide Isoformen wurden bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen (Uutela et al. 2001).

Die in den Thrombozyten vorkommende Isoform PDGF-B wird in Osteoblasten während der Knochenformation nach Frakturen vermehrt gebildet. PDGF-A hingegen wird von verschiedenen Zellen u.a. Endothelzellen und Osteoblasten produziert (Andrew et al. 1995). PDGF ist ein potentes Mitogen, welches die Osteopontinexpression in Osteoblasten verstärkt (Tanaka und Liang 1995).

1.4.2 TGF- β

TGF- β ist Bestandteil einer Familie von Wachstumshormonen, von welcher TGF- β 1, 2 und 3 bekannt sind. Sie liegen als Homodimere vor. TGF- β 1 kommt in Thrombozyten vor und besteht aus zwei identischen Disulfid verbundenen Ketten mit jeweils 112 Aminosäuren. Jede Kette entsteht aus einem Vorläufer Molekül, welches 390 Aminosäuren besitzt (R Derynck et al. 1985).

TGF- β ist ein vielseitiges Peptid, das die Proliferation, Differenzierung und andere Funktionen in vielen Zelltypen kontrolliert. Es ist für die normale Entwicklung verschiedener Organe zuständig, belegt durch knock-out Mäuse, welche Entwicklungsdefizite an Lunge, Herz, Urogenitaltrakt, Augen, Ohren und am Rückenmark aufwiesen (Sanford et al. 1997). TGF- β spielt zudem noch eine wichtige Rolle in der Wundheilung. Durch Veränderung der Verhältnisse der verschiedenen TGF Familienmitglieder kann vermehrte Narbenbildung und Fibrose reduziert werden. Andererseits kommt es durch die Addition von TGF- β zu einer beschleunigten Wundheilung (O’Kane und Ferguson 1997). Die Kontrolle der Immunabwehr ist eine weitere wichtige Aufgabe von TGF- β . Denn TGF- β negative Mäuse leiden an massiven Entzündungen und sterben früh (Kulkarni et al. 1993). Außerdem wirkt TGF- β positiv auf die Proliferation von adulten mesenchymalen Stammzellen, unterdrückt aber deren Differenzierung zu Osteoblasten (s.Abb.4) (Boland et al. 2004).

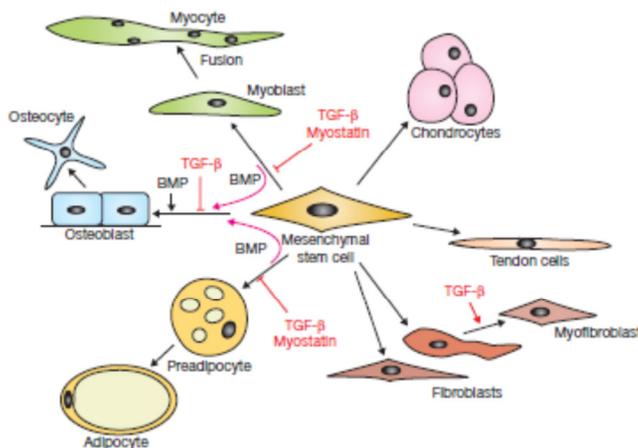


Abb.4 **Auswirkungen von TGF- β auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen**

Transforming growth factor β (TGF- β) fördert die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Myofibroblasten und inhibiert die Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Myozyten. BMP; *Bone morphogenic protein* (Rik Derynck and Akhurst 2007).

Eine Fehlregulation von TGF- β kann jedoch zur Lungenfibrose oder auch zu verschiedensten malignen Tumorerkrankungen sowie zu deren Progression führen, da TGF- β endothelialen Zellen zu einer vermehrten Migration und Invasion verhilft (Katsuno, Lamouille und Derynck 2013). Alle TGF- β Varianten binden an zwei Rezeptoren: TGF- β Rezeptor I und II. Sie sind Serin-Threonin Kinasen, welche als Homodimere vorliegen und durch das Binden von TGF- β ein Heterotetramer bilden (Wrana et al. 1992).

1.4.3 IGF

Zur Familie der Insulin-like-growth factors gehören Peptide, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielen. Zurzeit sind drei IGFs bekannt: IGF 1 (auch Somatomedin C

genannt) IGF 2 und IGF 3, wobei IGF 3 nur in Fischen vorkommt. IGFs sind homologe Peptide, welche eine ähnliche Struktur wie Insulin haben, indem sie aus einer A-Kette und einer B-Kette bestehen und homolog zu den jeweiligen Ketten des Insulins sind. Insulin zirkuliert im menschlichen Körper ohne die Hilfe eines Bindungsproteins, wohingegen IGF 1 und 2, welche hauptsächlich in der Leber gebildet werden, sechs verschiedene Bindungsproteine besitzen. Diese Bindungsproteine können zudem die Aktivität der Wachstumsfaktoren beeinflussen (Jones und Clemmons 1995). IGF 1 und 2 spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und vermittelt viele wachstumsfördernde Effekte des Growth hormones (GH). IGF 1 ist aber auch in der späteren Entwicklung als Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysenachse am Längenwachstum beteiligt (Le Roith 1997). Außerdem wird IGF 1 von vielen Geweben produziert und wirkt als Mediator für Kolon, Brust, Prostata und Schilddrüsenkrebs (Loeper und Ezzat 2008). Es beeinflusst die Wachstumsgeschwindigkeit und die Metastasenbildung von Tumorzellen positiv (Wu et al. 2002). Auch die Knochenbildung wird durch IGF I stark beeinflusst. Das Hormon führt zur Differenzierung von Osteoblasten, zur Mineralisierung der Knochenmatrix und wirkt der Apoptose entgegen (M. Zhang et al. 2002; Nakayama et al. 2006; Delany, Pash, and Canalis 1994).

1.4.4 VEGF

Die Familie der Wachstumsfaktoren VEGF besteht aus mehreren Mitgliedern: VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, *Placenta like growth factor* und zwei VEGF-like Proteinen (Ferrara und Davis-Smyth 1997). Als Rezeptoren für VEGF dienen die Tyrosin-Kinasen FLT-1 und KDR. Auslöser für eine vermehrte Produktion können Hypoxie und andere Zytokine wie TGF- β sein, welches in vielen verschiedenen Zellen gebildet werden kann. Die Funktionen von VEGF sind vielfältig u.a. in der Angiogenese, wo es als Mitogen für endotheliale Zellen wirkt. Weiterhin kann VEGF die Permeabilität von Gefäßen beeinflussen (Mustonen und Alitalo 1995). Durch diese Beeinflussung der Angiogenese spielt VEGF auch eine Rolle bei der proliferativen diabetischen Retinopathie, welche auf einer Neovaskularisation der Netzhaut beruht (D'Amore 1994). Tumorzellen, welche VEGF-Rezeptoren exprimieren sind mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Metastasen verbunden. In der Therapie des metastasierten Brustkrebs werden Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren eingesetzt, um die Neovaskularisierung einzudämmen und somit die für den Tumor wichtige Blutzufuhr zu reduzieren (Scully et al. 2012).

VEGF ist auch bei der enchondralen Ossifikation wichtig, da es für die Blutversorgung der Zellen sorgt und die Differenzierung von Osteoklasten kontrolliert. Osteoblasten und ihre

Vorläufer besitzen VEGF Rezeptoren, welche insbesondere in den ersten vier Tagen nach einer Fraktur vorhanden sind (Uchida et al. 2003). Dies zeigt, dass VEGF durch die Stimulation der Angiogenese, sowie durch die Kontrolle von Osteoblasten und Osteoklasten zur Knochenregeneration und -neubildung beiträgt.

Ziel der Applikation von PRP auf MSZ ist die Entwicklung von Osteoblasten, welche durch die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren stimuliert und gesteuert wird.

1.5 Osteoblast

Die Aufgabe eines Osteoblasten besteht in der Produktion der Knochensubstanz, der Regulierung des Knochenbaus durch die Osteoklasten und in der Steuerung der Mineralisierung des Knochens. Osteoblasten liegen entweder direkt unter dem Periost oder in der Nähe von bereits mineralisierter Knochenmatrix. Das durch den Osteoblasten produzierte Kollagen I stellt die Grundsubstanz für die Knochenmatrix dar und wird Osteoid genannt. Osteoblasten steuern die Mineralisierung des Knochens, indem sie die Konzentration von Kalzium und Phosphat in ihrer Umgebung kontrollieren. Die Matrixproduktion bestimmt das spätere Volumen des Knochens. Die Dichte des Knochens wird jedoch durch die Menge der Mineralisierung bestimmt, da diese Wasser verdrängt (Manolagas 2000).

Der Name Osteoblast wurde von Carl Gegenbauer geprägt, welcher sie schon 1864 als granuläre Korpuskel beschrieb. Osteoblasten stammen von MSZ ab und entwickeln sich über eine Reihe von Vorstufen zum adulten Osteoblasten. Die Entwicklung von der MSZ zum reifen Osteoblasten läuft über drei Vorstufen ab.

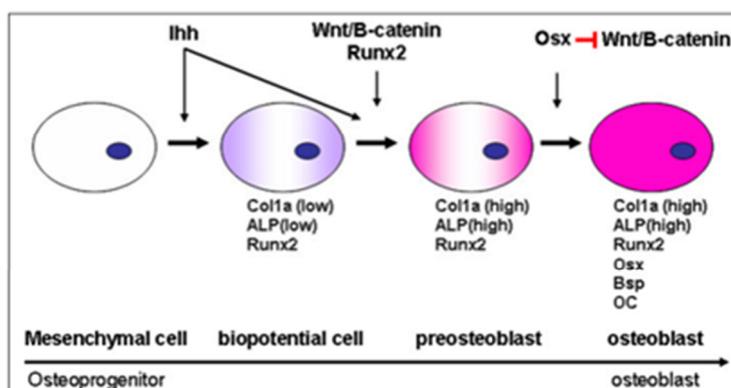


Abb. 5 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten

Mesenchymale Stammzellen entwickeln sich über Vorläuferzellen zum Preosteoblasten und schließlich zum Osteoblasten. Dabei exprimieren sie den Transkriptionsfaktor Runx2 in unterschiedlichem Ausmaß. Auch die alkalische Phosphatase (ALP) wird von den Vorläufern in

unterschiedlichem Ausmaß gebildet. Zusätzlich wird Kollagen 1 (Col1a), Osteocalcin (OC), Osterix (Osx) und *bone Sialoprotein* (BSP) gebildet (C. Zhang 2010).

Als erstes gibt es den unreifen osteoblastären Vorläufer. Er exprimiert schon den Transkriptionsfaktor Runx2, braucht aber einen osteogenen Stimulus (z.B. Dexamethason) um sich weiter zu entwickeln. Als nächstes folgt der reife osteoblastäre Vorläufer, der in der Lage ist extrazelluläre Matrix aus Kollagen I und Osteopontin (OPN) zu produzieren. Weiterhin findet sich an der Außenseite der Zellmembran die alkalische Phosphatase (ALP). Beide osteoblastären Vorläuferzellen haben sehr hohe Proliferationsraten und werden häufig zu einem Vorläufer zusammengefasst (Abb.5). Als letzte Zelle vor dem reifen Osteoblasten gibt es den Preosteoblasten, der nur noch eine limitierte Proliferationsmöglichkeit aufweist. Außerdem exprimiert er zusätzlich zu Runx2 den Transkriptionsfaktor Osterix. Die ALP ist vermehrt vorhanden und die extrazelluläre Knochenmatrix wird zunehmend produziert. Auf den Preosteoblasten folgt nun der Osteoblast, der nicht mehr teilungsfähig ist, und Osteocalcin sowie Osteonektin produziert (Aubin 2008, 86). Osteoblasten haben eine kubische Form und ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt drei Monate (Manolagas 2000).

50 - 70% der vorhandenen Osteoblasten unterliegen der Apoptose (Jilka et al. 1998). Die übrigen Zellen entwickeln sich nun entweder zu Osteozyten, oder zu sogenannten *Lining Cells*. *Lining Cells* finden sich als dünne Schicht auf der nicht mineralisierten Matrix eines Knochens, welcher nicht im Umbau ist. Sie sind längliche, flache Zellen und helfen Osteoklasten bei dem Knochenabbau (Parfitt et al. 1996).

1.6 Alkalische Phosphatase

Die ALP wird im oben genannten Differenzierungsprozess des Osteoblasten exprimiert (s. Abb. 5) und dient daher als Differenzierungsmarker. Sie ist ein membranständiges Enzym, welches mit einem Lipidanker, einem Phosphatidyl-Inositol-Glykan, außen an der Plasmamembran befestigt ist. Es gibt verschiedene Isoenzyme, die aus demselben Gen entstehen und sich nur durch posttranslatorische Modifikationen unterscheiden (Christenson 1997). ALP wird von Osteoblasten gebildet und ist am Knochenaufbau beteiligt. Die alkalische Phosphatase gehört zu der Gruppe der Ortho-Phosphorsäure-Monoester-Phosphorhydrolasen mit einem alkalischen pH Optimum (Hallbach 2006). Sie spaltet Phosphorsäure-Monoester hydrolytisch unter Freisetzung von Phosphat und dem entsprechenden Alkohol. ALP wird als Dimer durch eine Phospholipase oder durch die Bildung von Vesikeln in das Blut abgegeben (Ramaswamy et al. 2000).

1.7 Runx2

Runx2 oder auch *core binding factor subunit alpha 1* (Cbfa1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten spielt und dementsprechend auch während dieser nachgewiesen werden kann. Homozygote Runx2-defiziente Mäuse entwickeln keinen Knochen, da sie keine reifen Osteoblasten besitzen (Choi et al. 2001; Karsenty 2001). Die Expression von Runx2 initiiert die Entwicklung osteoblastärer Marker wie die ALP, Osteocalcin und Kollagen Typ 1 (Cohen Jr. 2009).

Östrogen und Parathormon können die Runx2-Expression hochregeln und somit die Anzahl differenzierter Osteoblasten beeinflussen (Komori 2006). Zudem sorgt Runx2 für eine Knorpelhypertrophie an der Wachstumsplatte in der Embryogenese und spielt eine wichtige Rolle bei der Knocheninvasion von Malignomzellen der Brust und Prostata (Cohen Jr. 2009).

1.8 Anwendungsgebiete von PRP

Auf Grund der Wirkung von PRP auf Osteoblasten findet die Applikation von PRP zur Knochenregeneration oder der Integration von Zahnimplantaten in der Oralchirurgie bereits Anwendung (Yun et al. 2013). In letzter Zeit wird ein besonderes Augenmerk auf die Wirkung von PRP bei der Behandlung von Kniearthrosen gelegt. Die Ergebnisse zeigen eine Schmerzreduktion und eine verbesserte Lebensqualität der behandelten Patienten (Raeissadat et al. 2013).

PRP wirkt jedoch nicht nur auf die Knochenregeneration, sondern auch auf die Regeneration der Haut und Hautanhängsel. In der plastischen Chirurgie spielt die Anwendung von Platelet-Gel bei diabetischem Fußsyndrom und chronischen Ulcera (Margolis et al. 2001; Salemi et al. 2008) sowie bei der Behandlung von Narben eine große Rolle. Die Verwendung von Platelet-Gel bei Operationen mit benignen Parotistumoren, führte zu einer signifikant reduzierten Keloidbildung, sowie zu einem signifikant besseren kosmetischen Ergebnis als die Operation ohne Platelet-Gel (Scala et al. 2014). Zudem wird durch die Anwendung von PRP die Rate von Komplikationen nach Operationen reduziert (Bhanot und Alex 2002). Auch PRP scheint bei einer Haartransplantation die Haardichte positiv zu beeinflussen (Miao et al. 2013).

Außerdem wird PRP bei der Behandlung von Bänderverletzungen eingesetzt. Hier scheint es jedoch kontroverse Studienergebnisse über den Erfolg dieser Behandlungen zu geben (Moraes et al. 2013).

2. Ziele der Arbeit

Die vielen verschiedenen Anwendungen von PRP haben alle ein großes Ziel: die Regeneration von verletztem Gewebe durch verbesserte Proliferation und Differenzierung zu beschleunigen. Da viele dieser Anwendungen und Studien positive Ergebnisse erzielt haben, stellt sich nun die Frage: können ältere MSZ, welche eine reduzierte Proliferation aufweisen, von der Anwendung von PRP ebenfalls profitieren?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu determinieren, ob der Einsatz von tPR in der Zellkultur einen positiven Effekt auf die durch das Alter beeinträchtigte Proliferation und Differenzierung von MSZ hat. Somit stellt sich die Frage, ob tPR als unterstützende Maßnahme bei Operationen älterer Menschen eine Rolle spielen kann.

In den bisher veröffentlichten Studien wurde die Auswirkung von tPR auf die alternde MSZ noch nicht im Altersvergleich untersucht. Um die Auswirkungen auf die Proliferation, Differenzierung und Morphologie zu erforschen, wurden folgende Fragen gestellt:

- Gibt es einen Unterschied zwischen den Altersgruppen in Bezug auf Proliferation, Differenzierung und Generationszeiten?
- Kann tPR die Proliferation und die Differenzierung von humanen MSZ positiv beeinflussen?
- Ist es durch tPR möglich, die nachgewiesenen verlängerten Generationszeiten MSZ älterer Patienten zu verkürzen?
- Hat tPR generell einen positiven Einfluss auf alternde MSZ?
- Zeigen sich morphologische Unterschiede zwischen Zellen, welche mit tPR behandelt wurden und den Kontrollzellen?

3. Can Thrombin-Activated Platelet Release Compensate the Age-Induced Decrease in Cell Proliferation of MSC?

Melanie Vogl,¹ Johannes Fischer,² Marcus Jäger,³ Christoph Zilkens,¹ Rüdiger Krauspe,¹ Monika Herten¹

¹Department of Orthopaedics, University Hospital, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, ²Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, University Hospital, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, ³Department of Orthopaedics, University Hospital, University, Duisburg-Essen, Germany

Received 22 February 2013; accepted 14 June 2013

Published online 9 July 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.22433

ABSTRACT: Mesenchymal progenitor cells (MSCs) are promising for cell-based regeneration therapies. In elderly patients a reduced proliferation of MSCs has been described. Platelet-rich plasma (PRP) contains important factors necessary for osteogenic regeneration. The aim of this study was to find out whether the age-induced decrease in cell proliferation can be compensated by the use of supernatant of centrifuged, activated PRP (tPR). MSCs of donors of three age groups (A: young, 14–16 years, B: middle age, 36–46 years, C: older, 74–83 years) were expanded with 20% FCS alone or supplemented with thrombin-activated platelet releasate (tPR) (1%, 2.5%, and 5%) or platelet-poor plasma (PPP 5%). Cell proliferation and differentiation was measured on days 0, 3, and 7. Proliferation increased significantly in groups A and B with tPR, and non-significantly in group C. The generation times of MSCs of elderly patients were significantly increased in group C compared to groups A and B. Addition of 1% or 2.5% tPR significantly reduced population doubling times of all age groups. Adding tPR stimulates the proliferation rate of MSCs independent of donor age. For juvenile and middle-aged patients this influence was significant. Cells differentiation into osteoblasts was not influenced by addition of tPR. 2013 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 31:1786–1795, 2013

Keywords: platelet-rich plasma (PRP); thrombin; platelet releasate (PR); mesenchymal progenitor cells (MSC); age-induced decrease

Adult stem cell therapies represent a promising treatment modality in regenerative medicine and tissue engineering. In particular, mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow are used for bone regeneration in orthopaedics and oral surgery and have shown tremendous promise in numerous preclinical and clinical trials. MSC have been isolated from a wide variety of tissue types, but the versatility and accessibility of MSCs derived from bone marrow stroma make them the standard for many therapeutic applications.¹ The bone marrow stroma contains several cell populations, including mesenchymal stem cells.^{2,3} Numerous studies of MSC have demonstrated their potential for differentiating into multiple mesenchymal cell lineages.⁴

Platelet-rich plasma (PRP) has gained importance in bone regeneration and healing,^{5–7} since the α -granules of the platelets are rich in growth factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and transforming growth factor *b* (TGF-*b*), which play a key role in tissue healing.^{8,9} In vivo studies have shown that growth factors are present during the healing of osseous defects and fractures.^{10–14}

The knowledge about the existing growth factors in platelet-rich plasma and their osteoinductive characteristics make the use of autologous PRP in a point of care device a possible successful method to provide a sustained release of growth factors and promote bone healing.¹⁵ The supernatant of thrombin-activated platelet-rich plasma, the platelet releasate (tPR) was found to be an excellent adjuvant in isolating and expanding human MSC.^{16,17} The regeneration potential decays upon aging. In elderly patients a reduced cell proliferation of MSC has been described.¹⁸ Previous investigations onto the effect of aging on human MSC have proved contradictory.^{19–24} Newest publications support the notion, that aging is associated with systemic feedback mechanism acting on stem and progenitor cells.²⁴

The purpose of the study was to investigate whether tPR is able to increase the proliferation of MSC especially MSCs of elderly donors.

MSCs from male donors of different ages were cultivated in the presence of 20% FCS alone with 40 IU/ml heparin or supplemented with either different tPR concentrations (1%, 2.5%, and 5%) or 5% PPP as control. The proliferation and differentiation of MSC into bone forming cells was investigated in vitro.

MATERIAL AND METHODS

Bone Marrow Harvest and Cell Culture

Human bone marrow was harvested from the iliac crest, generated, and expanded as described previously.²⁵ The use of human bone marrow was approved by the Ethics Committee of the Heinrich-Heine University of Düsseldorf, Germany and informed consent was given by the patients. Mono nucleated cells of eight healthy donors were concentrated by a density gradient with lymphocyte separation medium (LSM 1077, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH) with 1 g/L glucose, 20% fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH) supplemented with 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (PAA) and without osteogenic stimulation. Culture conditions were 8.5% CO₂ and 37°C. The culture medium was changed on every third day. After reaching confluency, the cells were expanded and cells of the second passage were used for the experiments.

Experimental Setup

For the experiment, the mesenchymal progenitor cells (MSC) from bone marrow of eight donors of three different age groups (group A: young 14–16 years; group B: 36–46 years; group C: older 74, 83 years) were cultivated in 24- and 96-well plates (Nunclon D Surface, Nunc, Langenselbold, Germany) in a cell density of 5×10^3 and 3×10^3 cells/cm², respectively in culture medium with the addition of increasing concentrations (1%, 2.5%, and 5%) of tPR (pooled from the same donors) or 5% PPP in 40 IU/ml heparin or in culture medium alone with heparin. The cells were cultivated for 3 and for 7 days.

Characterization of the Mesenchymal Progenitor Cells (MSC)

The mesenchymal stem cell character of the cells was controlled by flow cytometric analysis against defined anti- gens (CD 105, CD 90, CD 73, CD 44, CD 14, and CD 45, CD 34) according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy (ISCT).³ The cells of the second or third passage were removed from the culture flasks, washed, and incubated with the respective antibodies for 30 min at 8°C in Isotone II (Beckmann Coulter, Krefeld, Germany) containing 4% fetal calf serum. Cells were washed and resuspended in 0.5 ml and analyzed using a FACS (Cytomics FC 500; Beck- man Coulter, Krefeld, Germany).

Lineage Differentiation of the MSC

Adherent cells of the first passage were further cultivated for lineage differentiation in 24-well plates in a concentration of 2×10^3 cells/cm² for osteogenic and adipogenic differentiation. For differentiation into chondrocytes cells were seeded in 96-well plates in a concentration of 2×10^5 cells/cm² and centrifuged in order to support aggregation of the cells into a three dimensional pellet.²⁶

For osteogenic differentiation the medium (DMEM 1 g/L glucose with 20% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 2 mM glutamine) was supplemented with 100 nM dexamethasone, 20 mM *b*-glycerol phosphate, 50 mM ascorbate-2-phosphate.

The adipogenic differentiation medium consisted of the osteogenic medium but with only 10% fetal calf serum and was extended with 3.5 nM dexamethasone, 9 mM indomethacin, 1.6 mM insulin, and 600 mM methylisobutylxanthine.

The chondrogenic differentiation medium contained DMEM 4.5 g/L glucose, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 1% insulin-transferrin-selen (ITS)-premix, 130 mM ascorbate-2-phosphate, 100 nM dexamethasone, 10 mM sodium pyruvate, 10 ng/ml TGF *b*1. Medium was changed every second day. Culture conditions were 8.5% CO₂ and 37°C. After 21 days the cells were washed, fixed with phosphate-buffered 4% paraformaldehyde solution pH 7, rinsed with pure water and subsequently stained. The cell pellets were embedded in Tissue-Tek¹ (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande), snap-frozen in liquid nitrogen. 10 mm thick cryosections on glass slides were prepared with a cryostat and used for staining.

Histological Staining

Osteoblast induction was indicated by the increase in alkaline phosphatase activity and calcium deposition. For the detection of ALP activity, the CFU-ALP staining procedure was repeated. The mineralization deposits were stained with 0.1% alizarin red.

Chondroblastic differentiation was demonstrated by Safranin O staining of the glycosaminoglycans of chondroblasts.

Adipogenesis was shown by the accumulation of neutral lipid vacuoles which were stained with oil red O and counterstained with hemalaun before embedding in gelatine.

Immunocytochemical Staining

Additionally to the histological staining the lineage specific markers were detected immunocytochemically. As osteoblastic marker the monoclonal anti-osteocalcin antibody (1:200 dilution), was used. Chondrocytes were characterized via anti-aggrecan and anti-Coll II alpha 1 chain antibody, while the adipocyte marker peroxisome proliferation-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) was detected with anti-PPAR antibody.

After fixation, the endogenous peroxidase was blocked with 1% hydrogen peroxide for 30 min. The slides were washed and incubated with the primary antibodies or the respective negative controls (mouse IgG1, normal rabbit IgG), in antibody dilution solution (DakoCytomation, Hamburg, Germany) over night at 8°C. Afterwards the slides were washed and incubated with the secondary anti-mouse antibody biotin-labeled (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 45 min at RT. The antibody-antigen complex was visualized using streptavidin-peroxidase (DakoCytomation) and AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (DakoCytomation) as chromogen with hemalaun counter-staining.

Harvest of the Platelet-Rich Plasma (PRP) and Thrombin

PRP and autologous thrombin were produced from venous blood of two female donors (aged 50 and 48 years) according to the manufacturer's directions using the SmartPREP2 system (Harvest Technologies, Munich, Germany). PRP was generated by particular centrifugation (400g, 14 min) of 64 ml venous blood with anticoagulant in a special container resulting in 10 ml of platelet concentrate. At the same time blood was drawn for preparation of thrombin. 9 ml of venous blood was mixed with anticoagulant and processing fluid, incubated for 45 min at room temperature, centrifuged as above and the supernatant containing the thrombin was depressed through a serum filter.

Production of Thrombin Activated Platelet Releasate (tPR)

The thrombin was mixed with the PRP in a ratio of 1:4 resulting in a gel consistency within 20 s. After 15 min the mixture was centrifugated for 20 min at 600g. The supernatant was used as thrombin activated platelet releasate (tPR) for further experiments.

Characterization of the Platelet-Rich Plasma (PRP)

In order to determine the concentration factor, platelets were counted in the whole blood and in the platelet concentrate using a cell counter (CellDyn 3500, Abbott, Wiesbaden, Germany). The activation potential of the platelets by thrombin was controlled by flow cytometric analysis against defined surface markers CD $^{\circ}$ 42, CD $^{\circ}$ 62P, and CD $^{\circ}$ 63. In order to activate the thrombocytes in the whole blood samples and in the PRP, thrombin was added in a ratio of 1:6 and incubated for 30 min at 8°C. Inactivated and activated samples were incubated with the respective antibodies as described before and analysed (Coulter XL, Beckmann Coulter).

Cell Proliferation Measurement

Cell proliferation was quantitatively measured using the CellTiterGlow assay (Promega, Mannheim, Germany). The assay is based on the luciferase reaction which catalyses the mono-oxygenation of luciferin to oxyluciferin in the presence of Mg $^{2+}$, ATP, and molecular oxygen. The amount of luminescent oxyluciferin formed is proportional to the ATP concentration and to the number of cells. There is a linear relationship ($r^2 = 0.99$) between the luminescent signal and the number of cells for up to 5×10^4 cells per well. Based on the quantity of oxyluciferin, ATP concentration, and cell number were calculated using an ATP standard curve and cell standard curves for defined bone marrow cells.

Cell Differentiation Measurement

The osseous alkaline phosphatase (ALP) a membrane-bound tetrameric enzyme attached to phosphatidylinositol moieties located on the outer cell surface was used for the detection of cell differentiation. The osseous alkaline phosphatase (ALP) was assayed using the release of *p*-nitro phenol from *p*-nitrophenolphosphate.²⁷ For cell differentiation measurement the culture medium was removed and the cells in the wells were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS, PAA).

For *qualitative measurement* of cell differentiation, the alkaline phosphatase activity was measured with ALP substrate (Vector Laboratories) according to the manufacturer's protocol. The cells were incubated with the ALP substrate for 60 min at room temperature. ALP activity was indicated by an intensive blue staining of the cells. The wells were rinsed with pure water and the cells embedded in gelatin.

For *quantitative measurement* the cells were frozen at 80°C for cell lysis. After addition of 110 ml pure water, the wells were centrifuged at 650g for 5 min. For the ALP assay 2 x 50 ml cell supernatant was transferred into the wells of a 96-well microplate and 100 ml of the ALP-substrate (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was added. Immediately after the start and after 30, 40, 60, and 120 min the extinction was measured at 405 nm using a microplate reader (Cary 50 Bio, Varian, Darmstadt, Germany) to quantify *p*-nitrophenol produced which was calibrated with a standard curve of known activity of ALP from porcine intestinal mucosa (Sigma–Aldrich).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using commercially available software IBM SPSS version 19. Continuous variables were presented as mean SD. Differences were considered significant at $p < .05$. Before statistically testing, each continuous variable was analyzed exploratively for its normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test). The Mann–Whitney *U*-test was used for comparison of non-parametric variables between study groups.

RESULTS

Cell Characterization as MSC

The characterization of the cells from the bone marrow by flow cytometry displayed a positive staining for CD 105, CD 90, and CD 73 and CD 44 whereas CD 14, CD 34, and CD 45 positive cells were only detected in <2% (Fig. 1). The cells cultivated from bone marrow could be differentiated into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes as demonstrated earlier.²⁸

Platelet Count, Concentration Factor, Growth Factor Content, and State of Activation

The mean platelet count in the PRP ranged from 1.0×10^9 to 1.2×10^9 platelets/ml. The mean factor of platelet concentration compared to normal blood was 3.9 (SD 1.1).

The average PDGF content of tPR was 2205.4 ng/ ml, 69.1 ng/ml for IGF, 20.6 ng/ml for TGF- β , and 55.3 ng/ml for VEGF (Table 1).

The activation of the platelets by the addition of autologous thrombin could be flow-cytometrically demonstrated by a positive staining for CD 62P while P- selectin is functioning as a cell adhesion molecule on the surfaces of activated thrombocytes (Fig. 2).

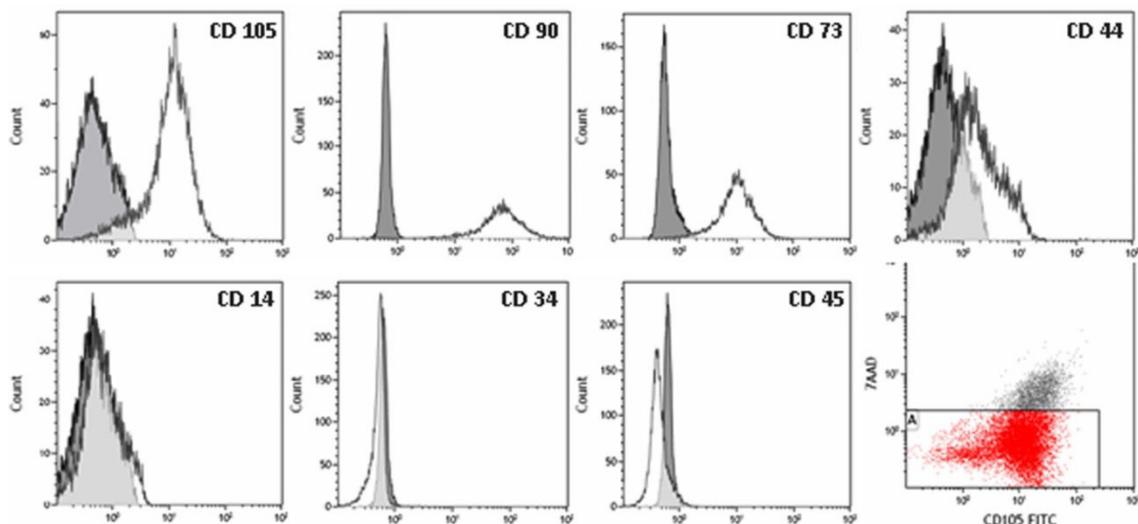


Figure 1. FACS histogram displaying a positive signal of the surface antigens CD105, CD90, CD73, and CD 44 while lacking expression of CD14, CD34, CD45 according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy position statement.³

Table 1. Concentrations of the Growth Factors (TGF- β , IGF, PDGF, and VEGF) in ng/ml in Whole Blood, tPR, and PPP

	Blood	tPR	PPP
TGF-β	7.6 \pm 0.7	20.6 \pm 8.8	16.0 \pm 4.5
IGF	38.2 \pm 0.6	69.2 \pm 19.2	45.3 \pm 17.9
PGDF	333.5 \pm 285.7	2205.4 \pm 1172.1	409.4 \pm 271.1
VEGF	41.9 \pm 24.2	409.4 \pm 28.8	55.3 \pm 27.4

Growth Rate of MSCs of Different Aged Donors

The MSCs show a trend towards extended doubling times for older patients. (Fig.3). There was a significant increase of doubling times for old patients (group C) compared to young patients (group A) ($p=0.043$) for FCS alone and also for all tPR concentrations added ($p=0.001$) (Table 2). However there was no significant difference between middle age (group B) and old patients (group C) for FCS alone and for 1% tPR but when 2.5% tPR or even 5% tPR was added, the difference in generation time between group B and group C became highly significant with $p < 0.001$. Comparing the generation time between group A and group B significant differences could only be detected when 1% tPR ($p = 0.027$) was added but not by adding higher concentrations (2.5% or 5%) of tPR.

Compared to treatment with FCS alone, increasing tPR concentrations significantly reduced the population doubling time ($p < 0.05$) for all age groups with the exemption of group C and the addition of 5% tPR: the population doubling time slightly increased from 1.49 ± 0.18 days at 2.5% tPR to 1.57 ± 0.19 at 5% tPR (Table 3).

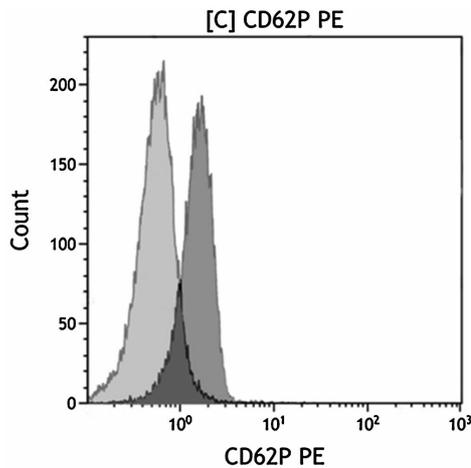


Figure 2. Histogram displaying CD 62P-PE activated thrombocytes.

Cell Morphology

Cell from different donor ages (group A, B, or C) within the same treatment did not show any differences in their morphology (Fig. 4). However, a distinct difference in the shape of MSC could be detected within the different treatments (FCS only, various tPR conc. or PPP). Cells treated with 2.5% or 5% tPR were more spindle-shaped on day 7 compared to cells treated with FCS alone or with 5% PPP (Fig. 5).

Influence of tPR on Proliferation Rate

Cell proliferation was significantly improved in a dose dependent manner by the addition of tPR both for group A and B. However there was only a trend for group C.

In group A (young patients) on day 3 a significant difference ($p \leq 0.01$) of ATP could be seen among the cells treated with tPR in any concentration (Fig. 6). On day 7 a significant

increase of ATP could be detected for all tPR concentrations in a dose dependent manner ($p \leq 0.02$). Five percent PPP, which was significantly better than FCS on day 3 ($p \leq 0.001$), turned out to be as effective as FCS in promoting proliferation on day 7. Group B showed a similar behavior in the presence of tPR compared to group A. There was no significant increase of ATP for 5% PPP at day 3 or 7 (Fig. 7). However there was a significant increase of ATP for 1% tPR, 2.5% tPR, and 5% tPR on day 7 ($p \leq 0.001$).

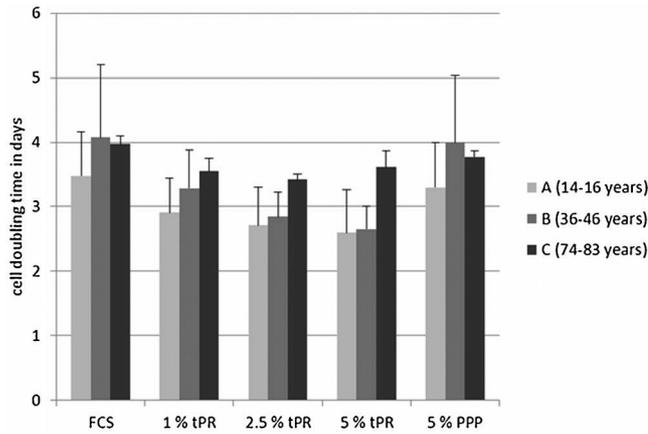


Figure 3. Doubling time for MSCs of different aged donors cultured in FCS for $n=3$ in each group. Data were normalized to FCS at day 3 = 100%. MSC showed an age dependent difference in doubling times.

Table 2. Comparison of the Generation Times in Days Between the Groups: p -Values of the Generation Times of the Different Groups

p-values	A vs B	A vs C	B vs C
FCS	0.068	*0.043	0.884
1% PR	*0.027	*0.001	0.325
2.5% PR	0.252	*<0.001	*<0.001
5% PR	0.143	*<0.001	*<0.001

Independent of the tPR concentration added (0%, 1%, 2.5%, or 5%), the generations times are significantly higher in older patients (group C) compared to young patients (group A). Significant differences ($p < 0.05$).

Table 3. Generation Times in Days for the Different Groups and Treatments

generation time in days	FCS	1% PR	2.5% PR	5% PR	5% PPP
mean±SD group A	1.50±0.28	1.25±0.20	1.17±0.22	1.12±0.24	1.41±0.26
median [range]	1.54 [1.058-1.95]	1.18 [1.02-1.59]	1.07 [0.95-1.54]	0.97 [0.90-1.54]	1.54 [1.04-1.77]
P-value FCS vs		0.004	<0.001	<0.001	0.252
mean±SD group B	1.77±0.47	1.41±0.22	1.23±0.17	1.15±0.15	1.73±0.42
median [range]	1.69 [1.24-2.95]	1.53 [1.09-1.71]	1.24 [0.99-1.57]	1.09 [0.98-1.49]	1.83 [1.15-2.48]
P-value FCS vs		0.01	<0.001	<0.001	0.767
mean±SD group C	1.75±0.30	1.54±0.18	1.49±0.18	1.57±0.19	1.63±0.22
median [range]	1.66 [1.45-2.59]	1.53 [1.33-2.01]	1.44 [1.25-1.95]	1.55 [1.33-1.93]	1.56 [1.25-2.56]
P-value FCS vs		0.028	0.004	0.089	0.347

The generation times of the groups A–C with FCS alone were compared to various tPR concentrations and the p -values calculated. Compared to treatment with FCS alone, tPR concentrations of 1% and 2.5% significantly reduced the population doubling time for all age groups.

Even though there was an increase in the amount of ATP with rising concentration of tPR, this progression was less than expected. Doubling the tPR concentration did not nearly result in a twofold increase of ATP. Group C showed a different pattern (Fig. 8). On day 3 no significant increase of ATP was visible for the least concentration of tPR as well as for 5% PPP. On day 7 only 2.5% tPR was significantly better in promoting proliferation than FCS ($p=0.024$). Even 5% tPR could not enlarge proliferation more than FCS only. However there was a trend towards better growth with tPR.

Osteogenic Differentiation Cannot be Influenced by tPR

Although osteogenic differentiation measured by ALP content per cell varied between donors, quantification of ALP showed a different reaction of the three groups upon the treatment with tPR. In group A at day 3, 1% and 2.5% tPR showed a significantly ($p < 0.044$) lower amount of ALP per cell than cells treated with FCS only (Fig. 9). However this decrease diminished with cultivation time and on day 7 there was no significant difference in differentiation anymore.

Cells of adult donors reacted similarly to younger cells (Fig. 10). On day 3 the ALP content per cell was significantly ($p < 0.017$) smaller for cells treated with tPR than for cells treated with PPP or FCS only. Alike the younger cells this difference in ALP content disappeared on day 7. However tPR could not increase differentiation significantly compared to FCS.

Group C cells did not show a significant difference between tPR treated and PPP or FCS treated cells at all on day 3 (Fig. 11). Unlike at day 3, on day 7 cell differentiation cultivated in 2.5% and 5% PR increased significantly ($p < 0.03$) compared to control while there was no difference between 5% PPP and 1% tPR.

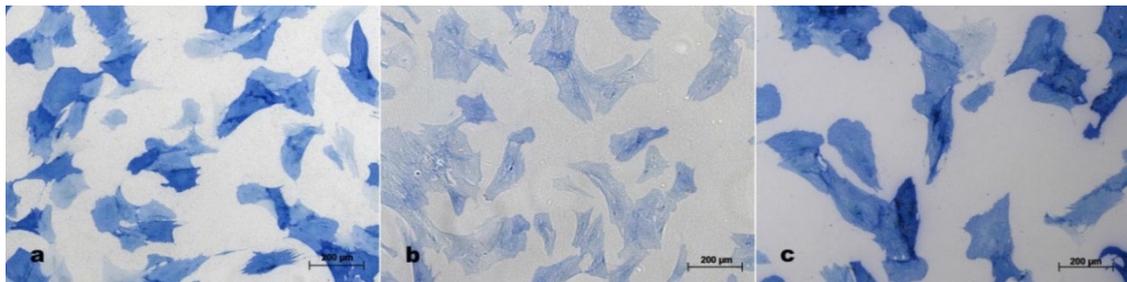


Figure 4. Cell morphology of cells cultivated in FCS at day 3. Typical growth pattern of cells from (a) group A, (b) group B, (c) group C. There are no detectable differences in cell morphology between the groups within the same treatment (FCS alone or with tPR, PPP).

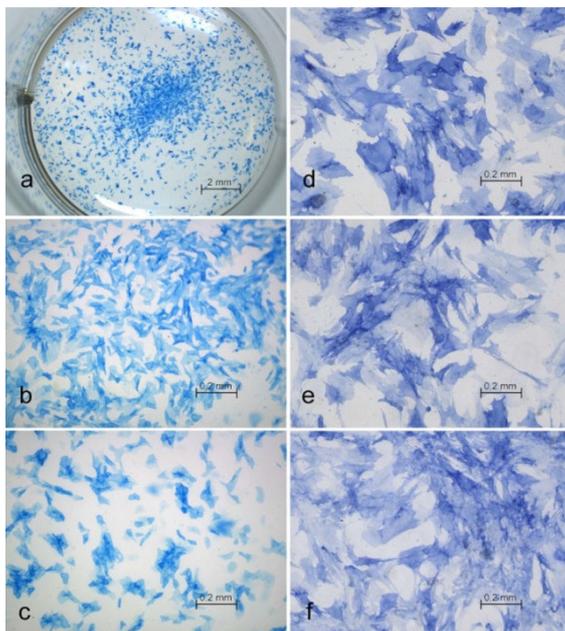


Figure 5. Typical cell morphology for MSC at day 7: (a) overview control plate with colony-forming units, (b) cells with 20% FCS, (c) 5% PPP, (d) cells with 1% tPR, (e) 2.5% tPR, and (f) 5% tPR.

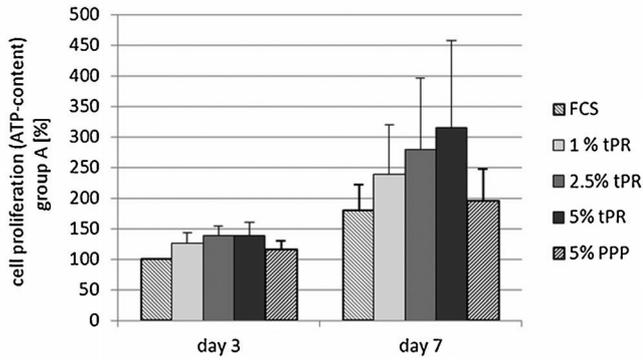


Figure 6. Cell proliferation in group A (young patients): ATP measured in cells cultured with and without tPR for $n = 6$ for each donor and concentration. Data were normalized to FCS at day 3 = 100%. Adding tPR increased the number of metabolically active cells.

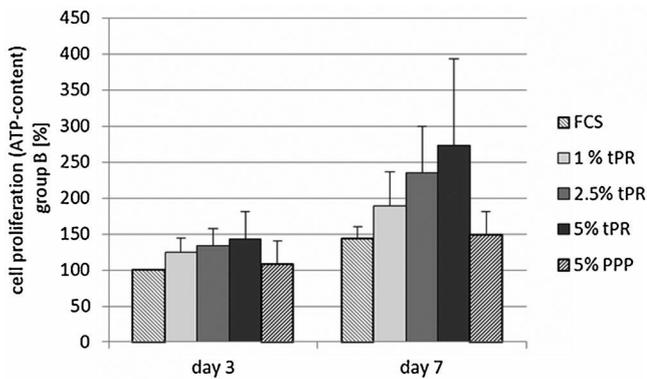


Figure 7. Cell proliferation in group B (adult patients): ATP measured in cells cultured with and without tPR for $n = 6$ for each donor and concentration. Data were normalized to FCS at day 3 = 100%. There was a significant difference between cells treated with tPR and the cells cultures in FCS only. The difference increases with cultivation time. The PPP group showed no significant difference to the cells treated with FCS.

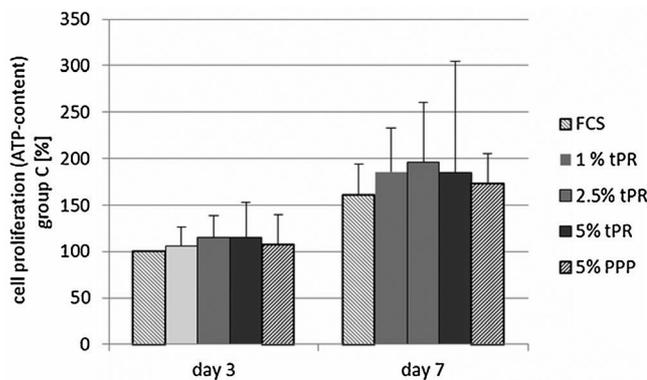


Figure 8. Cell proliferation in group C (old patients): ATP measured in cells cultured with and without tPR for $n = 6$ for each donor and concentration. Data were normalized to FCS at day 3 = 100%. The addition of the least tPR concentration and 5% PPP did not significantly increase the amount of ATP on day 3. On day 7 2.5% tPR was able to significantly increase the level of ATP, however even the highest amount of tPR did not significantly increase the amount of ATP.

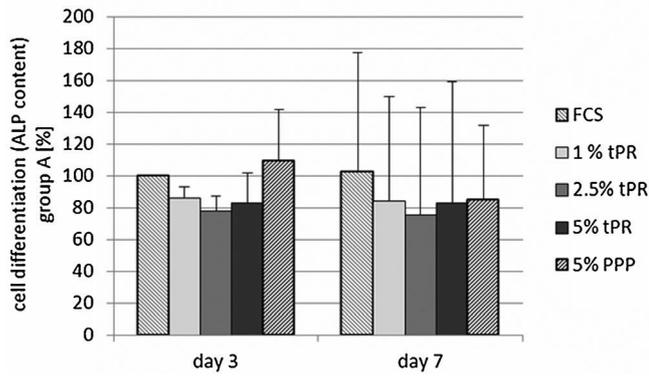


Figure 9. Cell differentiation in group A (young patients): ALP content per cell in % compared to FCS for cells expanded in different tPR concentrations, PPP or solely in FCS. There was no significant difference in ALP content per cell on day 7 between cells exposed to tPR compared to FCS or PPP.

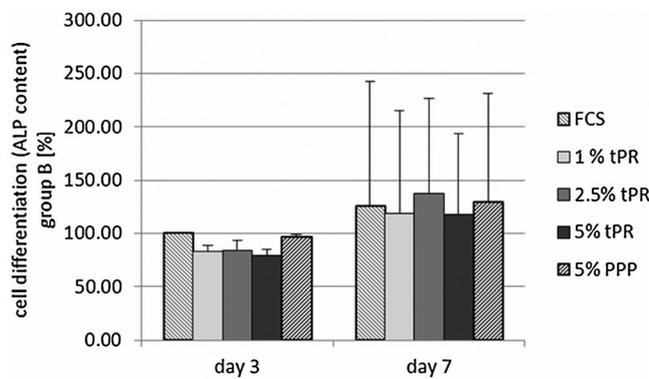


Figure 10. Cell differentiation in group B (adult patients): ALP content per cell in % compared to FCS for cells expanded in different tPR concentrations, PPP or solely in FCS. There was no significant difference in differentiation between cells treated with PRP and cells cultured in FCS only.

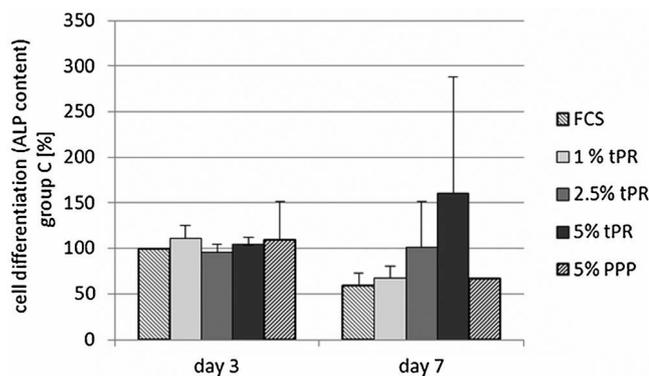


Figure 11. Cell differentiation in group C (old patients): ALP content per cell in % compared to FCS for cells expanded in different tPR concentrations, PPP, or solely in FCS. There was no difference between these groups on day 3. On day 7 with 2.5% and 5% tPR the differentiation was significantly increased compared to FCS.

DISCUSSION

In the present study the effect of different tPR concentrations on MSCs of different aged donors were compared in young (14–16 years), old MSC (74–83 years) and in a third mid-aged group (36–46 years) in order to see the gradual influence of aging. We could show that tPR from

pooled PRP influences significantly the proliferation of the MSC of young and mid-aged patients in a concentration dependent manner.

The best proliferation rates were reached by adding 5% tPR. In MSC from old patients there was a trend in proliferation increase after the addition of tPR. Our findings are in line with two studies using similar settings as for the amount of heparin and cell density but using platelet lysate (PL) instead of activated platelet releasate (tPR). Chevalier et al.²⁹ could show a significant increase in MSC proliferation (for α -MEM medium a 2.8- and for LP02 medium was a 3.8-fold) on day 7 using 5% PL with 2 IU/ml heparin compared to 10% FCS without heparin on human MSC (36–56 years, male and female) in a cell density of 1×10^3 cells/cm². Similar increase in proliferation was described by Doucet et al.³⁰ for human MSC of 10 different patients (age not known) cultured in α -MEM medium in a density of 1×10^3 and 6×10^3 cells/cm² on 5% PL with heparin (2 IU/ml) compared to with 10% FCS without heparin. But even when non-activated PRP was used, a fivefold increase of MSC proliferation could be reached after 7 days. Mishra et al.³¹ compared DMEM medium supplemented with 10% FCS to medium with 10% FCS and 10% PRP using a high cell seeding density of 15.6×10^3 cells/cm².

Ben Azouna et al.³² used pooled platelet lysate (PL, 10 different donors) for MSC (age group 16–42 years) in α -MEM media without heparin with either 10% FCS and 5% PL, or with only 5% PL, or with 10% PL + 10% FCS + 1 ng/ml Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) in a cell seeding density of 5×10^3 cells/cm². They could show that PL increased the growth rate.

Despite the differences in the culture conditions used in the above mentioned studies the usage of PL or PRP in concentrations of 5% and higher evoked an increase in proliferation of human MSC. In contrast to the above mentioned studies with various donor groups of mixed ages and genders, we used defined age and gender groups.

In the present study we could detect that aged MSCs have significant longer doubling times. The number of days for one population doubling for primary confluency was 4.0 days for MSC aged 74–83 years, 4.1 days for MSC aged 36–46 years, and 3.5 days for the 14–16 years, respectively. Additionally we could detect that the population doubling time was reduced with increasing tPR concentrations. Our results are in line with the findings of other groups Mendes et al.³⁴ and Baxter et al.³³ who also described a significant increase of doubling times using MSC of donors aged at least 50 and 59 years, respectively. Mendes et al. compared the doubling times of MSCs of donors above 50 years of age with donors under 50 years. Baxter et al. compared MSCs of donors aged at least 59 years to donors aged 0–18 years. Additionally to the increased doubling time the number of colony forming units (CFUs) also seemed to decrease with donors age.³³ Gottipamula et al.³⁵ also described that PL reduces the population doubling time of human MSC.

Aging seems to be associated with systemic feedback mechanisms acting upon human cells. Lohmann et al.²⁴ could demonstrate that the addition of platelets of young patients compared to platelets of old patients could induce a higher proliferation rate in human MSC. However Conboy et al.³⁶ exposed aged muscle progenitor cells of mice to a young systemic environment in vivo and in vitro. He could show that the cells displayed enhanced regeneration in the young systemic environment. And Carlson could show that muscles of young donors transplanted in old rats did not heal better than muscles of old donors.³⁷ However if muscles of old donors were transplanted in young rats they showed a better regeneration.

These findings lead to the conclusion, that aging is a systemic mechanism which is not fully understood by now. Ageing seems to be related to various factors including the surroundings and the cells themselves.

Concerning the differentiation capacity of MSC we could discover that only at day 3 cell differentiation towards the osteogenic lineage was significantly decreased with tPR compared to FCS and PPP. Here no concentration effect of tPR on the decreased differentiation could be seen. At day 7 there was no influence of tPR on the cell differentiation detectable.

Arpornmaeklong et al.,³⁸ who used rat MSC in media with 10% FCS and different PRP concentrations, could detect a negative correlation between PRP concentration added and ALP activity at days 12–21. Additionally there was no significant difference in the calcium content between the groups with the highest PRP supplementation and the control.

In contrast to these results Chevallier et al.²⁹ found an increased differentiation when using PL instead of FCS as supplement and not PL in addition to FCS. The gene expression of unstimulated MSC of ALP, BSP, Op, BMP-2 was 8, 8, 41, and 80 times higher, respectively. There was no significant difference for the expression of Runx2 and Oc. At day 21 there was no mineralization detectable in media without osteoblastic stimulants. With osteoblastic agents there was mineralization in both media conditions. However the difference to Arpornmaeklong is, that PL was used instead of FCS and not both together. Both studies showed that there

was no difference in mineralization. Chevallier et al.²⁹ however, could prove an increase in gene expression in media with PL.

An increased differentiation potential could also be detected from Gottipamula et al.³⁵ who used 10% PL in DMEM low glucose media compared to media with 10% FCS.

Similar to Chevallier, Doucet et al.³⁰ used 5% PL instead of FCS. After stimulation to develop the osteogenic lineage there was no significant difference in ALP activity, osteocalcin production, and mineralization.

Kawasumi et al.³⁹ did not find any differences between different platelet concentrations in platelet gel and PPP in ALP activity and gene expression.

As mentioned earlier Mishra et al.³¹ did not activate the PRP and used media with 10% PRP and 10% FCS. They could detect an increase of chondrogenic Sox9 and Aggrecan (10-fold) and the osteogenic marker Runx2 (twofold) after 7 days.

In contrast to the results of the groups mentioned above, Ben Azouna et al.³² described a decline in osteogenic gene expression. There was a decrease in ALP and Runx2 gene expression at day 0 for media with human platelet lysate only however, there was no difference in differentiation after 14 days.

Overall there appears to be no difference in ALP activity and mineralization in cells cultured with or without platelet releasate or platelet lysate. However there seems to be a point of contradiction whether the gene expression of osteoblastic markers is increased or decreased. Also heparin is supposed to have a negative influence on differentiation and ALP activity⁴⁰ therefore the control group should also have been supplemented with heparin in order to ascribe the change in differentiation to the influence of the supplemented PL/PR or PRP. Unfortunately the addition of heparin to the control group was not described for most of the studies mentioned above.

Ben Azouna³² did not use heparin and the donor group was younger than Chevalliers. The reduction of the early gene expression matches our results since we detected a decreased differentiation on day 3 when tPR was added. This difference disappeared on day 7.

Whether the differentiation capacity of aged MSCs is diminished seems to be a point of discussion.

A decline in ALP activity as well as Osx gene expression was described by Chen et al.⁴¹ in MSCs of mid-age and aged rats. The aged MSC had a deteriorated OCN protein secretion. D'Ippolito et al.⁴² also found, that while using the same plating density for different age groups of human MSCs the older group (41–70 years) had significant less colony forming units positive for ALP. In line to this Volk et al.⁴³ discovered that the age of canines MSC also influence the differentiation potential as well as their side of harvest. Oppositional results were described by Justesen et al.,²² who found no differences in the number of ALP positive and negative (adipose) colony forming units for human MSCs of old (66–78 years) and young (18–42 years) donors. The latter results correlate with the findings of Mueller et al.⁴⁴ Leskela et al.,²⁰ who draw the same conclusion while comparing the effects of age and gender on human MSC differentiation.

In line with the above described results in the present study no effect of ageing could be detected on the differentiation capacity of human MSCs. However the differing results could be justified by different definitions of the age groups as well as the possibility of gender differences in reaction of ageing.

We are aware of the fact that these number of patients used in this study is very low and that the tPR was produced from middle-aged donors. Future studies should address these limitations and should be carried out with much higher patients numbers and also consider different age groups of tPR donors.

CONCLUSION

The addition of tPR even in low concentrations stimulates the proliferation rate of MSC in all age groups. For juvenile and middle age patients this influence is significant. The cell differentiation into the osteoblastic line is not influenced by the addition of tPR.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank S. Lensing-Höhn (Orthopaedic Research Lab, Düsseldorf, Germany) for her excellent technical support and Dr. N. Osada (Institute of Medical Informatics UKM Münster) for her statistical support.

REFERENCES

1. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180–192.
2. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230–247.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
4. Rastegar F, Shenaq D, Huang J, et al. 2010. Shi Q and others. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2:67–80.
5. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, et al. 2002. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol Res* 37:300–306.
6. Garg AK. 2000. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update* 11:17–21.
7. Hakimi M, Jungbluth P, Sager M, et al. 2010. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury* 41: 717–723.
8. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, et al. 2009. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br* 91:987–996.
9. Weibrich G, Buch RS, Kleis WK, et al. 2002. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors* 20:93–97.
10. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, et al. 1995. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* 16:455–460.
11. Bostrom MP. 1998. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355: S116–S123.
12. Bourque WT, Gross M, Hall BK. 1993. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol* 37: 573–579.
13. Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. 1990. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 21:199–209.
14. Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M, et al. 2005. TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36:779–785.
15. Kasten P, Vogel J, Geiger F, et al. 2008. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 29:3983–3992.
16. Bieback K, Hecker A, Kocaoemer A, et al. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27:2331–2341.
17. Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, et al. 2007. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells* 25:1270–1278.
18. Phinney DG, Kopen G, Righter W, et al. 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 75:424–436.
19. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, et al. 2008. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129:163–173.
20. Leskela HV, Risteli J, Niskanen S, et al. 2003. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1008–1013.
21. Roura S, Farre J, Soler-Botija C, et al. 2006. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105⁺ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail* 8:555–563.
22. Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, et al. 2002. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 71:36–44.
23. Stolzing A, Bauer E, Scutt A. 2012. Suspension cultures of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level. *Stem Cells Dev* 21:2718–2723.
24. Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, et al. 2012. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* 7:e37839.
25. Jäger M, Feser T, Denck H, et al. 2005. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. *Ann Biomed Eng* 33:1319–1332.
26. Solchaga LA, Penick KJ, Welter JF. 2011. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods Mol Biol* 698:253–278.
27. Seibel MJ. 2000. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* 11:S18–S29.
28. Jäger M, Herten M, Fochtmann U, et al. 2011. Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J Orthop Res* 29:173–180.
29. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, et al. 2010. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials* 31:270–278.
30. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al. 2005. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol* 205:228–236.
31. Mishra A, Tummala P, King A, et al. 2009. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods* 15:431–435.
32. Ben Azoua N, Jenhani F, Regaya Z, et al. 2012. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Res Ther* 3:6.

33. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, et al. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22:675–682.
34. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, et al. 2002. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 8:911–920.
35. Gottipamula S, Sharma A, Krishnamurthy S, et al. 2012. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biotechnol Lett* 34:1367–1374.
36. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, et al. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433:760–764.
37. Carlson BM, Faulkner JA. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am J Physiol Cell Physiol* 1989;256:C1262–C1266.
38. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, et al. 2004. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:60–70.
39. Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, et al. 2008. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br* 90:966–972.
- Bhandari M, Hirsh J, Weitz JI, et al. 1998. The effects of standard and low molecular weight heparin on bone nodule formation in vitro. *Thromb Haemost* 80: 413–417.
40. Bhandari M, Hirsh J, Weitz JI, et al. 1998. The effects of standard and low molecular weight heparin on bone nodule formation in vitro. *Thromb Haemost* 80: 413-417
41. Chen TL. 2004. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone* 35:83–95.
42. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, et al. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14:1115– 1122.
43. Volk SW, Wang Y, Hankenson KD. 2012. Effects of donor characteristics and ex vivo expansion on canine mesenchymal stem cell properties: implications for MSC-based therapies. *Cell Transplant* 21:2189–2200.
44. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, et al. 2006. Gawaz MP and others. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 8:437–444.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt von unterschiedlichen Konzentrationen von tPR auf MSZ von jungen Spendern im Alter von 14-16 Jahren, mittelalten Spendern im Alter von 36-46 Jahren und alten Spendern im Alter von 74-83 Jahren verglichen. Diese Altersgruppen wurden gewählt um den Einfluss des Alterns auf das Zellwachstum und die Differenzierung näher erforschen zu können.

4.1 Proliferation von MSZ

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass tPR einen signifikanten Anstieg der Proliferation in der jungen und mittelalten Altersgruppe bewirkt. In der Gruppe der älteren Spender konnte lediglich ein Trend zu einer verbesserten Proliferation nachgewiesen werden.

Studien mit ähnlichem Design berichten über vergleichbare Ergebnisse, obwohl zumeist Platelet Lysat anstatt von tPR und deutlich geringere Heparinkonzentrationen verwendet wurden. Chevalier zeigte 2010 eine gesteigerte Proliferation an Tag 7 mit 10% PL mit 2IU/ml Heparin im Vergleich zu 10% FKS ohne Heparin bei Patienten beider Geschlechter im Alter von 36-56 Jahren. Die Proliferationszunahme unterschied sich jedoch zwischen α -MEM Medium (2,8-fach) und LP02 Medium (3,8-fach). Auch Doucet fand 2005 eine Proliferationszunahme bei der Verwendung von 5% PL mit 2 IU/ml Heparin. Hier wird das Alter der Spender jedoch nicht genannt.

Auch bei der Verwendung von nicht aktiviertem PRP konnte Mishra 2009 einen 5-fachen Anstieg der MSZ Proliferation nachweisen.

Trotz unterschiedlicher Zellkonzentrationen und Formen des verwendeten Thrombozytenkonzentrates wurde in allen Studien eine Zunahme der Zellproliferation deutlich, selbst wenn es als Ersatz für fetales Kalbserum und nicht nur als Zusatz benutzt wurde. Dabei scheinen Thrombozytenkonzentrationen von 5% optimal zu sein.

4.2 Alternde MSZ

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Thrombozytenkonzentrat zu einem signifikanten Anstieg der Generationszeiten bei alten MSZ im Vergleich zu jungen MSZ führt. Knochenmarkszellen junger Patienten haben eine Generationszeit von \approx 3,7 Tagen, mittelalte Patienten von \approx 4,1 und alte Patienten von \approx 4,0 Tagen. Diese Generationszeiten konnten jedoch mit steigenden tPR Konzentrationen reduziert werden.

In der Literatur verglich Mendes 2002 MSZ von Spendern, die älter als 50 Jahre alt waren mit MSZ von Spendern, welche jünger als 50 Jahre waren. Baxter wählte MSZ von 0-18 jährigen Spendern, im Vergleich zu Spendern welche über 59 Jahre alt waren. Beide Forschungsgruppen fanden im Alter verlängerte Generationszeiten. Zusätzlich zu verlängerten Generationszeiten scheint die Anzahl von CFU im Alter reduziert zu sein (Baxter et al. 2004).

Altern scheint ein multidimensionaler Prozess zu sein, welcher das ganze System „Körper“ und nicht nur seine Stammzellen beeinflusst und verändert.

Lohmann konnte 2012 zeigen, dass der Zusatz junger Thrombozyten im Vergleich zu alten zu einer erhöhten Proliferation von MSZ führen. Conboy setzte 2005 alte Vorläuferzellen von Rattenmuskelzellen einem jungen System *in vivo* und *in vitro* aus. Diese alten Vorläuferzellen zeigten im jungen System eine verbesserte Regeneration. Zuvor hatte Carlson 1989 demonstriert, dass Muskelzellen von jungen Ratten, welche in ältere Ratten transplantiert wurden, nicht besser heilten. Wurden hingegen alte Muskelzellen in junge Tiere transplantiert zeigten sie dort eine gesteigerte Regeneration.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen den Altersgruppen kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Zelldifferenzierung gefunden werden. Ob alternde MSZs eine eingeschränkte Differenzierungsmöglichkeit haben ist noch nicht geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Chen fanden 2004 eine verminderte ALP Aktivität sowie eine *Osx*-Genexpression bei mittelalten und alten MSZ von Ratten. Zudem war bei den alten MSZ die OC-Proteinsekretion gestört. Darüber hinaus wies D'Ippolito bei alten humanen MSZ (41-70 Jahre) deutlich weniger ALP produzierende CFUs nach, als in jungen Zellen. Im Gegensatz dazu konnte Justesen 2002 keinen Unterschied in der Anzahl der ALP-produzierenden CFUs bei älteren (66-78 Jahre) humanen MSZ im Vergleich zu jungen (18-42 Jahre) MSZ erkennen. Und Leskelä beschrieb 2003, dass weder das Alter noch das Geschlecht einen Einfluss auf die Differenzierung von humanen MSZ haben.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse machen deutlich, dass der Prozess des Alterns im Ganzen noch nicht aufgeklärt, aber dennoch ein systemischer Vorgang ist, welcher noch tiefergehend untersucht werden sollte. Außerdem bedarf es gleicher Definitionen von Altersgruppen um die Ergebnisse vergleichen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Spender in jung, mittelalt und älter unterteilt. Viele der anderen Studien verwenden jedoch nur 2 Altersklassen, die zudem auch noch unterschiedlich definiert sind. Trotz der Studie von Leskelä, in der keine Geschlechterunterschiede in der Differenzierung nachgewiesen werden konnten, sollten die Altersklassen auch nach

Geschlechtern getrennt bewertet werden, da es viele geschlechterspezifische Unterschiede unter anderem auch im Hormonhaushalt gibt. Um hierbei keine Unterschiede zu haben wurden in der vorliegenden Arbeit nur männliche Spender verwendet. Baggio beschrieb 2012, dass der Fokus der Forschung in der Vergangenheit viel zu selten auf den Unterschieden der Geschlechter lag. Dies hat sich in den letzten Jahrzehnten geändert und findet immer mehr Beachtung.

4.3 Differenzierung von MSZ

In der vorliegenden Arbeit beeinflusste tPR die Differenzierung der MSZ an Tag 3; die Zelldifferenzierung in die osteoblastäre Richtung war bei tPR-Zusatz signifikant vermindert im Gegensatz zu nur FKS und zu FKS + PPP. An Tag 7 war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar, tPR hatte keinen Einfluss mehr auf die Differenzierung.

Arpornmaeklong verwendete 2002 MSZ von Ratten in Kulturmedium mit 10% FKS und unterschiedlichen PRP- Konzentrationen. Sie fanden eine negative Korrelation zwischen der verwendeten PRP-Konzentration und der ALP- Aktivität an den Tagen 12-21.

Chevalier konnte 2010 eine gesteigerte Proliferation nachweisen, wenn PL anstatt FKS verwendet wurde. Die Genexpression von nicht stimulierten MSZ im Hinblick auf die Differenzierungsmarker ALP, BSP, OPN- und BMP-2 war höher, wobei keine Zunahme der Expression von Runx2 und OC gefunden wurde. Diese Studie unterscheidet sich jedoch zu der vorliegenden Arbeit darin, dass dort PL alleine und nicht als Zusatz zum FKS verwendet wurde. Dies scheint ein bedeutender Unterschied zu sein. Auch Gottipamula konnte 2012 eine gesteigerte Differenzierung bei der Verwendung von Medium mit 10% PL im Vergleich zu einem Medium mit nur 10% FKS demonstrieren.

Aber auch hier gibt es Studien mit ähnlichem Aufbau, welche zu einem anderen Ergebnis kommen. Doucet zog 2005 MSZ in FKS-freiem Medium mit 5% PL an und verglich diese mit Medium mit FKS. Hier wurden jedoch nach osteogener Stimulation keine signifikanten Unterschiede in der ALP-Aktivität, der Osteocalcin-Produktion und der Mineralisierung gefunden.

Ben-Azouna beschreibt 2012 eine reduzierte osteoblastäre Genexpression für ALP und Runx2 an Tag 0, wobei dieser Unterschied an Tag 14 jedoch nicht mehr existent war.

Ob Thrombozytenkonzentrate als Platelet Lysat, wo nur das Lysat der nicht aktivierten Thrombozyten verwendet wird, als tPR, welches aus dem Überstand von Thrombin aktivierten Thrombozyten besteht oder PRP, welches ein aktives Thrombozytenkonzentrat ohne weitere Verarbeitung ist, als Zusatz die Differenzierung von MSZ positiv

beeinflussen, erscheint fragwürdig. Übereinstimmend sind die Ergebnisse in der Literatur jedoch dahingehend, dass die ALP-Aktivität, sowie die Mineralisierung von Knochenmarkzellen durch den Zusatz von Thrombozytenmaterial nicht gesteigert werden. Ein Einfluss des Thrombozytenkonzentrates auf die Genexpression lässt sich noch nicht ausreichend beantworten.

Ein Grund, für die unterschiedlichen Ergebnisse in den Studien könnte das oft verwendete Heparin sein. Heparin hat einen negativen Einfluss auf die Differenzierung und die ALP Aktivität von Osteoblasten (Kock und Handschin 2002). Kock verwendet 2002 vier verschiedene, fraktionierte Heparine in einer Konzentration von 50µg/ml. Nach 96 Stunden zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Zelldichte im Vergleich zu unbehandelten Osteoblasten. Bei diesem Hintergrund ist es wichtig, dass die Kontrollgruppe auch mit Heparin behandelt wurde, damit eine Zu- oder Abnahme der Differenzierung auch wirklich auf das tPR als einzigen variablen Parameter im Versuchsdesign zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde mit 40 IU/ml Heparin eine vergleichsweise hohe Dosis von Heparin verwendet und auch die Kontrollgruppe mit Heparin behandelt. Da aber auch Autoren mit einer niedrigeren Heparinkonzentration von 2 IEU/ml Heparin zu ähnlichen Ergebnissen im Hinblick auf den Einfluss von PRP auf die Differenzierung kommen, scheint die Heparinmenge das Ergebnis nicht gewichtig zu beeinflussen.

In der Gewichtung der einzelnen Studien zum Einfluss von Thrombozytenkonzentraten auf die Differenzierung sollte hervorgehoben werden, dass in manchen Studien neben dem Thrombozytenkonzentrat auch eine osteogene Stimulation (durch den Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und 3-Glycerolphosphat) durchgeführt wurde. Während in anderen Studien - und auch in der vorliegenden Arbeit - keine osteogene Stimulation der Knochenmarkzellen erfolgte. Daher könnten die verschiedenen Ergebnisse auf der zusätzlichen osteogenen Stimulation beruhen.

Limitation der vorliegenden Arbeit ist die geringe Anzahl der Patienten in den einzelnen Studiengruppen. Hier sind weitere Untersuchungen mit einem deutlich größeren Patientenkollektiv angezeigt.

4.4 Autologes oder allogenes tPR

In der vorliegenden Arbeit wurde allogenes tPR von zwei mittelalten weiblichen Spendern verwendet, um damit die Einflussgrößen wie die interindividuelle Thrombozytenzahl und Aktivität der Thrombozyten zu neutralisieren. Die Thrombozytenzahl pro µl Blut sinkt nicht nur mit steigendem Alter, sondern ist auch von der ethnischen Herkunft des Spenders

abhängig (Segal und Moliterno 2006). Bei gleichem Konzentrierungsfaktor des Systems zur Herstellung von tPR, kommt es somit bei älteren Spendern zu einer geringeren Thrombozytenzahl im tPR und daraus resultierend auch zu geringeren Mengen der enthaltenen Wachstumsfaktoren. Unabhängig von der Menge der Wachstumsfaktoren und der Thrombozytenzahl führen Thrombozyten von jungen Spendern (< 35 Jahre) im Gegensatz zu Thrombozyten von älteren Spendern (>45 Jahre) zu einer signifikant verbesserten Proliferation und Differenzierung (Lohmann et al. 2012). Dies führen die Autoren auch darauf zurück, dass Altern ein systemischer Prozess mit vielen Variablen ist.

Ein wichtiger Punkt, welcher gegen die Verwendung von allogenen tPR spricht, ist das potentielle Infektionsrisiko durch mögliche, nicht bekannte Erkrankungen des Spenders wie HIV, Hepatitis und die Creutzfeld Jakob Krankheit. Mit der klinischen Verwendung von autologem tPR wird eben dieses Infektionsrisiko für den Patienten gesenkt. Da Altern - wie oben beschrieben - ein systemischer Vorgang ist, könnte aber der positive Trend für die Proliferation von MSZ der ältesten Versuchsgruppe durch eine Verwendung von autologem tPR reduziert werden. Dies sollte durch weitere Studien mit höheren Fallzahlen bestätigt werden.

4.5 Morphologische Unterschiede der Zellen

In dieser Arbeit wurde ein Unterschied in der Morphologie zwischen Zellen, die nur in FCS und denen, die zusätzlich in verschiedenen tPR-Konzentrationen kultiviert wurden, festgestellt. Dies ist von keinen anderen Autoren beobachtet oder bestätigt worden.

4.6 Anwendungsformen des Thrombozytenkonzentrats

Vor einem Einsatz der verschiedenen Formen des Thrombozytenkonzentrates sollte eine Risiko-Nutzen-Abschätzung erfolgen. Die Anwendungsformen werden im Folgenden kurz dargestellt.

Alle Herstellungsverfahren haben die venöse Blutabnahme zum Gewinn der Thrombozyten, sowie die Zentrifugation des gewonnenen Blutplasmas gemeinsam.

- PL muss mehrfach eingefroren und aufgetaut werden um es verwenden zu können (Fekete et al. 2012). Dadurch ist hierbei eine einzeitige Operation mit Blutentnahme und Herstellung des PL nicht möglich. Der Patient müsste noch vor der Operation zur Blutabnahme erscheinen. Außerdem können die vielen Schritte zur Produktion ein größeres Infektionsrisiko beinhalten.

- PRP kann direkt vor Ort präpariert werden, unabhängig davon, ob es mit autologem Thrombin aktiviert wird oder nicht. Je nach Hersteller werden dazu ca. 40 Minuten benötigt. Dabei kann auch gleichzeitig das autologe Thrombin produziert werden. Das fertige Thrombozytenkonzentrat wird zusammen mit dem autologen Thrombin auf die Oberfläche aufgetragen und dadurch aktiviert. Die schnelle und einfache Herstellung ist mit einem einzeitigen Vorgehen vereinbar und somit eine Entlastung für den Patienten.

Nachteilig bei der Verwendung von autologem Thrombozytenkonzentrat ist, dass es durch Blutzell- und Thrombozytenreste, aber auch durch Restanteile von Lymphozyten - und Erythrozyten zu einer vermehrten inflammatorischen Reaktion kommen kann.

- tPR entspricht der Herstellung von PRP. Nur wird dieses Konzentrat vorher durch Thrombin aktiviert, zentrifugiert und anschließend abfiltriert. Dies ist zwar ein zusätzlicher Arbeitsschritt, welcher aber dennoch vor Ort durchgeführt werden kann und nur kurze Zeit benötigt.

Bei der allogenen Verwendung hätte diese Anwendungsform den Vorteil, dass Zellreste herausfiltriert werden können und so das Risiko einer immunologischen Reaktion des Empfängers verringert werden kann.

- Bei *in-vitro* Versuchen führen die verschiedenen Anwendungsformen des Thrombozytenkonzentrates zu unterschiedlichen Versuchsaufbauten. PL, tPR und nicht aktiviertes PRP können je nach Bedarf zu den Zellen hinzugegeben werden. Die Konzentration ist also variabel und definierbar. Bei aktiviertem PRP, welches einen *Clot* bildet, ist es bedeutend schwieriger kontinuierlich eine reproduzierbare Menge neues PRP zu den Knochenmarkzellen zu geben. Daher beschränken sich einige Studien auf die einmalige Dosis - und geben PRP nur am Anfang der Zellkultur einen *Clot* hinzu. Da sich der *Clot* und die in ihm befindlichen Wachstumsfaktoren durch den Mediumwechsel unweigerlich reduzieren und nicht neu zugesetzt werden, führt dies zu einer kontinuierlich abnehmenden Konzentration der Faktoren.

Diese beschriebenen Unterschiede der Anwendung von Thrombozytenkonzentraten könnten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, da die Thrombozytenzahlen in den Konzentraten zwar meist einheitlich sind, die Applikationsmenge und -häufigkeit jedoch nicht.

Shanskii bestimmte 2013 die Menge der Wachstumsfaktoren im Platelet Lysat und fand 19 ng/ml PDGF. In dieser Arbeit fand sich im tPR 2205 ng/ml PDGF. Der Unterschied von TGF- β mit 16,3 ng/ml im PL und von 20,6 pg/ml im tPR ist hingegen nicht so deutlich.

IGF-1(0,1 ng/ml) und VEGF (0,14 ng/ml) zeigen eine deutliche Differenz zu den gemessenen Werten im tPR, IGF 69,2 ng/ml und VEGF 409 ng/ml. Dies zeigt, dass die unterschiedlichen Anwendungen von PRP unterschiedliche Mengen von Wachstumsfaktoren enthalten.

4.7 Aktivierung der Thrombozytenkonzentrate

Die in der Literatur in *in-vitro* Studien am Häufigsten verwendete Kombination zur Aktivierung der Thrombozyten ist die von bovinem Thrombin von bis zu 10000 IU und 10% Kalziumchlorid (Arpornmaeklong et al. 2004; Lei et al. 2009).

Bovines Thrombin enthält den bovinen Faktor V. Dieser Faktor hat in der Herzchirurgie schon zu Koagulopathien geführt, so dass es vermutlich zu einer Kreuzreaktion des Immunsystems mit dem humanen Faktor V kam (Cmolik et al. 1993). Bei der klinischen Anwendung von PRP würde dieses direkt in offene Wunden appliziert und müsste dort auch aktiviert werden. Dadurch könnte der bovine Faktor V in den Blutkreislauf geraten und die immunologische Reaktion hervorrufen.

Dies hängt sicher auch von der Herstellungsart ab, da es viele Systeme gibt, bei dem man wie bei der hier vorliegenden Studie bei der Produktion von PRP gleichzeitig autologes Thrombin herstellt und dieses dann verwenden kann. Andere Autoren verwenden kein festes Herstellungssystem und müssen somit auf einfach vorhandene Aktivatoren, wie Kalziumchlorid, zurückgreifen.

Somit sollte auf bovines Thrombin zur Aktivierung verzichtet werden.

Die alleinige Verwendung von Kalziumchlorid führt auch zur gewünschten Aktivierung des PRP, wobei die Herstellung mit einer Aktivierungsdauer von 20 Minuten jedoch länger ausfällt (Man, Plosker, und Winland-Brown 2001).

Am sichersten erscheint jedoch die gleichzeitige Herstellung von autologem PRP und autologem Thrombin, wie in der vorliegenden Studie, welches direkt und ohne immunologische Probleme appliziert werden kann. Mittlerweile wird dieses System von verschiedenen Herstellern angeboten, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Qualität des PRP im Hinblick auf den Konzentrationsfaktor und die Wachstumsfaktorkonzentration bestehen (Weibrich et al. 2012).

4.8 *In-vivo* Anwendung von Thrombozytenkonzentraten

In der *in-vitro* Anwendung kann nur der isolierte Effekt von Thrombozytenkonzentraten und seinen Wachstumsfaktoren beobachtet werden. Thrombozyten spielen jedoch nicht nur als Teil des Gerinnungssystems eine gewichtige Rolle.

In-vivo werden durch die Aktivierung der Thrombozyten Entzündungsmediatoren wie Interleukine-1 β , CD 40L und Chemokine freigesetzt. Außerdem besitzen sie Chemokinrezeptoren und können damit die Immunantwort regulieren. Durch anti-entzündliche Zytokine wie TGF- β können die Zellen vor einer überschießenden Immunantwort bewahrt werden (Galliera, Corsi, und Banfi 2012). Dieser Effekt wirkt sich positiv auf die Wundheilung aus und kann dazu führen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf die Proliferationssteigerung von MSZ noch übertroffen werden könnte.

Eine weitere positive Eigenschaft des tPR ist, dass es die Migration von MSZ und osteoblastären Vorläufern fördert (Gruber et al. 2004) . Außerdem beeinflussen die Wachstumsfaktoren und insbesondere VEGF die Bildung von Blutgefäßen, die für die Gewebeversorgung bei der Knochenbildung sehr wichtig sind. Zudem können sie die Endothelzellen dazu beeinflussen einen pro-osteoblastäre Phänotyp anzunehmen, welcher zu einer MSZ Migration in Richtung des Defektes führt (Arvidson et al. 2011).

Diese weiteren Funktionen der Thrombozytenkonzentrate können die Proliferation von MSZ und damit auch die Regeneration ossärer Defekte positiv beeinflussen. Dies sollte, insbesondere auch im Hinblick auf ältere Patienten, noch erforscht werden.

5. Schlussfolgerung

Die verlängerte Frakturheilung bei älteren Patienten stellt ein großes klinisches Problem dar. In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass MSZ von älteren Spendern im Vergleich zu jungen Spendern signifikant verlängerte Generationszeiten und somit ein verlangsamtes Wachstum aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Addition von tPR zum Zellkulturmedium mit FKS in jeder Altersgruppe zu einer Proliferationssteigerung in unterschiedlichem Ausmaß führt. Diese Proliferationszunahme ist bei jungen und mittelalten Spendern signifikant. Für ältere Spender ergab sich nur ein positiver Trend. Diese positive Wirkung von tPR auf MSZ könnte in Zukunft bei der Behandlung von Frakturen an Bedeutung gewinnen und die Morbidität der Patienten reduzieren.

In dieser Arbeit wurden Knochenmarkzellen männlicher Patienten verwendet und obwohl bisher keine Genderunterschiede nachgewiesen wurden, sollte als Ausblick auf die

zukünftige klinische Anwendung des tPR die Frage gestellt werden, ob diese Ergebnisse auch für das weibliche Geschlecht gelten. Da von geschlechterspezifischen hormonalen Unterschieden und auch Unterschieden im Zusammenhang mit dem Prozess des Alterns auszugehen ist, sollten sich weitere *in-vitro* und *in-vivo* Studien anschließen. Ein Vergleich gleicher Altersgruppen der verschiedenen Geschlechter könnte geschlechterspezifische Unterschiede aufdecken und als weiterer Ansatz für die zukünftige Forschung gelten. Die Ergebnisse aus diesen Studien wären vielleicht in der Lage die unterschiedlichen Forschungsergebnisse der Studien mit gemischtem Patientengut zu erklären.

In dieser Arbeit konnte eine Verschlechterung der Differenzierungsmöglichkeit älterer MSZ nicht belegt werden. Auch kam es durch die Zugabe von tPR in allen vorliegenden Konzentrationen nicht zu einer verbesserten Differenzierung. Dennoch ist die Studienlage zur Differenzierung von älteren MSZ nicht eindeutig.

Die positiven Ergebnisse dieser Arbeit sollten insbesondere im Hinblick auf die kleine Patientenzahl von $n=3$ pro Altersgruppe zu weiteren Studien mit größeren Patientenzahlen führen, da sich durch den in dieser Arbeit gefundenen proliferationssteigernden Effekt des tPR mögliche Konsequenzen für die Therapie ossärer Defekte ergeben.

Insgesamt gibt diese Arbeit erste Einblicke in die positiven Eigenschaften und Wirkungen von tPR. TPR könnte eine wichtige Hilfe bei der Lösung vieler Probleme in der regenerativen Medizin sein.

6. Literaturverzeichnis:

Andrew, J G, J A Hoyland, A J Freemont, und D R Marsh. 1995. "Platelet-derived Growth Factor Expression in Normally Healing Human Fractures." *Bone* 16 (4) (April): 455–460.

Anitua, Eduardo, Isabel Andia, Bruno Ardanza, Paquita Nurden, und Alan T Nurden. 2004. "Autologous Platelets as a Source of Proteins for Healing and Tissue Regeneration." *Thrombosis and Haemostasis* 91 (1) (January): 4–15. doi:10.1267/THRO04010004.

Arpornmaeklong, P, M Kochel, R Depprich, N R Kübler, und K K Würzler. 2004. "Influence of Platelet-rich Plasma (PRP) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells. An in Vitro Study." *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 33 (1) (January): 60–70. doi:10.1054/ijom.2003.0492.

Arvidson, K, B M Abdallah, L A Applegate, N Baldini, E Cenni, E Gomez-Barrena, D Granchi, et al. 2011. "Bone regeneration and stem cells." *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (4) (April): 718–746. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.

Aubin, Jane E. 2008. "Chapter 4 - Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation." In *Principles of Bone Biology (Third Edition)*, 85–107. San Diego: Academic Press.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123738844000264>.

Azouna, Nesrine Ben, Faouzi Jenhani, Zohra Regaya, Lamia Berraeis, Tarek Ben Othman, Elfi Ducrocq, und Jorge Domenech. 2012. "Phenotypical and Functional Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Comparison of Culture Using Different Media Supplemented with Human Platelet Lysate or Fetal Bovine Serum." *Stem Cell Research & Therapy* 3 (1) (February 14): 6. doi:10.1186/scrt97.

Baggio, Giovannella, Alberto Corsini, Annarosa Floreani, Sandro Giannini, und Vittorina Zagonel. 2013. "Gender Medicine: a Task for the Third Millennium." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51 (4) (April 1): 713–727.

Baxter, Melissa A, Robert F Wynn, Simon N Jowitt, J Ed Wraith, Leslie J Fairbairn, und Ilaria Bellantuono. 2004. "Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells Following in Vitro Expansion." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22 (5): 675–682. doi:10.1634/stemcells.22-5-675.

Bergsten, E, M Uutela, X Li, K Pietras, A Ostman, C H Heldin, K Alitalo, und U Eriksson. 2001. "PDGF-D Is a Specific, Protease-activated Ligand for the PDGF Beta-receptor." *Nature Cell Biology* 3 (5) (May): 512–516. doi:10.1038/35074588.

Bhanot, Sumeet, und James C Alex. 2002. "Current applications of platelet gels in facial plastic surgery." *Facial plastic surgery: FPS* 18 (1) (February): 27–33. doi:10.1055/s-2002-19824.

Binder EF, Brown M, Sinacore DR, Steger-May K, Yarasheski KE, und Schechtman KB. 2004. "Effects of Extended Outpatient Rehabilitation After Hip Fracture: A Randomized Controlled Trial." *JAMA* 292 (7) (August 18): 837–846. doi:10.1001/jama.292.7.837.

Boland, Genevieve M, Geraldine Perkins, David J Hall, und Rocky S Tuan. 2004. "Wnt 3a Promotes Proliferation and Suppresses Osteogenic Differentiation of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (6) (December 15): 1210–1230. doi:10.1002/jcb.20284.

Bonfanti, R., B. C. Furie, B. Furie, und D. D. Wagner. 1989. "PADGEM (GMP140) Is a Component of Weibel-Palade Bodies of Human Endothelial Cells." *Blood* 73 (5) (April 1): 1109–1112.

Bonthron, D T, C C Morton, S H Orkin, und T Collins. 1988. "Platelet-derived Growth Factor A Chain: Gene Structure, Chromosomal Location, and Basis for Alternative mRNA Splicing." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (5) (March): 1492–1496.

Borzini, Piero, und Laura Mazzucco. 2005. "Platelet Gels and Releasates." *Current Opinion in Hematology* 12 (6) (November): 473–479.

Brewer, Douglas B. 2006. "Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the Discovery of the Platelet." *British Journal of Haematology* 133 (3): 251–258. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x.

Buda, Roberto, Francesca Vannini, Marco Cavallo, Matteo Baldassarri, Deianira Luciani, Antonio Mazzotti, Camilla Pungetti, Alessandra Olivieri, und Sandro Giannini. 2013. "One-step Arthroscopic Technique for the Treatment of Osteochondral Lesions of the Knee with Bone-marrow-derived Cells: Three Years Results." *MUSCULOSKELETAL SURGERY* 97 (2) (August 1): 145–151. doi:10.1007/s12306-013-0242-7.

- Carlson, B. M., and J. A. Faulkner. 1989. "Muscle Transplantation Between Young and Old Rats: Age of Host Determines Recovery." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 256 (6) (June 1): C1262–C1266.
- Cauley, J. A., D. E. Thompson, K. C. Ensrud, J. C. Scott, and D. Black. 2000. "Risk of Mortality Following Clinical Fractures." *Osteoporosis International* 11 (7) (August 1): 556–561. doi:10.1007/s001980070075.
- Chen, Theresa L. 2004. "Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment." *Bone* 35 (1) (July): 83–95. doi:10.1016/j.bone.2004.03.019.
- Chevallier, Nathalie, Fani Anagnostou, Sebastien Zilber, Gwellaouen Bodivit, Sophie Maurin, Aurelie Barrault, Philippe Bierling, Philippe Hernigou, Pierre Layrolle, and Helene Rouard. 2010. "Osteoblastic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells with Platelet Lysate." *Biomaterials* 31 (2) (January): 270–278. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.043.
- Choi, Je-Yong, Jitesh Pratap, Amjad Javed, S. Kaleem Zaidi, Lianping Xing, Eva Balint, Sara Dalamangas, et al. 2001. "Subnuclear Targeting of Runx/Cbfa/AML Factors Is Essential for Tissue-specific Differentiation During Embryonic Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15) (July 17): 8650–8655. doi:10.1073/pnas.151236498.
- Christenson, Robert H. 1997. "Biochemical Markers of Bone Metabolism: An Overview." *Clinical Biochemistry* 30 (8) (December): 573–593. doi:10.1016/S0009-9120(97)00113-6.
- Cmolik, B L, J A Spero, G J Magovern, and R E Clark. 1993. "Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V deficiency." *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 105 (2) (February): 222–227; discussion 227–228.
- Cohen Jr., M. Michael. 2009. "Perspectives on RUNX Genes: An Update." *American Journal of Medical Genetics Part A* 149A (12): 2629–2646. doi:10.1002/ajmg.a.33021.
- Conboy, Irina M, Michael J Conboy, Amy J Wagers, Eric R Girma, Irving L Weissman, and Thomas A Rando. 2005. "Rejuvenation of Aged Progenitor Cells by Exposure to a Young Systemic Environment." *Nature* 433 (7027) (February 17): 760–764. doi:10.1038/nature03260.

Curotto, S., K. Lunsford, W. Smith, J. Thomason, and C. Bulla. 2012. "Evidence of Selective Packaging and Different α -Granule Subtypes in Canine Platelets." *Journal of Comparative Pathology* (0). doi:10.1016/j.jcpa.2012.02.007. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997512000461>.

D'Amore, P. A. 1994. "Mechanisms of Retinal and Choroidal Neovascularization." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35 (12) (November 1): 3974–3979.

D'Ippolito, Gianluca, Paul C. Schiller, Camillo Ricordi, Bernard A. Roos, and Guy A. Howard. 1999. "Age-Related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells from Human Vertebral Bone Marrow." *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (7): 1115–1122. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1115.

Delany, A M, J M Pash, and E Canalis. 1994. "Cellular and Clinical Perspectives on Skeletal Insulin-like Growth Factor I." *Journal of Cellular Biochemistry* 55 (3) (July): 328–333. doi:10.1002/jcb.240550309.

Derynck, R, J A Jarrett, E Y Chen, D H Eaton, J R Bell, R K Assoian, A B Roberts, M B Sporn, and D V Goeddel. 1985. "Human Transforming Growth Factor-beta Complementary DNA Sequence and Expression in Normal and Transformed Cells." *Nature* 316 (6030) (August 22): 701–705.

Derynck, Rik, and Rosemary J. Akhurst. 2007. "Differentiation Plasticity Regulated by TGF- β Family Proteins in Development and Disease." *Nature Cell Biology* 9 (9) (September): 1000–1004. doi:10.1038/ncb434.

Van den Dolder, Juliette, Rob Mooren, Annelies P G Vloon, Paul J W Stoelenga, and John A Jansen. 2006. "Platelet-rich Plasma: Quantification of Growth Factor Levels and the Effect on Growth and Differentiation of Rat Bone Marrow Cells." *Tissue Engineering* 12 (11) (November): 3067–3073. doi:10.1089/ten.2006.12.3067.

Doucet, Christelle, Isabelle Ernou, Yizhou Zhang, Jean-Roch Llense, Laurent Begot, Xavier Holy, and Jean-Jacques Lataillade. 2005. "Platelet Lysates Promote Mesenchymal Stem Cell Expansion: a Safety Substitute for Animal Serum in Cell-based Therapy Applications." *Journal of Cellular Physiology* 205 (2) (November): 228–236. doi:10.1002/jcp.20391.

Drengk, Anja, Antonia Zapf, Ewa Klara Stürmer, Klaus Michael Stürmer, und Karl-Heinz Frosch. 2009. "Influence of Platelet-rich Plasma on Chondrogenic Differentiation and Proliferation of Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells." *Cells, Tissues, Organs* 189 (5): 317–326. doi:10.1159/000151290.

Duke, Cindy M P und Hugh S Taylor. 2013. "Stem cells and the reproductive system: historical perspective and future directions." *Maturitas* 76 (3) (November): 284–289. doi:10.1016/j.maturitas.2013.08.012.

Fekete, Natalie, Mélanie Gadelorge, Daniel Fürst, Caroline Maurer, Julia Dausend, Sandrine Fleury-Cappelleso, Volker Mailänder, et al. 2012. "Platelet Lysate from Whole Blood-derived Pooled Platelet Concentrates and Apheresis-derived Platelet Concentrates for the Isolation and Expansion of Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Production Process, Content and Identification of Active Components." *Cytotherapy* (February 2). doi:10.3109/14653249.2012.655420. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22296115>.

Ferrara, Napoleone und Terri Davis-Smyth. 1997. "The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor." *Endocrine Reviews* 18 (1) (February 1): 4–25. doi:10.1210/er.18.1.4.

Fréchette, J-P, I Martineau und G Gagnon. 2005. "Platelet-rich Plasmas: Growth Factor Content and Roles in Wound Healing." *Journal of Dental Research* 84 (5) (May): 434–439.

Galliera, E, M M Corsi, und G Banfi. 2012. "Platelet rich plasma therapy: inflammatory molecules involved in tissue healing." *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 26 (2 Suppl 1) (June): 35S–42S.

Gawaz, Meinrad Paul. 1999. *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. Thieme.

George, James N. 2000. "Platelets." *The Lancet* 355 (9214) (April 29): 1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(00)02175-9.

Goel, Ashok, S S Sangwan, R C Siwach und Ahmad M Ali. 2005. "Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union." *Injury* 36 (1) (January): 203–206. doi:10.1016/j.injury.2004.01.009.

Gottipamula, Sanjay, Archana Sharma, Sagar Krishnamurthy, Anish Majumdar und Raviraja Seetharam. 2012. "Human Platelet Lysate Is an Alternative to Fetal Bovine Serum for Large-scale Expansion of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells." *Biotechnology Letters*: 1–8. doi:10.1007/s10529-012-0893-8.

Gruber, Reinhard, Florian Karreth, Barbara Kandler, Gabor Fuerst, Antal Rot, Michael B. Fischer und Georg Watzek. 2004. "Platelet-released Supernatants Increase Migration and Proliferation, and Decrease Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Progenitor Cells Under in Vitro Conditions." *Platelets* 15 (1) (January): 29–35. doi:10.1080/09537100310001643999.

Gruber, Reinhard, Hannjörg Koch, Bruce A Doll, Florian Tegtmeier, Thomas A Einhorn und Jeffrey O Hollinger. 2006. "Fracture Healing in the Elderly Patient." *Experimental Gerontology* 41 (11) (November): 1080–1093. doi:10.1016/j.exger.2006.09.008.

Hallbach, Jürgen. 2006. *Klinische Chemie für den Einstieg*. Georg Thieme Verlag.

Harada, Shun-ichi und Gideon A. Rodan. 2003. "Control of Osteoblast Function and Regulation of Bone Mass." *Nature* 423 (6937) (May 15): 349–355. doi:10.1038/nature01660.

Heldin, Carl-Henrik, Arne Östman und Lars Rönstrand. 1998. "Signal Transduction via Platelet-derived Growth Factor Receptors." *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1378 (1) (August 19): F79–F113. doi:10.1016/S0304-419X(98)00015-8.

Jilka, Robert L., Robert S. Weinstein, Teresita Bellido, A. Michael Parfitt und Stavros C. Manolagas. 1998. "Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines." *Journal of Bone and Mineral Research* 13 (5): 793–802. doi:10.1359/jbmr.1998.13.5.793.

Johnsson, A., C.-H. Heldin, B. Westermark und Å. Wasteson. 1982. "Platelet-derived Growth Factor: Identification of Constituent Polypeptide Chains." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 104 (1) (January 15): 66–74. doi:10.1016/0006-291X(82)91941-6.

- Jones, John I. und David R. Clemmons. 1995. "Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions." *Endocrine Reviews* 16 (1) (February 1): 3–34. doi:10.1210/edrv-16-1-3.
- Justesen, J., K. Stenderup, E.F. Eriksen und M. Kassem. 2002. "Maintenance of Osteoblastic and Adipocytic Differentiation Potential with Age and Osteoporosis in Human Marrow Stromal Cell Cultures." *Calcified Tissue International* 71 (1) (July 26): 36–44. doi:10.1007/s00223-001-2059-x.
- Karsenty, Gerard. 2001. "Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation." *Endocrinology* 142 (7) (July 1): 2731–2733. doi:10.1210/en.142.7.2731.
- Katsuno, Yoko, Samy Lamouille und Rik Derynck. 2013. "TGF- β Signaling and Epithelial-mesenchymal Transition in Cancer Progression." *Current Opinion in Oncology* 25 (1) (January): 76–84. doi:10.1097/CCO.0b013e32835b6371.
- Keene, G S, M J Parker und G A Pryor. 1993. "Mortality and Morbidity After Hip Fractures." *BMJ: British Medical Journal* 307 (6914) (November 13): 1248–1250.
- Keyvan-Fouladi, Naghmeh, Geoffrey Raisman und Ying Li. 2003. "Functional Repair of the Corticospinal Tract by Delayed Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells in Adult Rats." *The Journal of Neuroscience* 23 (28) (October 15): 9428–9434.
- Kisiday, John D, Bodo Kurz, Michael A DiMicco und Alan J Grodzinsky. 2005. "Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds." *Tissue engineering* 11 (1-2) (February): 141–151. doi:10.1089/ten.2005.11.141.
- Kock, H J und A E Handschin. 2002. "Osteoblast Growth Inhibition by Unfractionated Heparin and by Low Molecular Weight Heparins: An In-vitro Investigation." *Clinical and Applied Thrombosis/hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 8 (3) (July): 251–255.
- Komori, Toshihisa. 2006. "Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors." *Journal of Cellular Biochemistry* 99 (5): 1233–1239. doi:10.1002/jcb.20958.
- Kulkarni, A B, C G Huh, D Becker, A Geiser, M Lyght, K C Flanders, A B Roberts, M B Sporn, J M Ward und S Karlsson. 1993. "Transforming Growth Factor Beta 1 Null Mutation in Mice Causes Excessive Inflammatory Response and Early Death."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (2) (January 15): 770–774.

Lankat-Buttgereit, Brigitte, Karlheinz Mann, Rainer Deutzmann, Rupert Timpl und Thomas Krieg. 1988. “Cloning and Complete Amino Acid Sequences of Human and Murine Basement Membrane Protein BM-40 (SPARC, Osteonectin).” *FEBS Letters* 236 (2) (August 29): 352–356. doi:10.1016/0014-5793(88)80054-1.

Lei, Hua, Ran Xiao, Xiao Jun Tang und Lai Gui. 2009. “Evaluation of the Efficacy of Platelet-rich Plasma in Delivering BMSCs into 3D Porous Scaffolds.” *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 91 (2) (November): 679–691. doi:10.1002/jbm.b.31444.

Leskelä, Hannu-Ville, Juha Risteli, Salla Niskanen, Jussi Koivunen, Kaisa K Ivaska und Petri Lehenkari. 2003. “Osteoblast Recruitment from Stem Cells Does Not Decrease by Age at Late Adulthood.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (4) (November 28): 1008–1013.

Li, Xuri und Ulf Eriksson. 2003. “Novel PDGF Family Members: PDGF-C and PDGF-D.” *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14 (2) (April): 91–98. doi:10.1016/S1359-6101(02)00090-4.

Li, Xuri, Annica Pontén, Karin Aase, Linda Karlsson, Alexandra Abramsson, Marko Uutela, Gudrun Bäckström, et al. 2000. “PDGF-C Is a New Protease-activated Ligand for the PDGF A-receptor.” *Nature Cell Biology* 2 (5): 302–309. doi:10.1038/35010579.

Loeper, Siobhan und Shereen Ezzat. 2008. “Acromegaly: Re-thinking the Cancer Risk.” *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 9 (1) (March): 41–58. doi:10.1007/s11154-007-9063-z.

Lohmann, Michael, Gudrun Walenda, Hatim Hemed, Sylvia Jousen, Wolf Drescher, Stefan Jockenhoevel, Gabriele Hutschenreuter, Martin Zenke und Wolfgang Wagner. 2012. “Donor Age of Human Platelet Lysate Affects Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells.” *PLoS ONE* 7 (5) (May 25). doi:10.1371/journal.pone.0037839. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3360602/>.

Lu, Chuanyong, Theodore Miclau, Diane Hu, Erik Hansen, Kathy Tsui, Christian Puttlitz und Ralph S Marcucio. 2005. “Cellular Basis for Age-related Changes in Fracture Repair.”

Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society 23 (6) (November): 1300–1307. doi:10.1016/j.orthres.2005.04.003.1100230610.

Man, D, H Plosker und J E Winland-Brown. 2001. “The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery.” *Plastic and reconstructive surgery* 107 (1) (January): 229–237; discussion 238–239.

Manolagas, Stavros C. 2000. “Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis.” *Endocrine Reviews* 21 (2) (April 1): 115–137. doi:10.1210/er.21.2.115.

Margolis, D J, J Kantor, J Santanna, B L Strom und J A Berlin. 2001. “Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers.” *Diabetes care* 24 (3) (March): 483–488.

Martinez-Zapata, Maria José, Arturo J Martí-Carvajal, Ivan Solà, José Angel Expósito, Ignasi Bolívar, Luciano Rodríguez und Joan Garcia. 2012. “Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds.” *The Cochrane database of systematic reviews* 10: CD006899. doi:10.1002/14651858.CD006899.pub2.

Mazzocca, Augustus D., Mary Beth R. McCarthy, David M. Chowaniec, Mark P. Cote, Anthony A. Romeo, James P. Bradley, Robert A. Arciero und Knut Beitzel. 2012. “Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability.” *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 94 (4) (February 15): 308–316. doi:10.2106/JBJS.K.00430.

Meirelles, Lindolfo da Silva, Pedro Cesar Chagastelles und Nance Beyer Nardi. 2006. “Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-natal Organs and Tissues.” *Journal of Cell Science* 119 (11) (June 1): 2204–2213. doi:10.1242/jcs.02932.

Mendes, S.C., J.M. Tibbe, M. Veenhof, K. Bakker, S. Both, P.P. Platenburg, F.C. Oner, J.D. de Bruijn und C.A. van Blitterswijk. 2002. “Bone Tissue-Engineered Implants Using Human Bone Marrow Stromal Cells: Effect of Culture Conditions and Donor Age.” *Tissue Engineering* 8 (6) (December): 911–920. doi:10.1089/107632702320934010.

Miao, Yong, Ya-Bin Sun, Xi-Jin Sun, Ben-Jun Du, Jin-Dou Jiang und Zhi-Qi Hu. 2013. “Promotional Effect of Platelet-Rich Plasma on Hair Follicle Reconstitution in vivo.”

Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.] 39 (12) (December): 1868–1876. doi:10.1111/dsu.12292.

Mishra, Allan, Padmaja Tummala, Aaron King, Byung Lee, Mark Kraus, Victor Tse und Christopher R Jacobs. 2009. “Buffered Platelet-rich Plasma Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation.” *Tissue Engineering. Part C, Methods* 15 (3) (September): 431–435. doi:10.1089/ten.tec.2008.0534.

Moraes, Vinícius Y, Mário Lenza, Marcel Jun Tamaoki, Flávio Faloppa und João Carlos Belloti. 2013. “Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries.” *The Cochrane database of systematic reviews* 12: CD010071. doi:10.1002/14651858.CD010071.pub2.

Murphy, Matthew B, Kathryn Moncivais und Arnold I Caplan. 2013. “Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine.” *Experimental & molecular medicine* 45: e54. doi:10.1038/emm.2013.94.

Mustonen, T. und K. Alitalo. 1995. “Endothelial Receptor Tyrosine Kinases Involved in Angiogenesis.” *The Journal of Cell Biology* 129 (4) (May 15): 895–898. doi:10.1083/jcb.129.4.895.

Nakayama, Youhei, Yu Nakajima, Naoko Kato, Hideki Takai, Dong-Soon Kim, Masato Arai, Masaru Mezawa, Shouta Araki, Jaro Sodek und Yorimasa Ogata. 2006. “Insulin-like Growth factor-I Increases Bone Sialoprotein (BSP) Expression Through Fibroblast Growth Factor-2 Response Element and Homeodomain Protein-binding Site in the Proximal Promoter of the BSP Gene.” *Journal of Cellular Physiology* 208 (2): 326–335. doi:10.1002/jcp.20664.

National Institute of health
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mesenchymal+stem+cells> (12.09.2016)

O’Kane, Sharon und Mark W.J. Ferguson. 1997. “Transforming Growth Factor Bs and Wound Healing.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (1) (January): 63–78. doi:10.1016/S1357-2725(96)00120-3.

Parfitt, A.m., G.r. Mundy, G.d. Roodman, D.e. Hughes und B.f. Boyce. 1996. “Theoretical Perspective: A New Model for the Regulation of Bone Resorption, with Particular Reference to the Effects of Bisphosphonates.” *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (2): 150–159. doi:10.1002/jbmr.5650110203.

Pountos, Ippokratis, Theodora Georgouli, Karen Henshaw, Howard Bird, Elena Jones und Peter V Giannoudis. 2010. “The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone.” *Journal of orthopaedic trauma* 24 (9) (September): 552–556. doi:10.1097/BOT.0b013e3181efa8fe.

Raeissadat, Seyed Ahmad, Seyed Mansoor Rayegani, Marzieh Babaei und Elham Ghorbani. 2013. “The effect of platelet-rich plasma on pain, function, and quality of life of patients with knee osteoarthritis.” *Pain research and treatment* 2013: 165967. doi:10.1155/2013/165967.

Ramaswamy, Girija, Vasanti R. Rao, Lakshmi Krishnamoorthy, G. Ramesh, R. Gomathy und D. Renukadevi. 2000. “Serum Levels of Bone Alkaline Phosphatase in Breast and Prostate Cancers with Bone Metastasis.” *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 15 (2) (July): 110–113. doi:10.1007/BF02883737.

Le Roith, Derek. 1997. “Insulin-Like Growth Factors.” *New England Journal of Medicine* 336 (9): 633–640. doi:10.1056/NEJM199702273360907.

Roobrouck, Valerie D., Fernando Ulloa-Montoya, and Catherine M. Verfaillie. 2008. “Self-renewal and Differentiation Capacity of Young and Aged Stem Cells.” *Experimental Cell Research* 314 (9) (May 15): 1937–1944. doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.006.

Salemi, Salvatore, Cristina Rinaldi, Francesco Manna, Gianni Franco Guarneri und Pier Camillo Parodi. 2008. “Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma.” *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS* 61 (12) (December): 1565–1567. doi:10.1016/j.bjps.2008.04.048.

Sanford, L. P., I. Ormsby, A. C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman, G. P. Boivin, E. L. Cardell and T. Doetschman. 1997. "TGFbeta2 Knockout Mice Have Multiple Developmental Defects That Are Non-overlapping with Other TGFbeta Knockout Phenotypes." *Development* 124 (13) (July 1): 2659–2670.

Scala, Marco, Paola Mereu, Francesco Spagnolo, Michela Massa, Annalisa Barla, Sofia Mosci, Gilberto Forno, Andra Ingenito and Paolo Strada. 2014. "The Use of Platelet-rich Plasma Gel in Patients with Mixed Tumour Undergoing Superficial Parotidectomy: A Randomized Study." *In Vivo* 28 (1) (January 1): 121–124.

Scully, Olivia Jane, Boon-Huat Bay, George Yip and Yingnan Yu. 2012. "Breast Cancer Metastasis." *Cancer Genomics - Proteomics* 9 (5) (September 1): 311–320.

Segal, Jodi B. and Alison R. Moliterno. 2006. "Platelet Counts Differ by Sex, Ethnicity, and Age in the United States." *Annals of Epidemiology* 16 (2) (February): 123–130. doi:10.1016/j.annepidem.2005.06.052.

Sethe, Sebastian, Andrew Scutt and Alexandra Stolzing. 2006. "Aging of Mesenchymal Stem Cells." *Ageing Research Reviews* 5 (1) (February): 91–116. doi:10.1016/j.arr.2005.10.001.

Shanskii, Ya D, N S Sergeeva, I K Sviridova, M S Kirakozov, V A Kirsanova, S A Akhmedova, A I Antokhin and V I Chissov. 2013. "Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types." *Bulletin of experimental biology and medicine* 156 (1) (October): 146–151.

Spees, Jeffrey L, Carl A Gregory, Harpreet Singh, H Alan Tucker, Alexandra Peister, Patrick J Lynch, Shu-Ching Hsu, Jason Smith and Darwin J Prockop. 2004. "Internalized Antigens Must Be Removed to Prepare Hypoimmunogenic Mesenchymal Stem Cells for Cell and Gene Therapy." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 9 (5) (May): 747–756. doi:10.1016/j.ymthe.2004.02.012.

Stenberg, P. E., R. P. McEver, M. A. Shuman, Y. V. Jacques and D. F. Bainton. 1985. "A Platelet Alpha-granule Membrane Protein (GMP-140) Is Expressed on the Plasma Membrane After Activation." *The Journal of Cell Biology* 101 (3) (September 1): 880–886. doi:10.1083/jcb.101.3.880.

Sundin, Mikael, Olle Ringdén, Berit Sundberg, Silvia Nava, Cecilia Götherström und Katarina Le Blanc. 2007. "No Alloantibodies Against Mesenchymal Stromal Cells, but Presence of Anti-fetal Calf Serum Antibodies, After Transplantation in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Recipients." *Haematologica* 92 (9) (September): 1208–1215.

Takahashi, Kazutoshi und Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4) (August 25): 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tanaka, H und C T Liang. 1995. "Effect of Platelet-derived Growth Factor on DNA Synthesis and Gene Expression in Bone Marrow Stromal Cells Derived from Adult and Old Rats." *Journal of Cellular Physiology* 164 (2) (August): 367–375. doi:10.1002/jcp.1041640217.

Tomoyasu, Akihiro, Kanji Higashio, Kazuhiro Kanomata, Masaaki Goto, Kunihiko Kodaira, Hiroko Serizawa, Tatsuo Suda, et al. 2007. "Platelet-rich Plasma Stimulates Osteoblastic Differentiation in the Presence of BMPs." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361 (1) (September 14): 62–67. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.142.

Trounson, Alan, Rahul G. Thakar, Geoff Lomax und Don Gibbons. 2011. "Clinical Trials for Stem Cell Therapies." *BMC Medicine* 9 (1) (May 10): 52. doi:10.1186/1741-7015-9-52.

Uchida, Soshi, Akinori Sakai, Hideaki Kudo, Hajime Otomo, Makoto Watanuki, Masahiro Tanaka, Masato Nagashima und Toshitaka Nakamura. 2003. "Vascular Endothelial Growth Factor Is Expressed Along with Its Receptors During the Healing Process of Bone and Bone Marrow After Drill-hole Injury in Rats." *Bone* 32 (5) (May): 491–501.

Uutela, Marko, Juha Laurén, Erika Bergsten, Xuri Li, Nina Horelli-Kuitunen, Ulf Eriksson und Kari Alitalo. 2001. "Chromosomal Location, Exon Structure, and Vascular Expression Patterns of the Human PDGFC and PDGFD Genes." *Circulation* 103 (18) (May 8): 2242–2247. doi:10.1161/01.CIR.103.18.2242.

Vestergaard, Peter, Lars Rejnmark und Leif Mosekilde. 2009. "Loss of Life Years After a Hip Fracture." *Acta Orthopaedica* 80 (5) (October 1): 525–530. doi:10.3109/17453670903316835.

Wang, Ching-Jen, Hao-Chen Liu und Te-Hu Fu. 2007. "The effects of extracorporeal shockwave on acute high-energy long bone fractures of the lower extremity." *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 127 (2) (February): 137–142. doi:10.1007/s00402-006-0236-0.

Weibrich, Gernot, Wilfried K G Kleis, Philipp Streckbein, Maximilian Moergel, Walter E Hitzler und Gerd Hafner. 2012. "Comparison of point-of-care methods for preparation of platelet concentrate (platelet-rich plasma)." *The International journal of oral & maxillofacial implants* 27 (4) (August): 762–769.

Wrana, Jeffrey L., Liliana Attisano, Juan Cárcamo, Alejandro Zentella, Jacqueline Doody, Marikki Laiho, Xiao-Fan Wang und Joan Massague. 1992. "TGF β Signals Through a Heteromeric Protein Kinase Receptor Complex." *Cell* 71 (6) (December 11): 1003–1014. doi:10.1016/0092-8674(92)90395-S.

Wu, Yiping, Shoshana Yakar, Ling Zhao, Lothar Hennighausen und Derek LeRoith. 2002. "Circulating Insulin-like Growth Factor-I Levels Regulate Colon Cancer Growth and Metastasis." *Cancer Research* 62 (4) (February 15): 1030–1035.

Yun, Jeong-Ho, Sang-Hyun Han, Seong-Ho Choi, Myung-Hyun Lee, Sang-Jin Lee, Sun U Song und Namsik Oh. 2013. "Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: Preliminary study in canine three-wall intrabony defects." *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* (December 5). doi:10.1002/jbm.b.33084.

Zhang, Chi. 2010. "Transcriptional Regulation of Bone Formation by the Osteoblast-specific Transcription Factor Osx." *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 5 (1) (June 15): 37. doi:10.1186/1749-799X-5-37.

Zhang, Mei, Shouhong Xuan, Mary L Boussein, Dietrich von Stechow, Nagako Akeno, Marie Claude Faugere, Hartmut Malluche, et al. 2002. "Osteoblast-specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (46) (November 15): 44005–44012. doi:10.1074/jbc.M208265200.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei möchte ich mich insbesondere bei folgenden Personen bedanken:

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Geschwistern für die tägliche Unterstützung in Wort und Tat.

Herrn Prof. Dr. Krauspe, Direktor der Orthopädischen Klinik Düsseldorf, für die Möglichkeit an seiner Klinik meine Promotionsarbeit durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Jäger, Direktor der Orthopädischen Klinik Essen, welcher mir das Thema vorgeschlagen und die Anfänge meiner Arbeit betreut hat.

Frau Dr. Herten für ihre unermüdliche, hervorragende Betreuung, ihre konstruktiven Ratschläge, ihre positive Einstellung und das kontinuierliche Vorantreiben meiner Arbeit.

Frau Lensing-Höhn für ihre freundliche Unterstützung und ihren persönlichen Einsatz bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Zilkens, stellvertretender Klinikleiter der Orthopädischen Klinik Düsseldorf, welcher mich in organisatorischen Fragen stets beraten hat und mir als Betreuer zur Seite stand.

Herrn Prof. Fischer für seine Hilfe bei dem Durchführen sowie der Auswertung des FACS.

Frau Oeyen für ihren kollegialen Zuspruch und die Unterstützung bei dem experimentellen Teil der Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung:

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

Melanie Vogl

02.01.17