

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Einfluss von Konzentration und Aufbereitung von platelet
rich fibrin auf bone marrow mononuclear cells *in vitro***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Kirsten Thorwart

aus Quakenbrück

Frankfurt am Main, 2021

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Stefan Zeuzem |
| Referent: | Prof. Dr. Dirk Henrich |
| Korreferent/in: | Prof. Dr. Bernhard Brüne |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 24.01.2022 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | Knochenheilung | 6 |
| 1.1.1 | Direkte Frakturheilung | 7 |
| 1.1.2 | Indirekte Frakturheilung | 7 |
| 1.2 | Critical size defect | 10 |
| 1.3 | Aktueller Therapiestandard | 10 |
| 1.3.1 | Goldstandard - Autologe Knochentransplantation | 10 |
| 1.3.2 | Allogene Knochentransplantation | 12 |
| 1.3.3 | Kallusdistraktionskonzept nach Ilizarov | 12 |
| 1.3.4 | Knochenersatzmaterialien | 13 |
| 1.3.5 | Osteoinduktive Materialien | 13 |
| 1.4 | Tissue Engineering | 14 |
| 1.4.1 | Trägermaterialien | 14 |
| 1.4.2 | Wachstumsfaktoren | 15 |
| 1.4.3 | Progenitorzellen | 15 |
| 1.5 | Bone marrow mononuclear cells | 16 |
| 1.6 | Angiogenese und ihre Schlüsselrolle für regenerative Prozesse | 18 |
| 1.7 | Platelet rich Plasma | 19 |
| 1.8 | Platelet rich fibrin | 19 |
| 1.8.1 | Low Speed Centrifugation Concept | 22 |
| 1.9 | Fragestellung | 23 |
| 2 | Material und Methoden | 25 |
| 2.1 | Apparaturen und Materialien | 25 |
| 2.1.1 | Zellen | 28 |
| 2.1.2 | Platelet rich fibrin | 28 |
| 2.1.3 | Nährmedien | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.4 Puffer und Lösungen | 29 |
| 2.1.5 Zellfärbung | 30 |
| 2.1.6 ELISA | 31 |
| 2.1.7 RT-PCR | 31 |
| 2.1.8 Apoptose | 32 |
| 2.2 Methoden | 33 |
| 2.2.1 Ansätze | 33 |
| 2.2.2 Ethik | 33 |
| 2.2.3 Isolierung von BMC | 33 |
| 2.2.4 Isolierung von PRF low-RCF und PRF medium-RCF | 34 |
| 2.2.5 Isolierung des Serums | 35 |
| 2.2.6 Proteinquantifizierung mittels ELISA | 36 |
| 2.2.7 Aussaat der Zellen | 36 |
| 2.2.8 Nachweis der metabolischen Aktivität der BMC (MTS-Assay) | 37 |
| 2.2.9 Nachweis zelltypspezifischer Genexpression mittels RT-PCR | 38 |
| 2.2.10 RNA-Isolierung | 39 |
| 2.2.11 cDNA-Synthese | 40 |
| 2.2.12 Realtime PCR | 40 |
| 2.2.13 Bestimmung der Apoptoserate | 41 |
| 2.2.14 Statistik | 42 |
| | |
| 3. Ergebnisse | 43 |
| 3.1 Vorversuche | 43 |
| 3.1.1 Überprüfung der Zellfreiheit des PRF | 43 |
| 3.1.2 Dosisfindungskurve | 44 |
| 3.2 Hauptversuch | 46 |
| 3.2.1 Charakterisierung des PRF | 46 |
| 3.2.2 Einfluss von PRF auf die metabolische Aktivität der BMC | 48 |
| 3.2.3 Genexpression in BMC bei Kombination mit PRF | 49 |
| 3.2.3.1 TGF- β -Genexpression | 50 |
| 3.2.3.2 BCL-2 / BAX - Genexpression | 51 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.2.3.3 | Genexpression der Matrix-Metalloproteasen | 54 |
| 3.2.3.4 | Genexpression von sICAM-1, ALP, COL1A1 | 57 |
| 3.2.3.5 | Genexpression von FGF23 und SPP1 | 60 |
| 3.2.4 | Einfluss von PRF auf die Apoptose der BMC | 62 |
| 4 | Diskussion | 65 |
| 4.1 | Zusammenfassung der Hauptergebnisse | 65 |
| 4.2 | Aktueller Forschungsstand und Studiendesign | 66 |
| 4.3 | Wachstumsfaktoren in PRF low-RCF und PRF medium-RCF | 69 |
| 4.4 | Genexpression in BMC nach Inkubation mit PRF | 72 |
| 4.5 | Osteogene Aktivität von BMC und PRF | 76 |
| 4.6 | Apoptose in BMC nach Inkubation mit PRF | 76 |
| 4.7 | Limitationen der Studie | 79 |
| 5 | Zusammenfassung | 81 |
| 6 | Summary | 83 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 85 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 102 |
| 9 | Abbildungsverzeichnis | 104 |
| 10 | Tabellenverzeichnis | 105 |
| 11 | Lebenslauf | 106 |
| 12 | Danksagung | 108 |
| 13 | Schriftliche Erklärung | 109 |

1 Einleitung

Die Therapie großer Knochendefekte stellt schon länger eine Herausforderung der Medizin, aber auch der Sozioökonomie dar. Der Knochen besitzt als einziges Gewebe des Körpers selbst bei einer vollständigen Kontinuitätsunterbrechung die Fähigkeit zur eigenständigen Regeneration. ¹ Bei der komplexen Knochenheilung kann es allerdings zu vielerlei Komplikationen kommen. Eines der größten Probleme stellt dabei der sogenannte *critical size defect* des Knochens dar. Dieser kann unter anderem nach Trauma, Osteomyelitis oder Tumorsektion auftreten und verhindert eine regelrechte Heilung des Knochens. Die Behandlung von Knochendefekten und daraus resultierenden Komplikationen ist von epidemiologischer Bedeutung. In Deutschland wurde beispielsweise 2002 die Häufigkeit der Schenkelhalsfrakturen auf über 100.000 pro Jahr geschätzt. ² Durch den demographischen Wandel und das mit steigendem Alter zunehmende Frakturrisiko wird diese Zahl weiterwachsen.

1.1 Knochenheilung

Für eine ungestörte Knochenheilung müssen mehrere Voraussetzungen gegeben sein. Generell kann eine direkte (primäre) von einer indirekten (sekundären) Frakturheilung unterschieden werden. Die direkte Knochenheilung erfordert dabei optimale Bedingungen. Aufgrund dessen ist sie in der Regel nur bei der operativen Versorgung mittels stabiler Osteosynthese oder bei Fissuren zu beobachten. Bei der konservativen Bruchbehandlung und der Stabilisierung mittels Marknagelosteosynthese oder Fixateur externe kommt es in den meisten Fällen zur indirekten Frakturheilung mit Kallusbildung. ^{3,4}

1.1.1 Direkte Frakturheilung

Die direkte Frakturheilung beruht auf den physiologischen Umbauprozessen des Knochens. Dabei kommt es zum Einwachsen von neu gebildeten zentralen Knochenkanälen, den Havers-Kanälen, aus reifen Osteonen in das Frakturfragment. Im Gegensatz zur indirekten Frakturheilung verläuft dieser Prozess vergleichsweise langsam. Generell wird hier von einer Remodelingphase von ca. 1-1,5 Jahren ausgegangen. Diese sogenannte Kontaktheilung erfordert unter anderem die exakte Reposition der Frakturfragmente und den engen Kontakt der Frakturrenden. Außerdem setzt der Knochenumbau eine gute Durchblutung sowie die absolute Ruhigstellung des Bruches voraus. Bestehen allerdings Spalten zwischen den Frakturfragmenten, so kommt es dementsprechend zur Spalthheilung. Endost und Periost füllen den Defekt mit Geflechtknochen auf. Dieser wird im Laufe der Zeit durch funktionelles Remodeling, den sogenannten Havers-Umbau, zu lamellärem Knochen umgebaut.³

1.1.2 Indirekte Frakturheilung

Bei der indirekten Frakturheilung kommt es im Gegensatz dazu primär zur Bildung von bindegewebigem Kallus, der erst sekundär in Knochen differenziert wird. Dieser Prozess lässt sich in mehrere Phasen einteilen.

Frakturphase

Bei der ersten Phase, der Frakturphase, kommt es durch eine übermäßige Belastung des Knochens zu einer vollständigen oder unvollständigen Unterbrechung der Kontinuität des Periosts, der Kortikalis und der Spongiosa. Dadurch werden ebenfalls die versorgenden Blutgefäße durchtrennt und es bildet sich ein Hämatom in dem Frakturspalt und angrenzendem Weichgewebe. Reflektorisch kommt es bereits hier zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren,

Zytokinen sowie zur Aktivierung pluripotenter Zellen als Vorläufer der Osteoblasten.

1

Entzündungsphase

Das Gewebe reagiert daraufhin mit einer Entzündung. Es kommt zum Einwachsen von Kapillaren. Granulozyten, Monozyten und Mastzellen wandern in den Frakturspalt ein. Dort beginnen sie unter anderem mit der Resorption des Hämatoms. Zudem kommt es zur Organisation des Frakturspalt durch ein lockeres Netz aus Fibrin und Kollagenfibrillen.⁵ Während der initialen proinflammatorischen Antwort werden Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL) -1, IL-6, IL-11 und IL-18 ausgeschüttet. Diese führen zu einer weiteren Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und tragen zur Förderung von angiogenetischen Prozessen bei.⁶ Die Durchblutung der periostalen Gefäße wird gesteigert und beträgt bereits nach weniger als 14 Tagen ein Vielfaches der normalen Durchblutung des Knochens.⁴ Die Entzündungsphase klingt nach etwa 48-72 Stunden ab. Sie hält allerdings bis zur Bildung eines bindegewebigen Kallus an.¹

Granulationsphase

Im Verlauf kommt es zum Ersatz der ersten zarten Bindegewebsschichten durch Granulationsgewebe. Zu diesem Zweck ist die Rekrutierung von Mesenchymalen Stammzellen (MSC) notwendig, die sich unter anderem zu osteogenen Zellen differenzieren können. Fibroblasten synthetisieren nun vermehrt Kollagen Typ I und füllen die Frakturhöhle mit weichem Kallus von peripher nach zentral auf. Dabei spielen Wachstumsfaktoren wie *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Insulin-like Growth Factor* (IGF) -1, IGF-2, *Fibroblast Growth Factor* (FGF) und *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) eine wichtige Rolle.

In diesem Stadium findet die sogenannte „primäre Kallusreaktion“ statt. Sie ist gekennzeichnet durch das erstmalige Auftreten von Chondroblasten. Zudem

beginnen Osteoblasten mit der subperiostalen Knochenneubildung. Dieser Prozess wird ebenfalls durch die Ausschüttung von Faktoren wie TGF- β 2, - β 3 und *Growth Differentiation Factor-5* (GDF-5) unterstützt, die unter anderem zur Knorpelbildung und enchondralen Ossifikation beitragen. ^{1,4,6} Zur gleichen Zeit kann bereits in diesem Stadium eine beginnende Mineralisierung der Kollagenfibrillen beobachtet werden. Makrophagen schütten vermehrt *Bone morphogenetic proteins* (BMP) wie BMP-2, -5 und -6 aus, die wiederum den Abbau der devitalisierten Fragmentenden und die Neubildung des Knochens durch Osteoblasten anregen. Zusätzlich sezernieren die Osteoblasten Matrixproteine wie Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin. Diese Proteine sind an Mineralisierungsprozessen und Umbauvorgängen im Knochen beteiligt. ⁷

Die Granulationsphase dauert ca. 3-4 Wochen an und verbindet letztlich die Frakturfragmente durch ein knorpeliges Gerüst und Bindegewebe miteinander. ¹

Phase der Kallushärtung

Während der Phase der Kallushärtung erreicht der Knochen seine physiologische Festigkeit. Es kommt zur vermehrten Mineralisierung des bindegewebigen Kallus und damit zur Umwandlung in den Fixationskallus. Ähnlich den Vorgängen bei der embryonalen Knochenentwicklung wird die Knochenmatrix an dem knorpeligen Grundgerüst angebaut und der Knorpel im Verlauf abgebaut. Es entsteht unreifer Geflechtknochen, der sich entlang der Kapillaren ausbreitet. ¹

Modeling und Remodelingphase

In der letzten Phase der Frakturheilung wird der unreife Faserknochen entsprechend seiner mechanischen Beanspruchung in ausgereiften Lamellenknochen umgebaut. Nach ca. 6 Wochen kann die normale Festigkeit des Knochens wiederhergestellt sein. Bis alle Prozesse des Remodelings vollständig abgeschlossen sind, können allerdings Monate bis Jahre vergehen. ¹

1.2 Critical size defect

Die Therapie von Knochendefekten kritischer Größe, sogenannten *critical size defects*, stellt die Medizin immer noch vor zahlreiche Probleme. Nach Schmitz und Hollinger (1986) wurde dieser Begriff als Knochendefekt definiert, der während der gesamten Lebenszeit eines Organismus nicht spontan verheilen kann. Durch die Größe des *critical size defects* kann kein ossäres Gerüst gebildet werden. Es kommt dagegen zur Ausbildung einer bindegewebigen Überbrückung der Läsion. Diese fibroblastische Barriere verhindert eine Heilung und führt lediglich zur Kallusbildung an den knöchernen Enden.⁸ Für die Regenerationsfähigkeit wichtige Gewebefaktoren wie beispielsweise BMP sind in diesen Läsionen nur spärlich vorhanden. Charakteristischerweise findet sich in einem *critical size defect* weniger als 10% knöchernes Regenerationsgewebe. Die Mindestgröße ist dabei unter anderem abhängig von dem Alter und Allgemeinzustand des Patienten sowie von der Lokalisation der ossären Läsion.⁹ Generell wird ein Knochendefekt als kritisch bezeichnet, sobald er die 2 bis 2,5-fache Größe des Durchmessers der betroffenen Knochen überschreitet.¹⁰

1.3 Aktueller Therapiestandard

1.3.1 Goldstandard - Autologe Knochentransplantation

Den aktuellen Goldstandard in der Therapie von *critical size defects* stellt die autologe Knochentransplantation dar.¹¹ Das Knochenmaterial wird dabei meist vom anterioren und posterioren Beckenkamm gewonnen. Hier können vergleichsweise große Mengen an Knochen entnommen werden, ohne die strukturelle Stabilität der Extremität zu beeinflussen.¹² Alternativ besteht unter anderem die Möglichkeit Transplantate aus der proximalen Tibia, der Fibula sowie der Markhöhle der langen Röhrenknochen zu gewinnen.¹³ Je nach Ausmaß und Art des Defektes können

sowohl reine Spongiosa, kortikospongiöse Späne oder Kombinationen verwendet werden.

Zur Gewinnung größerer Mengen Spongiosa wird seit ein paar Jahren auch das sogenannte *Reamer-Irrigator-Aspirator* (RIA)-System benutzt. Dabei wird der intramedulläre Kanal der langen Röhrenknochen aufgebohrt und unter kontinuierlicher Absaugung die Knochenspongiosa herausgefiltert. Diese minimal-invasive Technik zeigt weniger lokale Komplikationen und eine geringere Entnahmemorbidität als die Transplantatgewinnung am Beckenkamm.¹⁴

Die autologen Transplantate wirken sowohl über einen osteogenen als auch über einen osteoinduktiven und osteokonduktiven Effekt. Die osteogene Wirkung zeigt sich dabei durch die Versorgung des Defektes mit Osteoblasten, Osteozyten und Vorläuferzellen zur Knochenneubildung. Durch den osteoinduktiven Einfluss des autologen Materials wird zudem die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Matrixproteinen und Zytokinen gefördert. Unter dem osteokonduktiven Effekt versteht man die Bereitstellung eines Mineral- und Kollagengerüsts, das den einwachsenden Gefäßen und osteogenen Zellen als Leitschiene dient.

Die Spongiosa besitzt eine große Oberfläche, reichlich osteogene Zellen und bietet ein gutes Gerüst für eine rasche Revaskularisation. Durch die Integration des Transplantates in den umgebenden Knochen unterliegt das Material dem körpereigenen Remodeling und passt sich so den biomechanischen Belastungen an. Aufgrund dessen eignet sich die autogene Spongiosaplastik besonders bei kleinen, monokortikalen Defekten.

Bei hohen mechanischen Anforderungen kommen kortikospongiöse Späne zum Einsatz. Die Kortikalis bietet im Gegensatz zur Spongiosa nur ein minimales osteogenes Potential, allerdings eine bessere strukturelle Stabilität.^{1,13}

Mit der autologen Knochen transplantation gehen allerdings auch Nachteile und Risiken einher. Größe, Qualität und Zustand des Knochenmaterials variieren abhängig vom Donor. Darüber hinaus ist neben der Transplantation ein zweiter Eingriff zur Gewinnung der Spongiosa oder kortikospongiöser Späne notwendig. Die Entnahmemorbidität steigt dabei mit der Menge des entnommenen Knochens.¹⁵ Je nach Literatur wird sie auf bis zu 44,8% geschätzt.¹ Die Verfügbarkeit des

Knochenmaterials am Beckenkamm ist außerdem begrenzt und der Eingriff bringt Komplikationen wie Hämatome, Infektionen, Nervenläsionen und die Gefahr chronischer Schmerzen mit sich. ¹⁵

1.3.2 Allogene Knochentransplantation

Eine Alternative stellt die allogene Knochentransplantation dar. Das Material wird dabei intraoperativ im Rahmen von Hüfttotalprothesenimplantationen gewonnen. ¹ Besonders bei großen Knochendefekten über 6 cm Länge wird aufgrund einer langsameren Resorption des Transplantates und zur Vermeidung der hohen Entnahmemorbidität häufig auf kortikale allogene Grafts zurückgegriffen. ^{10,16} Die Voraussetzung für eine erfolgreiche allogene Knochentransplantation ist die Sterilität und die Reduktion der Immunogenität des Gewebes. Die Verarbeitung des Grafts mittels Gefriertrocknung oder Abtrennung von Blut und zellulären Bestandteilen ermöglicht eine verringerte Immunantwort des Empfängers. Durch strenge Richtlinien bei den Gewebsbanken und Verbesserungen in der Verarbeitung der Transplantate konnte in den letzten Jahren der Erfolg der Allografts deutlich verbessert werden. ¹⁷ Das Risiko einer Transmission von viralen Infektionen wie zum Beispiel HIV und Hepatitis wurde infolgedessen signifikant reduziert, wenn auch nicht vollständig beseitigt. ¹⁸ Auf der anderen Seite zeigen allogene oder auch xenogene Transplantate weniger osteogenes Potenzial als autologes Material. ¹⁵ Darüber hinaus ist aufgrund der verzögerten Integration des allogenen Grafts eine verlängerte Immobilisation erforderlich, die mit Komplikationen wie diffuser Osteopenie oder Muskelatrophie einhergeht. ¹⁰

1.3.3 Kallusdistraktionskonzept nach Ilizarov

Neben der autologen und allogenen Knochentransplantation bietet die Distraktionsosteogenese eine weitere Möglichkeit zur Therapie des *critical size defects*. Die 1954 von Ilizarov zuerst beschriebene Methode wurde zur Behandlung der chronischen Osteomyelitis, von Pseudarthrosen und größeren Knochendefekten

entwickelt. ^{19,20} Initial wird bei dem Kallusdistraktionskonzept der nekrotische Knochen debridiert und eine Kortikotomie vorgenommen, bei der die medulläre Gefäßversorgung erhalten bleibt. Im Anschluss wird ein Fixateur externe angelegt, der Zug auf die Fraktarenden ausübt. Dadurch wird die Knochenneubildung angeregt. Die Spannung der externen Fixation kann allerdings auch Komplikationen wie Gewebs-, Nerven- und Gefäßschäden hervorrufen. ^{20,21}

1.3.4 Knochenersatzmaterialien

Eine immer wichtigere Rolle in der Therapie der Knochendefekte spielen die sogenannten Knochenersatzmaterialien. Unter der großen Masse an Produkten, die mittlerweile auf dem Markt sind, repräsentieren die Keramiken und Zemente auf Calciumphosphatbasis eine der meistgenutzten Stoffklassen. ¹¹ Neben diesen anorganischen Knochenersatzstoffen gibt es noch organische Materialien, wie beispielsweise abbaubare Polymere. Wichtige Faktoren, die bei der Herstellung der unterschiedlichen Materialien beachtet werden müssen, sind die Applikationsform und die Integration nach Implantation in Form von Bioresorbierbarkeit und Biodegradierbarkeit. So nimmt bei den synthetischen Polymeren die mechanische Primärstabilität aufgrund ihrer starken Biodegradation im Laufe der Zeit ab. Im Gegensatz dazu werden Calciumphosphatzemente nur sehr langsam bis gar nicht abgebaut, sodass teilweise auch nach längerer Zeit Reste des Materials in der Defekthöhle völlig unverändert vorgefunden werden können. ²²

1.3.5 Osteoinduktive Materialien

Da die autologe Knochentransplantation als einzige Therapiemethode alle drei wichtigen Eigenschaften zur Knochenheilung vereint (Osteogenität, Osteoinduktion, Osteokonduktion), werden anstelle dieser auch Kombinationen aus zwei Knochenersatzmaterialien oder Adjuvantien verwendet. ²² Zu diesem Zweck sind beispielsweise rekombinant hergestellte BMP-2 und BMP-7 unter bestimmten

Voraussetzungen zugelassen. Die BMPs aus einer Untergruppe der TGF- β -Familie stellen die potentesten osteoinduktiven Zytokine dar. ¹⁵

Ein ebenfalls zur klinischen Anwendung geeignetes, prozessiertes Derivat des Allografts ist die demineralisierte Knochenmatrix (DBM). ¹⁸ DBM enthält neben osteokonduktiven Eigenschaften eine variable Menge an BMP und kann dadurch auch osteoinduktiv wirken. ¹⁵

1.4 Tissue Engineering

In den letzten Jahren hat darüber hinaus das Tissue Engineering immer mehr an Bedeutung gewonnen. Es wurde Anfang der neunziger Jahre erstmals vorgestellt und wird als ein Verfahren beschrieben, bei dem die Prinzipien der Biologie und des Ingenieurwesens zur Wiederherstellung von beschädigten Geweben angewandt werden. ²³ Die Basis bilden ein osteokonduktives Gerüst, Progenitorzellen wie zum Beispiel Osteoblasten und osteoinduktive Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen steuern. ²⁴ Giannoudis et al. erweiterten die generellen Komponenten, die für das Knochen-Tissue-Engineering notwendig sind, in ihrem sogenannten Diamant-Konzept. Demnach wird für ein erfolgreiches Tissue Engineering auch eine geeignete Umgebung benötigt, die den mechanischen Anforderungen entspricht und eine ausreichende Vaskularisierung bereitstellt. ²⁵ Die suffiziente Versorgung mit Nährstoffen durch die Durchblutung stellt eine grundlegende Voraussetzung zur Rekrutierung von knochenbildenden Zellen dar. ²⁶

1.4.1 Trägermaterialien

Eine wichtige Komponente des erfolgreichen Tissue Engineerings stellt ein geeignetes Gerüst dar. Die eingesetzten Materialien bilden dabei eine Leitschiene für die Progenitorzellen zur gezielten Lenkung der Knochenneubildung. ²⁷ Zudem wird eine Matrix benötigt, um die verwendeten Wachstumsfaktoren und Zellen am Implantationsort zu halten und ihren Effekt damit lokal zu begrenzen. ²⁸ Ohne eine

derartige Begrenzung konnte in mehreren tierexperimentellen Studien nach intravenöser, systemischer Infusion von mesenchymalen Stammzellen eine Ablagerung der Zellen in verschiedenen Organen des Empfängers gezeigt werden.^{29,30} Zur Anwendung kommen als Trägermaterialien beispielsweise Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat (β -TCP) oder auch demineralisierte Knochenmatrix.^{31,32}

1.4.2 Wachstumsfaktoren

Als Wachstumsfaktoren werden Proteine beschrieben, die durch Zell-Zell-Interaktion die Aktivität gewebsspezifischer Zellen regulieren können. Urist beschrieb erstmals 1965 Substanzen in der Extrazellulärmatrix des Knochens, die die knöcherne Gewebsneubildung stimulieren konnten.³³ Für den Knochenmetabolismus und die Umbauvorgänge der Extrazellulärmatrix wichtige Wachstumsfaktoren sind unter anderem TGF- β , IGF, PDGF, *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und die Familie der BMP.³⁴ Neben den osteoinduktiven Wachstumsfaktoren ist die Förderung der Angiogenese für die Knochenneubildung von großer Bedeutung. Hier ist vor allem die Familie der *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) zu erwähnen.³⁵

1.4.3 Progenitorzellen

Für das Tissue Engineering geeignete Zellen sind beispielsweise Mesenchymale Stromazellen (MSC), Endotheliale Progenitorzellen (EPC), periostale Zellen und Osteoblasten.¹⁵

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Vorläuferzellen des Bindegewebes, die sich vom Mesenchym ableiten. Sie besitzen das Potential sich in Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten zu differenzieren.³⁶ Anders als die embryonalen pluripotenten Stammzellen, besitzen die multipotenten Progenitorzellen lediglich die Fähigkeit, sich innerhalb einer Zelllinie zu differenzieren.³⁶

EPC spielen eine wichtige Rolle für das Wachstum neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen, der sogenannten Vaskulogenese. Sie sind im Blutstrom zirkulierende Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert werden können. EPC können sich zu Endothelzellen differenzieren.³⁷

In vorangegangenen Arbeiten konnte ein signifikanter Anstieg der Durchblutung durch EPC sowie eine Zunahme der Knochenmasse durch MSC in *critical size defects* des Femurs und des Schädels der Ratte gezeigt werden.^{26,38,39} Die klinische Anwendung von MSC und EPC bringt allerdings Nachteile mit sich. Die Isolierung und Kultivierung beider Zellarten ist aufwendig und vor allem zeitintensiv. Durch die Langzeit-Kultivierung kommt es zur Verzögerung der definitiven Operation des Patienten. Sie ist außerdem mit Nachteilen wie fraglicher biologischer Sicherheit und hohen Kosten verbunden.⁴⁰ Für MSC wird darüber hinaus ein erhöhtes Risiko für maligne Zellentartung auf genetischer Ebene diskutiert.⁴¹

1.5 Bone marrow mononuclear cells

Aufgrund der beschriebenen Nachteile von MSC und EPC wurde in den letzten Jahren zunehmend die Verwendung sogenannter *bone marrow mononuclear cells* (BMC) erforscht. BMC beschreiben eine Population mononukleärer Knochenmarkzellen, die unter anderem unreife Lymphozyten, Monozyten und verschiedene Subtypen von multipotenten Progenitorzellen umfassen.

Sie werden aus Knochenmarkaspirat über Ficolldichtegradientenzentrifugation gewonnen. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass sie mehrere Zelltypen mit regenerativem Potential enthalten. Neben etwa 3-4% hämatopoetischer Stammzellen (HSC) finden sich ca. 0,02% MSC-Vorläuferzellen sowie bis zu 10 % monozytäre Zellen.^{32,42-45} Für die Vaskulogenese wichtige EPC können sich aus hämatopoetischen Stammzellen und Monozyten differenzieren.⁴⁶⁻⁴⁹

Neben diesen wesentlichen Gruppen lassen sich noch weitere Nebenpopulationen mit multipotentem Differenzierungspotential unter den mononukleären Zellen nachweisen. Zu nennen sind hier unter anderem:

Side Population-Cells,⁵⁰ *Very Small Embryonic-like Stem Cells*,^{51,52} *Multipotent Adult Progenitor Cells*,⁵³ Hämangioblasten,⁵⁴ *Tissue Committed Stem Cells*,^{55,56} *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells*.⁵⁷

Der therapeutische Effekt der BMC entsteht vor allem durch eine Verbesserung der Vaskularisierung. Dies konnte bereits von Jeon et al. in ihrem Ischämiemodell der Maus nachgewiesen werden.⁵⁸ Ein großer Vorteil der BMC ist die einfache Herstellung und Anwendung. Die Zellen können anhand eines etablierten Verfahrens isoliert und aufgereinigt werden.⁵⁹ Im Gegensatz zu den MSC und EPC sind hier keine langen Kultivierungszeiten notwendig, sodass die BMC innerhalb von wenigen Stunden für die Therapie zur Verfügung stehen.³²

In der klinischen Anwendung kamen die BMC bereits in der Kardiologie zum Einsatz. Es existieren mehrere Arbeiten zur erfolgreichen Verwendung von BMC bei ST-Hebungsinfarkten. Nach intrakoronarer Injektion der Zellen in das Infarktareal bei Patienten nach ST-Hebungsinfarkt konnte ein positiver Effekt auf das Remodeling nachgewiesen werden. Dies zeigte sich anhand einer signifikant gesteigerten linksventrikulären Ejektionsfraktion.^{60,61}

In einer Studie von Hernigou et al. wurde zudem eine verbesserte Knochenheilung durch die perkutane Injektion von BMC in einen nicht-infizierten, atrophischen Knochendefekt der Tibia gezeigt. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen dem Anteil des mineralisierten Kallusvolumens und der Konzentration an Progenitorzellen beobachtet werden.⁶² Die Eignung der BMC zur Unterstützung der Knochendefektheilung wurde bereits in einem Tierversuch belegt. Die Transplantation von humanen BMC in einen 5 mm *critical size defect* am Femur der athymischen Nacktratte ergab eine signifikante Verbesserung der Knochenheilung im Vergleich zu einer Therapie mit β -TCP ohne BMC.⁴² Darüber hinaus wurde der klinische Einsatz bereits in einer Phase-I-Studie bei Patienten mit proximaler Humerusfraktur untersucht. Hier wurden BMC auf β -TCP-Knochenersatzmaterial in den Defekt gegeben. Im Rahmen der Studie fanden sich keine Anzeichen für erhöhte lokale oder systemische Inflammationen. Ferner traten keine lokalen Wundheilungsstörungen auf. Alle Frakturen heilten innerhalb von 12 Wochen ohne sekundäre Dislokationen ab.⁴⁰

1.6 Angiogenese und ihre Schlüsselrolle für regenerative Prozesse

Die genauere Charakterisierung der BMC und ihres Potentials verdeutlicht unter anderem die Schlüsselrolle der Angiogenese während der Wundheilung. Unter Angiogenese versteht man die Neubildung von Gefäßen durch Aussprossung aus bereits vorbestehenden Blutgefäßen, in Abgrenzung zur bereits beschriebenen Vaskulogenese, dem Wachstum von Gefäßen aus Vorläuferzellen des Gefäßendothels.⁶³

Die Zellproliferation und Differenzierung während der Angiogenese ist abhängig von der Aktivierung angiogenetischer Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF und bFGF.^{32,35,58} Regenerierende Gewebe sind wiederum von einer komplexen Extrazellulärmatrix geprägt, deren Einfluss sich auch auf die Aktivierung dieser Wachstumsfaktoren auswirkt.⁶⁴ Die Wirkung der unterschiedlichen Faktoren ist stark abhängig von der Art und Weise ihrer Aktivierung und auch ihrer Interaktion mit der Wundumgebung.⁶⁵ Obwohl die genaue Konzentration der Wachstumsfaktoren, die für eine spezifische Zellantwort benötigt wird, aktuell noch Gegenstand der Forschung ist, konnte bereits gezeigt werden, dass ihre Zugabe in unterschiedliche Zellkulturen zu einer verbesserten Zell-Zell-Interaktion führt.^{66,67}

Die klinische Anwendung der Wachstumsfaktoren stellt allerdings immer noch eine Herausforderung dar. Die systemische Gabe von VEGF oder bFGF zeigt beispielsweise aufgrund einer rapiden *clearance* eine sehr geringe Effektivität am Zielort. Zudem ist für VEGF die Tendenz beschrieben, eine erhöhte Permeabilität der Gefäße hervorzurufen. Dies kann in Ödemen und Hypotension resultieren.⁶⁸ Hohe lokale Konzentrationen von VEGF können außerdem malformierte Gefäße induzieren.⁶⁹ In den letzten Jahren wurde deshalb vermehrt nach Lösungen für eine physiologische, gleichmäßige Freisetzung von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF gesucht, in der Hoffnung, so die vaskuläre Neubildung beeinflussen zu können.⁶⁸

1.7 Platelet rich Plasma

Eine wichtige Quelle von Wachstumsfaktoren stellen Thrombozytenkonzentrate wie das *platelet rich plasma* (PRP) dar.⁷⁰ PRP wurde in den siebziger Jahren erstmals als „Fibrinkleber“ vorgestellt und fand im Laufe der Zeit zunehmend Verwendung in der Therapie von Wundheilungsstörungen und Gewebsdefekten, sowohl in der Humanmedizin als auch in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Das Thrombozytenreiche Plasma ist ein autologes Blutprodukt, das unter anderem durch Zentrifugation hergestellt werden kann.⁷¹ Verschiedene Arbeiten zeigen die Fähigkeit von PRP zur Freisetzung diverser Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel PDGF, TGF- β und VEGF, die signifikant zu Wundheilung und Gewebeumbau beitragen.⁷²⁻⁷⁴ Für die Herstellung des PRP existieren viele unterschiedliche Protokolle, die häufig sehr aufwendig sind und diverse Zusätze benötigen.⁷⁵

1.8 Platelet rich fibrin

Das *platelet rich fibrin* (PRF) ist ein Thrombozytenkonzentrat der nächsten Generation. Es wurde initial von Choukroun et al. in Frankreich zur Anwendung in der Implantologie der Oralchirurgie entwickelt.⁷⁶

Es kann als autologes Präparat aus Patientenblut hergestellt und direkt angewandt werden. Durch patienteneigene Substanzen werden somit Heilungs- und Regenerationsprozesse eingeleitet und beschleunigt. Im Vergleich zu anderen Derivaten wie Fibrinkleber oder PRP werden bei der Herstellung des PRF keine externen Antikoagulantien oder bovinen Zusätze wie Thrombin und Calcium zur Aktivierung benötigt. Dies reduziert das Transmissionsrisiko von Infektionskrankheiten wie Hepatitis oder HIV.

Die einfache Zentrifugation in einer Tischzentrifuge aktiviert die Gerinnungskaskade. Dadurch bildet sich in der Mitte der Röhrchen, zwischen einem azellulären Überstand an der Oberfläche und Erythrozyten am Boden, ein Fibringerinnsel. Die α - und elektronendichten Granula der aktivierten Thrombozyten werden zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren angeregt. Die im PRF

angereicherten Thrombozyten spielen außerdem eine entscheidende Rolle während der Wundheilung. Bei verletzten Gefäßen werden sie als Erstes rekrutiert und bilden durch ihre Aggregation einen vorläufigen Defektverschluss.

Das Besondere des PRF ist die Bildung einer 3-dimensionalen Fibrinmatrix. In diesem Fibrinnetz sind sowohl Thrombozyten und Leukozyten als auch Glykosaminoglykane, Glykoproteine (wie Fibronectin), Wachstumsfaktoren und Zytokine integriert. ^{75,77,78} In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass durch diese Inkorporation eine längere Lebensdauer der Wachstumsfaktoren erreicht werden kann. Für PRF konnte eine kontinuierliche Freisetzung von VEGF, TGF- β 1 und EGF (*Epidermal Growth Factor*) für bis zu 10 Tage nachgewiesen werden. ⁷⁹ Die im PRF enthaltenen Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen eine fundamentale Rolle in regenerativen Prozessen:

- *Vascular Endothelial Growth Factor* ist essentiell für die Angiogenese und die Entwicklung des embryonalen Blutkreislaufes. Unter anderem stimuliert VEGF die Migration und Teilung von Endothelzellen. Darüber hinaus wird VEGF für die enchondrale Ossifikation benötigt. ⁸⁰
- Das Zytokin TGF- β 1 spielt in vielen Regelkreisen während der Embryogenese und im adulten Zellorganismus eine wichtige Rolle. Die bisher *in vitro* erforschten Funktionen zeigen eine weite Bandbreite. Unter anderem ist TGF- β 1 ein stark fibrosierendes Zytokin, das die Bildung einer narbigen Kollagenmatrix stimuliert. ⁷⁷
- *Epidermal Growth Factor* stellt ein Polypeptid dar, für das eine unterstützende Funktion bei der Heilung von chronischen Wunden und Ulcera beschrieben ist. Es stimuliert unter anderem die Differenzierung und das Wachstum mehrerer Zelltypen, inhibiert die Apoptose unter hypoxischen Bedingungen und begünstigt die Reepithelialisierung. ⁷⁹
- Von aktivierten Thrombozyten ausgeschütteter PDGF ist essentiell für die Stimulation der Zellproliferation und -migration der mesenchymalen Zellreihe. Somit ist PDGF wichtig für die Narbenbildung, kann aber auch zur Entstehung von fibroproliferativen Erkrankungen wie der Arteriosklerose beitragen. ^{71,75}

Darüber hinaus kann in PRF eine erhöhte Bindung von aktivierten Thrombozyten an neutrophile Granulozyten und Monozyten beobachtet werden. Im Zuge dessen wird auch die Aktivierung und Degranulation von Leukozyten gefördert.⁸¹ Dohan et al. konnten zeigen, dass während der Herstellung des PRF die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4 aus Leukozyten anregt wird.⁷⁸

Neben den Thrombozyten nehmen auch Leukozyten während der Wundheilung eine wichtige Stellung ein. Ihre vielfältigen Funktionen werden in aktuellen Studien immer deutlicher.⁸² Zum Beispiel tragen neutrophile Granulozyten zum Wunddebridement bei, indem sie verschiedene Proteasen sezernieren. Darunter findet sich unter anderem auch die Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9).⁸³ Die Matrix-Metalloproteasen sind eine Familie von Proteasen, die an Umbauprozessen der Extrazellulärmatrix beteiligt sind.⁸⁴ Neutrophile Granulozyten, die MMP9 exprimieren, werden beispielsweise von VEGF-A rekrutiert und fördern so indirekt die Revaskularisierung von Gewebdefekten.⁸³

Das PRF ist demnach sowohl mit aktivierten Thrombozyten als auch Leukozyten angereichert, die vermehrt Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine sezernieren. Dadurch werden regenerative Prozesse wie die Formation von Granulationsgewebe und die Neubildung von Blutgefäßen vermittelt.

Die Wachstumsfaktoren, die durch das PRF exprimiert werden, können die Differenzierung und Funktion von Zellen wie primären Osteoblasten (POBs) modulieren. Für POBs, die zusammen mit flüssigem PRF kultiviert wurden, konnte eine erhöhte Genexpression von BMP-2 und Alkalischer Phosphatase (ALP) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PRF beobachtet werden.⁸⁵ ALP ist ein Enzym, das eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielt. Es lässt sich als osteogener Marker bestimmen.⁸⁶ Wie bereits erwähnt wirkt BMP-2 osteoinduktiv und trägt somit entscheidend zur Osteogenese bei. Für VEGF und BMP-2 sind zudem synergistische Effekte in Bezug auf die Angiogenese beschrieben.⁸⁵

Bei der Kombination von Fibrinmatrices und BMP konnten bereits proangiogenetische, hämostatische und osteoinduktive Eigenschaften nachgewiesen

werden.⁸⁷ Kawamura et Urist beschreiben, dass BMPs bei einer intramuskulären Transplantation zusammen mit Fibrin signifikant verstärkt aus dessen Netz freigesetzt werden. Durch die Kombination von BMP und Fibrin zeigte sich in ihrer Arbeit dadurch eine gesteigerte Induktion von Knochenformationen.⁸⁸

Ähnliche Effekte wurden in diversen weiteren Studien beobachtet. Ling He et al. konnten zeigen, dass leukozytenreiches PRF zur Differenzierung und Proliferation von verschiedenen Zellen, wie zum Beispiel Rattenosteoblasten, beiträgt.⁸⁹ In einer Studie von Choukroun et al. wurde PRF zusammen mit gefriergetrocknetem Allograft des Knochens in einer Sinuslift-Operation verwendet. In der histologischen Untersuchung zeigte sich bereits nach 4 Monaten eine Knochenneubildung.⁹⁰

Vorangegangene Arbeiten weisen somit bereits auf einen potenziellen Nutzen des PRF für das Knochen-Tissue-Engineering hin.

1.8.1 Low Speed Centrifugation Concept

Durch seine Eigenschaften bietet PRF die Voraussetzungen, es zur kontrollierten Bereitstellung für Wachstumsfaktoren und Zytokine zu benutzen. Insbesondere die Herstellung mittels einfacher, langsamer Zentrifugation scheint zur Aktivierung der regenerativen Prozesse beizutragen. Im Zuge dieser These reduzierten Ghanaati et al. die relative Zentrifugalbeschleunigung (RCF) bei der Produktion des PRF in einem Spektrum von 710g bis auf 44g. Durch das *Low Speed Centrifugation Concept* (LSCC) konnten die Konzentration an Thrombozyten und Leukozyten in der PRF-Matrix und die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren deutlich erhöht werden.

⁸² In einem weiteren Versuch das PRF zu verbessern, führten Bagdadi et al. eine systematische Reduktion sowohl der RCF als auch der Zentrifugationszeit durch. Die Ergebnisse zeigten unter anderem eine vermehrte Anreicherung des PRF mit Zellen und Wachstumsfaktoren. Außerdem konnte eine gleichmäßigere Verteilung der Thrombozyten in der PRF-Matrix beobachtet werden. Diese Arbeiten lassen darauf schließen, dass PRF zur kontrollierten Freisetzung von Wachstumsfaktoren verwandt werden kann.⁷⁹

1.9 Fragestellung

BMC und PRF sind zwei verschiedene Ansätze des Tissue Engineering, die zur Regeneration von Knochen- und Weichgewebe geeignet sind. Beide Präparate sind durch einfache Protokolle und eine schnelle Anfertigung gekennzeichnet.

Unabhängig voneinander konnte gezeigt werden, dass sowohl BMC als auch PRF angiogenetische Prozesse und die Vaskularisierung von Geweben fördern.^{85,91}

Durch den Gehalt an Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF und TGF- β , könnte die Kombination von BMC mit PRF zu einem synergistischen Effekt und so zu einer verbesserten Gewebeheilung führen.

In Anlehnung an das *Low Speed Centrifugation Concept* wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche PRF-Matrices hergestellt - ein PRF medium-RCF (208g) und ein PRF low-RCF (60g). In den Vorversuchen wurde das PRF filtriert, um eine potenzielle Graft-versus-Host-Reaktion bei Kombination mit den BMC zu verhindern. Darüber hinaus wurde eine Dosisfindungskurve erstellt, um die optimale Konzentration der flüssigen PRF-Matrices für die Kombination mit den BMC zu finden. Als Kriterium diente diesbezüglich die metabolische Aktivität der BMC in der Zellkultur. Für den ersten Versuchsteil lassen sich daher folgende Fragestellungen formulieren:

- Führt die Filterung des PRF zur Zellfreiheit und somit zur Verhinderung einer Graft-versus-Host-Reaktion bei Kombination mit BMC?
- Welche Konzentration des PRF (5%, 10%, 20%) ist geeignet, um die metabolische Aktivität der BMC in einer Zellkultur zu steigern?

Ziel dieser *in vitro* Untersuchung war es, den Einfluss von PRF auf BMC in Hinblick auf metabolische Aktivität, Apoptose und Expression regenerativ wirksamer Gene zu untersuchen. Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurde mit der zuvor ermittelten Konzentration des PRF low-RCF und PRF medium-RCF gearbeitet. Zum Zeitpunkt dieser Studie lagen für die zwei Herstellungsprotokolle

keine Arbeiten vor, in denen der Gehalt an relevanten Wachstumsfaktoren sowie der Einfluss von beiden PRF-Aufbereitungen auf BMC analysiert wurde. Für das Hauptexperiment ergeben sich daraufhin nachstehende Fragestellungen:

- Welche Wachstumsfaktoren werden in PRF low-RCF und PRF medium-RCF freigesetzt?
- Gibt es quantitative Unterschiede zwischen den freigesetzten Wachstumsfaktoren der zwei PRF-Protokolle und der Serum-Kontrollgruppe?
- Wie ändert sich die zelluläre Aktivität der BMC in Kombination mit PRF im Zeitverlauf (2, 7, 14 Tage)?
- Kommt es durch die Kombination von BMC mit PRF zu einer gesteigerten Expression regenerativ wirksamer Gene?
- Daraus abgeleitet: Könnte die Kombination von BMC mit PRF pro-angiogenetische Prozesse fördern?
- Welchen Einfluss hat PRF auf die Apoptose der BMC?

Die Fragestellungen wurden *in vitro* mittels MTS-Assay (metabolische Aktivität), Realtime PCR (Expression regenerativ wirkender Gene) und Durchflusszytometrie (Apoptose) bearbeitet.

2 Material und Methoden

2.1 Apparaturen und Materialien

Tabelle 2-1: Apparaturen und Materialien

| | |
|--|--|
| 6 Wellplatte | Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland |
| 12 Wellplatte | BD Falcon Inc., Franklin, Lakes, USA |
| 48 Wellplatte | Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland |
| 96 Wellplatte | Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland |
| Eppendorf Cups 1,5 mL | Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland |
| Eppendorf-Pipetten 0,1-10 μ L, 0,5-10 μ L, 2- 20 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L | Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland; Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| Pasteurpipette 3,5 mL | Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen 0,1-10 μ L, | Starlab GmbH, |

| | |
|---|--|
| 1-20µL, 1-100 µL, 1-200 µL, 101-1000 µL | Ahrensburg, Deutschland |
| Pipettierhilfe (elektrisch) | Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland |
| Serologische Pipetten 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL | Sigma-Aldrich Inc., New York und BD Falcon Inc., Franklin Lakes, USA |
| Falcontubes 15mL, 50 mL | Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Insulinspritzen | Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt Deutschland |
| Spritzen 50 mL | Antares GmbH, Hartmannsdorf, Deutschland |
| Inkubator, CO2 | Jouan Inc., Winchester, USA |
| Sicherheitswerkbank | Antares GmbH, Hartmannsdorf, Deutschland |
| Vortex MSI Minishaker | IKA Instruments Inc., Wilmington, USA |
| Wärmebad | GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland |

| | |
|-----------------------------|--|
| Zentrifuge | Hereaus AG, Hanau, Deutschland |
| Biofuge fresco | Agar Scientific Ltd., Essex, UK |
| Gefrierschrank -80°C | Heraeus AG, Hanau, Deutschland |
| Kühlschrank +4°C bis -20°C | Bosch AG, Stuttgart, Deutschland |
| Mikroskop, Axio Observer Z1 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland |
| Einweg-Zählkammer C-Chip | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland |
| Photometer, ELISA-Reader | Infinite M200, Tecan, Grödig, Österreich |
| PCR Thermocycler T-Personal | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Computer (real time PCR) | Fijitsu Siemens B.V., Maarsen, Niederlande |

2.1.1 Zellen

Tabelle 2-2: Zellen

| | |
|---------------------|---|
| Knochenmarkaspirate | Deutsches Rotes Kreuz DRK-Blutspendedienst, Baden- Württemberg/Hessen gGmbH Frankfurt am Main, Deutschland |
|---------------------|---|

2.1.2 Platelet rich fibrin

Tabelle 2-3: Materialien zur Herstellung von Platelet rich fibrin

| | |
|------------------------|--|
| PRF Duo® Zentrifuge | Process for PRF, Nizza, Frankreich |
| 10 mL i-PRF® Röhrchen | Process for PRF, Nizza, Frankreich |
| Vacutainer Butterfly | Process for PRF, Nizza, Frankreich |
| Minisart Filter 0,2 µm | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Einmalspritzen 5 mL | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Einmalkanüle 21 G | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |

2.1.3 Nährmedien

Tabelle 2-4: Nährmedien

| | |
|---|--|
| Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| MesenCult + Supplements | Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada |

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-5: Puffer und Lösungen

| | |
|---|--|
| Accutase | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Aceton 100% | Merck AG, Darmstadt, Deutschland |
| Aqua dest. | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Biocoll Separating Solution (Ficoll) | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland |
| Dulbecco's phosphate buffered saline with calcium chloride and magnesium chloride (PBS +/-) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |

| | |
|--|---|
| Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride (PBS w/o) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich |
| Erythrozyten Lysing Solution | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Ethanol, 100%, 96% (EtOH) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| MTS Assay | CellTiter 96® AQueuos, Promega, Mannheim, Deutschland |

2.1.5 Zellfärbung

Tabelle 2-6: Materialien zur Zellfärbung

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| Türcks-Lösung | Merck AG, Darmstadt, Deutschland |
|---------------|-------------------------------------|

2.1.6 ELISA

Tabelle 2-7: Materialien ELISA

| | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Human VEGF DuoSet ELISA | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Human IGF-1 DuoSet ELISA | |
| Human sICAM-1 DuoSet ELISA | |
| Human TGF- β 1 DuoSet ELISA | |

2.1.7 RT-PCR

Tabelle 2-8: Materialien RT-PCR

| | |
|---|-------------------------------------|
| RNeasy Mini Kit | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland |
| RNase-Free DNase Set | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland |
| AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit | Stratagene Corp., La Jolla, USA |
| RT ² qPCR Primer Assay for Human RT ² qPCR SYBR Green/ROX Master Mix-24 | |

| | |
|---|---|
| MMP2 (NM 004530) MMP7 (NM 002423) MMP9 (NM 004994) ICAM1 (NM 000201) TGF- β 1 (NM 000660) BCL2 (NM 000633) BAX (NM 004324) ALP (NM 000478.4) COL1A1 (NM 000088.3) FGF23 (NM 020638.2) SPP1 (NM 000582.2) GAPDH (NM 002046.3) | SA Biosciences, Qiagen, Frederick, MD, USA |
| Photometer NanoDrop ND-1000 | NanoDrop technologies, Wilmington, Delaware, USA |
| Realtime Thermocycler, Mx3005p | Stratagene Corp., La Jolla, USA |

2.1.8 Apoptose

Tabelle 2-9: Materialien Apoptose

| | |
|-----------------------------------|--|
| Durchflusszytometer FACScalibur | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |
| Annexin V Apoptosis Detection Kit | BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland |

2.2 Methoden

2.2.1 Ansätze

In den Vorversuchen wurde der Effekt von unterschiedlichen Dosierungen des PRF low-RCF und PRF medium-RCF auf die metabolische Aktivität der BMC getestet, um eine Dosisfindungskurve herstellen zu können.

Anschließend wurde der Einfluss der zwei PRF-Arten auf die BMC überprüft. Als Kontrollgruppe diente die Aussaat der BMC in Medium supplementiert mit Humanserum.

2.2.2 Ethik

Für die Isolierung der humanen BMC wurden freundlicherweise anonymisierte Knochenmarkaspiratrestproben vom DRK-Blutspendedienst Deutsches Rotes Kreuz Baden-Württemberg/Hessen gGmbH in Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Verwendung dieser Proben für Forschungszwecke ist durch das Ethik-Votum 329/10 des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität gedeckt. Die Blutproben für die Herstellung des PRF und des Humanserums wurden von gesunden, freiwilligen Probanden gespendet, basierend auf ihrer Einwilligung nach erfolgter Aufklärung. Die Verwendung der Blutproben wurde durch die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Ethik-Votum 68/17, genehmigt.

2.2.3 Isolierung von BMC

Die Isolation wurde gemäß des Isolationsprotokolls von Assmus et al.⁹² und Seebach et al.⁴⁰ durchgeführt. Das Knochenmarkaspirat wurde aus EDTA-Röhrchen in ein Falcon Tube überführt und 1:1 mit Phosphatgepufferter Salzlösung

(PBS w/o) verdünnt. Danach wurde ein äquivalentes Volumen Ficoll (Dichte: 1.077 g/cm³, Biochrom, Berlin) mit der verdünnten Knochenmarkprobe überschichtet und anschließend bei 800 g und Raumtemperatur für 20 Minuten zentrifugiert. Die dadurch entstandene Interphase und der Überstand wurden mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt, um die mononukleären Zellen zu isolieren. Überschüssige Ficoll-Reste wurden abgewaschen, indem die abgesaugte Phase mit 25 mL PBS w/o verdünnt und bei 800 g und Raumtemperatur für 8 Minuten erneut zentrifugiert wurde.

Das Zellpellet wurde in 1 mL MesenCult+Suppl. resuspendiert. Für die Zellzählung wurden 25 µL Zellsuspension mit 50 µL vorgewärmtem Erythrozyten-Lysepuffer im Wasserbad bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 25 µL Türcks-Lösung hinzugegeben und 10 µL dieser Zellsuspension in eine Einweg-Zählkammer der Biochrom GmbH C-Chip überführt. Die Zellen wurden am Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl entsprechend folgender Gleichung berechnet:

Ausgezählte Zellen x 40.000 = Zellzahl / ml

2.2.4 Isolierung von PRF low-RCF und PRF medium-RCF

Basierend auf dem *Low Speed Centrifugation Concept* von Choukroun, Ghanaati, et al.⁸² wurden zwei unterschiedliche Zentrifugationsgeschwindigkeiten zur Herstellung des PRF genutzt. So wurde bei niedrigeren Umdrehungen das PRF low-RCF und bei höheren Drehzahlen der Zentrifuge das PRF medium-RCF hergestellt. Die Blutentnahme von den verschiedenen Spendern erfolgte mittels einer sterilen Kanüle in 9-ml i-PRF® Röhrchen (Process for PRF, Nizza, Frankreich). Die Entnahmeröhrchen enthalten keine Zusatzstoffe oder Gerinnungshemmer, sodass eine möglichst zügige Blutentnahme erforderlich war, um eine Gerinnung zu verhindern und eine vollständige Auftrennung in die unterschiedlichen Fraktionen zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Blutproben in einer Duo®-Zentrifuge (Process for PRF, Nizza, Frankreich) zentrifugiert.

Zuerst wurde stets das PRF low-RCF hergestellt. Hierfür wurden die i-PRF® Entnahmeröhrchen bei 60g für 3 Minuten zentrifugiert. Die dabei gebildete rot-

orangefarbene, flüssige Phase wurde mithilfe einer 5ml Spritze mit 21G Nadel isoliert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Analog hierzu wurde das PRF medium-RCF hergestellt. Dazu wurden die Blutproben bei 208g für 8 Minuten zentrifugiert. Der hierbei entstandene gelbe Überstand wurde wiederum mit einer Kanüle abgezogen.

Tabelle 2-10: PRF-Herstellungsprotokoll

| PRF protocol | Rotation (rpm) | Time of centrifugation (min) | (g)-force | Tubes | Radius (mm) | Centrifuge machine |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------|--------------|--------------------|---------------------------|
| PRF low-RCF | 700 | 3 | 60 | Plastic | 110 | Duo centrifuge |
| PRF medium-RCF | 1300 | 8 | 208 | Plastic | 110 | Duo centrifuge |

Um Zellfreiheit zu erreichen und damit eine mögliche Immunreaktion gegenüber den BMC zu verhindern, wurde das PRF direkt nach der Herstellung filtriert. Zu diesem Zweck wurden Minisart® Filter, Porengröße 0,2 µm (Sigma-Aldrich) verwendet.

Die Überprüfung der Zellfreiheit erfolgte initial einmalig mithilfe einer FACS-Untersuchung der filtrierten PRF-Probe.

2.2.5 Isolierung des Serums

Zur Isolierung des Serums wurde ein Standardprotokoll verwendet. Den Blutspendern wurden zusätzlich Serumröhrchen abgenommen und diese bei 800 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum als Zusatz zu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) genutzt.

2.2.6 Proteinquantifizierung mittels ELISA

Der Gehalt an Wachstumsfaktoren in den zwei unterschiedlichen PRF-Matrices wurde mithilfe eines quantitativen Sandwich-ELISA bestimmt. Direkt im Anschluss an die Filtration des PRF wurden 500 µl der Proben in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden 1:1 mit PBS verdünnt und bei -80°C für die weiteren Analysen gelagert. Es wurde der Proteingehalt von IGF-1, löslichem ICAM, TGF-β und VEGF bestimmt. Hierfür wurden entsprechende DuoSet ELISA Kits (R&D Systems, Minneapolis, USA) gemäß den Herstellerangaben verwandt. Die Extinktionsmessung wurde mithilfe eines Microplate Readers (*Infinite*® M200, Tecan, Grögi, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Für die Referenzmessung wurde eine Wellenlänge von 570 nm genutzt.

2.2.7 Aussaat der Zellen

Für die Dosisfindungskurve wurden jeweils drei 48-Well-Platten (1,5 cm³/Well) (Nunc, Wiesbaden, Deutschland, siehe Tabelle 2-11) für Messungen an Tag 2, Tag 7 und Tag 14 vorbereitet. Dazu wurden zuerst 2×10^5 BMC in 500 µL DMEM mit je 5%, 10% oder 20% Serum versetzt. Für die zweite Gruppe wurde die gleiche Zellzahl in 500 µL mit je 5%, 10% oder 20% gefiltertem PRF low-RCF als Zusatz ausgesät. Analog hierzu wurde mit dem PRF medium-RCF verfahren. Als Kontrolle diente jeweils ein Well mit 2×10^5 Zellen in 500 µL Medium. Die Well-Platten wurden anschließend bei 37° im Brutschrank für 2, 7 und 14 Tage inkubiert. Nach der Aussaat gerann der PRF/Zellkomplex in etwa innerhalb von einer Stunde.

Tabelle 2-11: Aussaat der Zellen für die Dosisfindungskurve

| Serum / PRF low-RCF / PRF medium-RCF | | |
|--------------------------------------|---|--|
| 20 % | BMC 2×10^5 cells in 400 μ l DMEM | 100 μ l Human Serum / PRF low-RCF / PRF medium-RCF |
| 10% | BMC 2×10^5 cells in 450 μ l DMEM | 50 μ l Human Serum / PRF low-RCF / PRF medium-RCF |
| 5% | BMC 2×10^5 cells in 475 μ l DMEM | 25 μ l Human Serum / PRF low-RCF / PRF medium-RCF |

Der Dosisfindung entsprechend wurde im zweiten Versuchsteil ein PRF- und Serumanteil von 10% für alle weiteren Versuche angewandt.

2.2.8 Nachweis der metabolischen Aktivität der BMC (MTS-Assay)

Die Messungen zur metabolischen Aktivität wurden jeweils an Tag 2, Tag 7 und Tag 14 durchgeführt.

Um die metabolische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen Zusätzen zu bestimmen, wurde das MTS-Assay (CellTiter 96® AQueuos, Promega, Mannheim, Deutschland) benutzt.

Das Prinzip des MTS-Assays beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) zusammen mit Phenazinmethosulfat in das violette, wasserunlösliche Formazan mit einem Absorptionsmaximum bei 490 nm in PBS durch metabolisch aktive Zellen. Diese Reduktion ist in erster Linie von den Pyridinnukleotiden NADH und NADPH abhängig. Die Menge des umgesetzten Farbstoffes entspricht daher der Glykolyserate der Zellen.

Für die MTS-Messung wurden jeweils doppelte Ansätze genutzt. Die BMC wurden wie oben beschrieben ausgesät und mit den jeweiligen Zusätzen für 2, 7 und 14 Tage inkubiert. Im Anschluss wurden 80 μ l des MTS-Reagenz zu 400 μ l Zellkultur

gegeben und für mindestens eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes in eine neue 96-Well-Platte transferiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm mittels eines Microplate Readers (*Infinite*® M200, Tecan, Grögi, Österreich) gemessen.

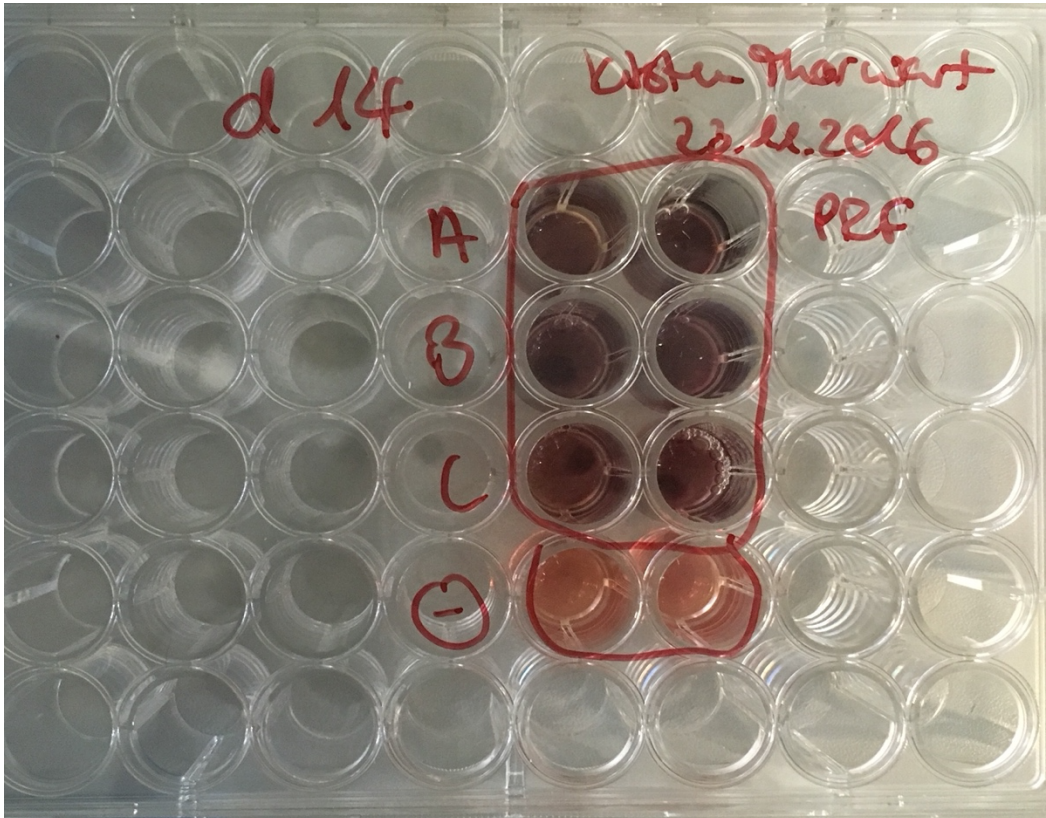


Abbildung 2-1: Zellaussaat für das MTS-Assay nach 14 Tagen Inkubation

Es ist die Zellaussaat in Vorbereitung für das MTS-Assay nach 14 Tagen Inkubation gezeigt. Gruppe A: Zusatz von PRF low-RCF. Gruppe B: Zusatz von PRF medium-RCF. Gruppe C: Zusatz von humanem Serum. Unten: DMEM ohne Zusatz von Zellen.

2.2.9 Nachweis zelltypspezifischer Genexpression mittels RT-PCR

Zur Analyse des Einflusses von BMC auf PRF wurde die Genexpression von anti-inflammatorisch, pro-angiogenetisch und regenerativ wirkenden Genen untersucht. Hierfür wurden erneut Messungen der Proben an Tag 2, Tag 7 und Tag 14 durchgeführt.

Der Überstand der Zellkulturen wurde vollständig entnommen und in ein steriles Falcon-Röhrchen (15 ml) transferiert. In die Wells wurden anschließend jeweils 350 µl *RLT-Lyse-Puffer* + 1% β-Mercaptoethanol gegeben und diese für ca. 5 Minuten inkubiert. Die Falcon-Röhrchen wurden bei 800 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand wurde nun abpipettiert und in Cryoröhrchen gefüllt. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde mit dem RLT-Puffer aus den Wells resuspendiert und ebenfalls in Cryoröhrchen transferiert. Die DNA der lysierten Zellen wurde nun mit einer Insulinspritze drei bis vier Mal geschert. Das dadurch erstellte Zelllysat wurde entweder direkt zur RNA-Isolierung genutzt oder zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.10 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung mit DNase-Verdau wurde mit Hilfe des *RNeasy-Mini Kit* der Firma Qiagen durchgeführt.

Zu den zuvor hergestellten 350 µl RNA-Lysaten wurden zunächst 350 µl EtOH (70%) gegeben, gut durchmischt und dann auf eine RNeasy-Säule übertragen. Diese wurden dann für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat verworfen und das Sammelgefäß beibehalten. Nun wurden 350 µl Puffer *RW1* hinzugegeben und das Gemisch erneut für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Danach wurde erneut nur das Eluat verworfen. Um kontaminierende DNA zu entfernen, folgte der DNase Verdau auf der Membran des *Rneasy mini spin*. Hierzu wurde im Vorfeld eine *DNase Stock-Lösung* aus *DNase Lyophilisat* und 550 µl RNase-freiem Wasser bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch wurden dann pro Probe 10 µl *DNase-Stock-Lösung* aufgetaut und mit 70 µl *RDD Puffer* versetzt. Für den DNase Verdau wurden von diesem Gemisch 80 µl auf die Mitte der *Rneasy silica-gel* Membran gegeben und zusammen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl *RW1 Puffer* hinzugegeben und das Gemisch bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das *Rneasy Mini spin* in ein neues *collection tube* gestellt und 500 µl *RPE Puffer* hinzugegeben. Dies wurde erneut bei 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Daraufhin wurden 500 µl *RPE*

Puffer hinzugegeben und das Gemisch für 2 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend auf ein neues Sammelgefäß gestellt und es wurden 25 – 50 µl DEPC-Wasser (DEPC = Diethyl-Pyrocarbonat = RNase-Inhibitor) direkt auf die Säulenmembran pipettiert. Die Menge des DEPC-Wasservolumen wurde abhängig von der erwarteten RNA-Menge gewählt (wenig Zellen (< 100.000) = 25 µl DEPC-Wasser, viele Zellen (> 100.000) = 50 µl DEPC-Wasser). Das DEPC-Wasser wurde für 2 Minuten inkubiert und anschließend 1 Minute bei 8.000 g zentrifugiert. Das Eluat, das die RNA enthält, wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nachfolgend wurde die Menge der RNA mit einem *NanoDrop* ND-1000 Gerät gemessen. Erfolgte die cDNA-Synthese direkt im Anschluss, wurden die Proben auf Eis gelagert. Anderenfalls wurden sie bis zur Verwendung bei -80°C verwahrt.

2.2.11 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* von Stratagene benutzt. Es wurden pro Probe 10 µl Master Mix, 3 µl Oligo DT Primer und 1 µl Affinity Script RT in ein 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Der Master Mix enthält neben einem Puffer Magnesiumchlorid sowie dNTPs. Das Affinity Script RT enthält unter anderem eine hitzestabile Reverse Transkriptase.

Zu dem Gemisch wurden jeweils 6 µl der zuvor isolierten RNA pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden zum Mischen kurz herunterzentrifugiert und anschließend zur Inkubation in den Thermocycler gestellt. Dort durchliefen die Proben eine Sequenz von 5 Minuten bei 25°C, anschließend 15 Minuten bei 42°C und zum Schluss 5 Minuten bei 95°C. Die Proben wurden nun entweder auf Eis gelagert und für eine Realtime PCR verwendet oder bei -80°C zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.2.12 Realtime PCR

Für die Realtime PCR wurden verschiedene Primer aus dem RT² qPCR Primer Assay sowie der RT² qPCR SYBR Green/ROX Master Mix-24 von Qiagen

verwendet. Zuerst wurde stets ein Primer-MIX Ansatz hergestellt. Dafür wurden pro Probe 12,5 µl SYBR Green Mix mit 6,5 µl aqua dest. und 1,0 µl des jeweiligen Primers vermischt. Anschließend wurde ein c-DNA-MIX Ansatz vorbereitet, indem 3,0 µl aqua dest. zu 2,0 µl der jeweiligen cDNA pipettiert wurden. Diese beiden Ansätze wurden dann in PCR-8-fach-Röhrchenstreifen auf vorgekühlten Metall-Well-Platten pipettiert. Daran schloss sich die Amplifikation mittels eines *Stratagene MX 3005p qPCR Systems* an. Hier erfolgte der PCR-Prozess mit einem Zyklus für 10 Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen über 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C. Die Software berechnete am Ende den sogenannten Ct-Wert (cycle threshold). Dieser beschreibt den Zeitpunkt in der PCR, an dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrund ansteigt und somit den Beginn der exponentiellen Phase. Durch eine Schmelzkurvenanalyse wurde im Anschluss die Spezifität der PCR bestimmt.

Um die Genexpression quantifizieren zu können, wurde eine Berechnung nach der delta-Ct-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Genexpression des *gene of interest* (GOI) in Bezug zu der Genexpression des Haushaltsgens GAPDH gesehen:

$$\text{GOI} = 2^{-\text{(cT GOI - cT GAPDH)}}.$$

2.2.13 Bestimmung der Apoptoserate

Zusätzlich wurde die Apoptoserate der BMC nach Zusatz der unterschiedlichen Testsubstanzen per Annexin-V-Färbung mit Hilfe des *FITC Annexin V apoptosis detection Kits* von BD-Biosciences bestimmt. Der Mechanismus der Annexin V Färbung beruht auf dem Verlust der Struktur von Plasmamembranen während der Apoptose. Das negativ geladene Phosphatidylserin, das sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembranen findet, wird während des programmierten Zelltodes auf die Außenseite transloziert. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Durch die Kombination von Annexin V mit fluoreszierenden Farbstoffen wie FITC (Fluoresceinisothiocyanat) kann somit

die Rate an apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Da sich FITC-Annexin V allerdings auch an die Innenmembran von nekrotischen Zellen heftet und somit nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden kann, wird die FITC-Annexin V Färbung typischerweise mit einer Propidiumiodidfärbung (PI) oder wie in unserem Fall mit 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) kombiniert. 7-AAD färbt nur beschädigte oder tote Zellen ohne intakte Zellmembran an. Dementsprechend sind zum Beispiel Zellen im Frühstadium der Apoptose Annexin V-positiv und 7-AAD-negativ, wohingegen nekrotische Zellen Annexin V-positiv und 7-AAD-positiv sind.

Die Apoptose der BMC nach Zusatz von PRF low-RCF, PRF medium-RCF oder Serum wurde an Tag 2 und Tag 7 beurteilt. Zuerst wurden die freien BMC durch eine Behandlung mit *Accutase* von den anhaftenden Zellen getrennt. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ μL in Annexin V Binding Puffer resuspendiert. 100 μL der Lösung wurden in ein 5 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 5 μL FITC Annexin V und 5 μL 7-AAD versetzt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden 400 μL Binding Puffer hinzugegeben und die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Hauptzellpopulationen wie Lymphozyten und Monozyten konnten durch ihre typischen Eigenschaften (Forward Scatter und Side Scatter) identifiziert werden.

2.2.14 Statistik

Zur Beschreibung der Ergebnisse wurden Boxplots mit Darstellung der Mediane und der Interquartilsabstände (Median / 25%-Quartil / 75%-Quartil) als Streuungsmaß eingesetzt. Um statistische Signifikanzen zwischen den Gruppen und die Veränderungen während der Follow-up Periode (Tag 2 versus Tag 7 versus Tag 14) zu analysieren wurde ein Kruskal-Wallis Test genutzt. Ergaben sich signifikante Unterschiede, wurde auf diese Gruppen zusätzlich der multiple Dunn's post hoc Test (Bonferroni-Holm korrigiert) angewandt. Ein p-Wert < 0.05 galt hierbei als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Überprüfung der Zellfreiheit des PRF

Um einer möglichen Immunreaktion der BMC gegenüber Zellen im PRF vorzubeugen, wurde das PRF direkt nach der Herstellung filtriert. Zur Sicherstellung der Zellfreiheit wurde im Vorfeld eine FACS-Messung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass durch den 0,2µm Filter nahezu Zellfreiheit erlangt werden kann (siehe Abbildung 3-1).

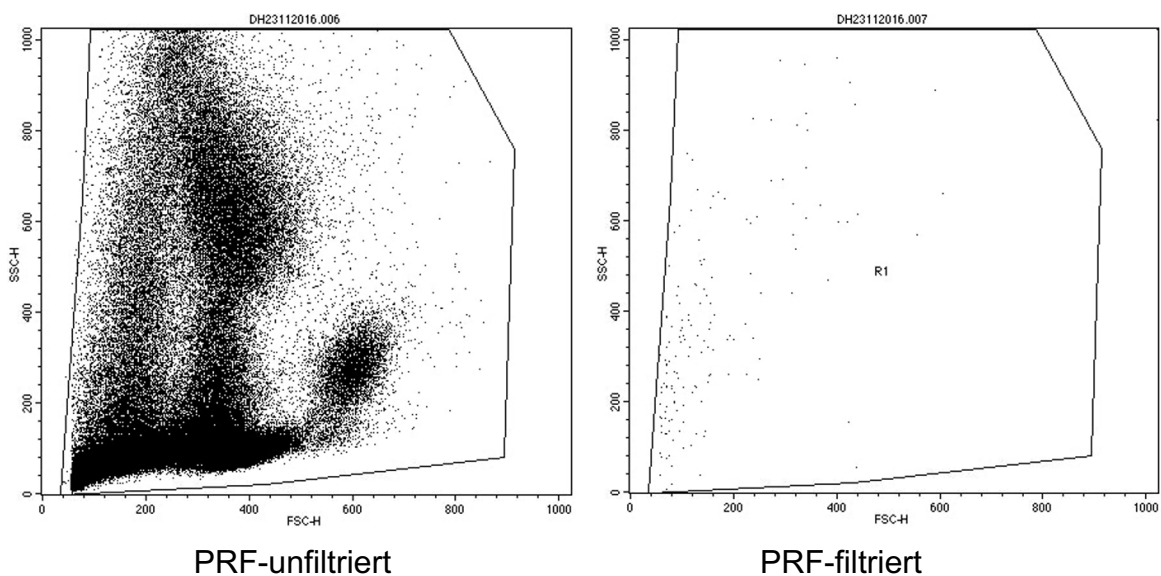


Abbildung 3-1: FACS-Messung zur Überprüfung der Zellfreiheit des PRF nach Filtrierung

Filtrierung mittels eines 0,2µm Filters. Die Proben wurden jeweils für 5 Minuten gemessen. In diesem Zeitraum wurden in der ungeteilten Probe 175.950 Ereignisse registriert, in der gefilterten Probe jedoch nur 154 Ereignisse. Dies entspricht einer Abreicherung von 99,91% durch die Filtration.

3.1.2 Dosisfindungskurve

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des PRF, die sich für eine Kombination mit den BMC eignet, wurde eine Dosisfindungskurve erstellt. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss ansteigender PRF-Konzentrationen (5%, 10%, 20%) auf die metabolische Aktivität der BMC in einer Zellkultur nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Sowohl die PRF-Gruppen als auch die Serum-Kontrollgruppe reagierten auf höhere Konzentrationen der Zusätze mit einer Steigerung der metabolischen Aktivität (siehe Abbildung 3-2). Es zeigte sich ein Trend zu erhöhten Werten bei einer Konzentration von 10%. Der höchste Median des Lebendzellanteils konnte beim Zusatz von 10% PRF low-RCF beobachtet werden. Die metabolische Aktivität wurde durch höhere PRF-Konzentrationen nicht weiter gesteigert. Aufgrund dieser Ergebnisse setzten wir für alle weiteren Experimente eine Konzentration von 10% ein.

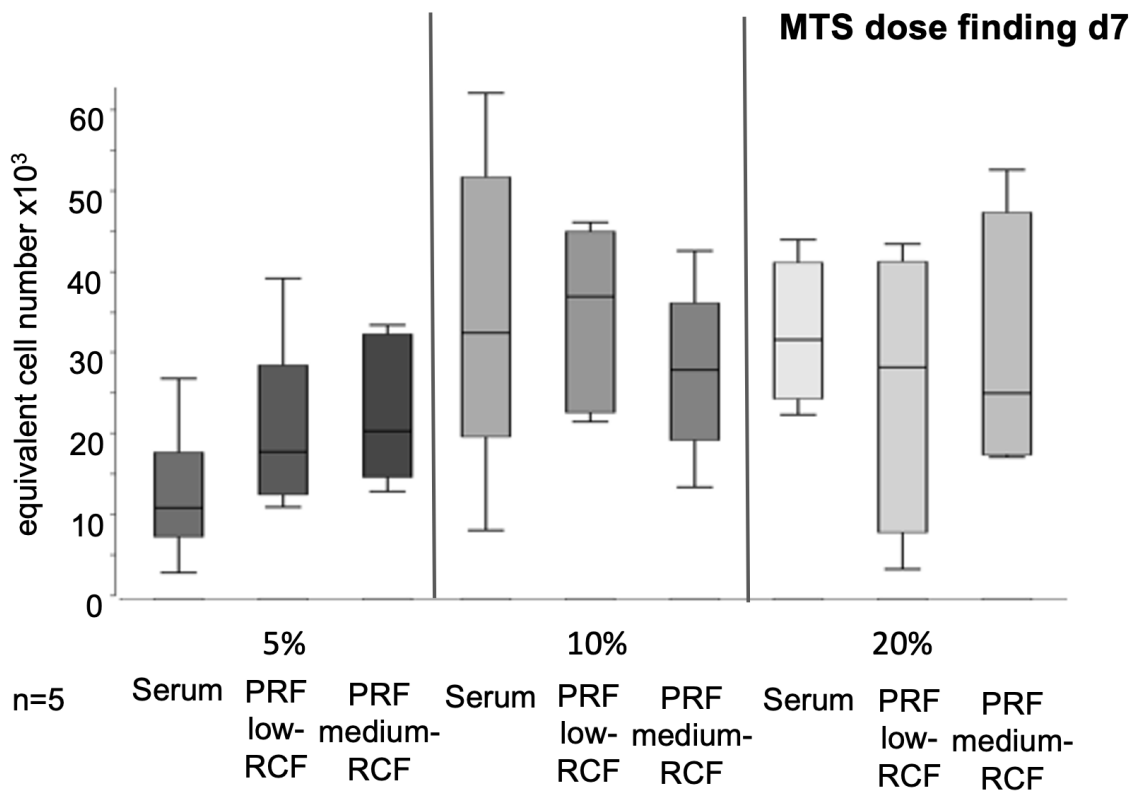


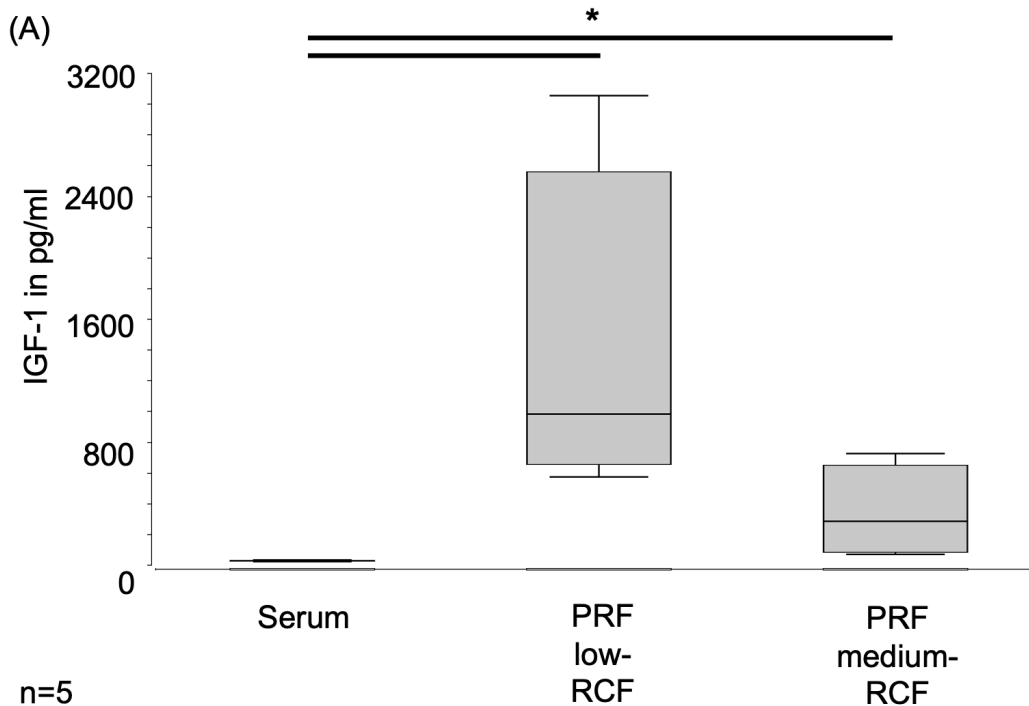
Abbildung 3-2: Dosisfindungskurve mittels MTS-Assay

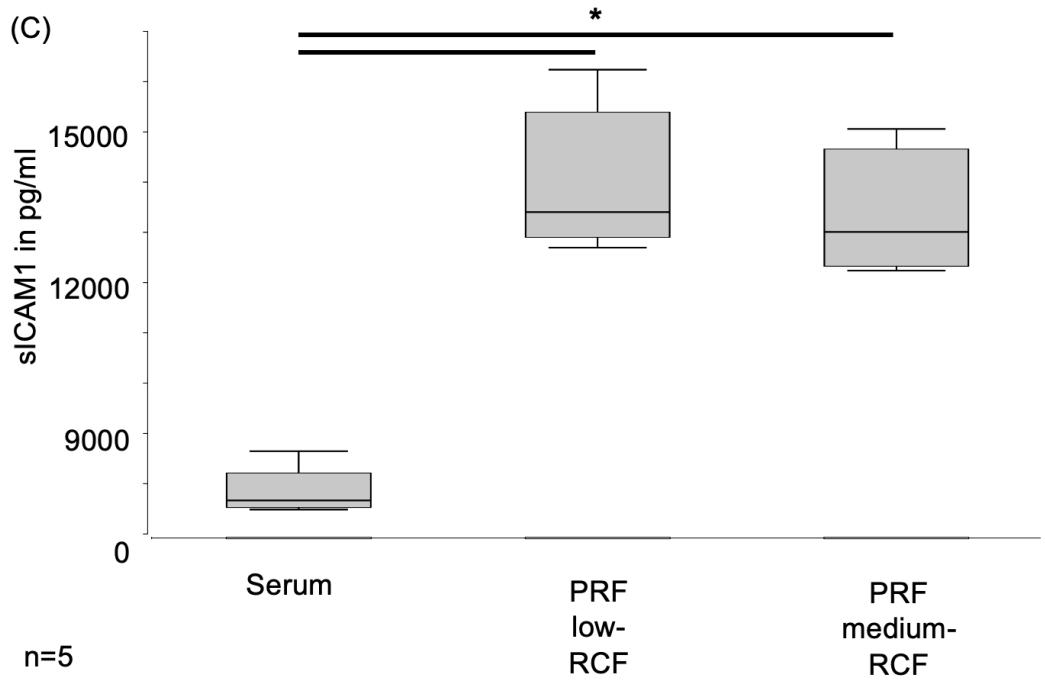
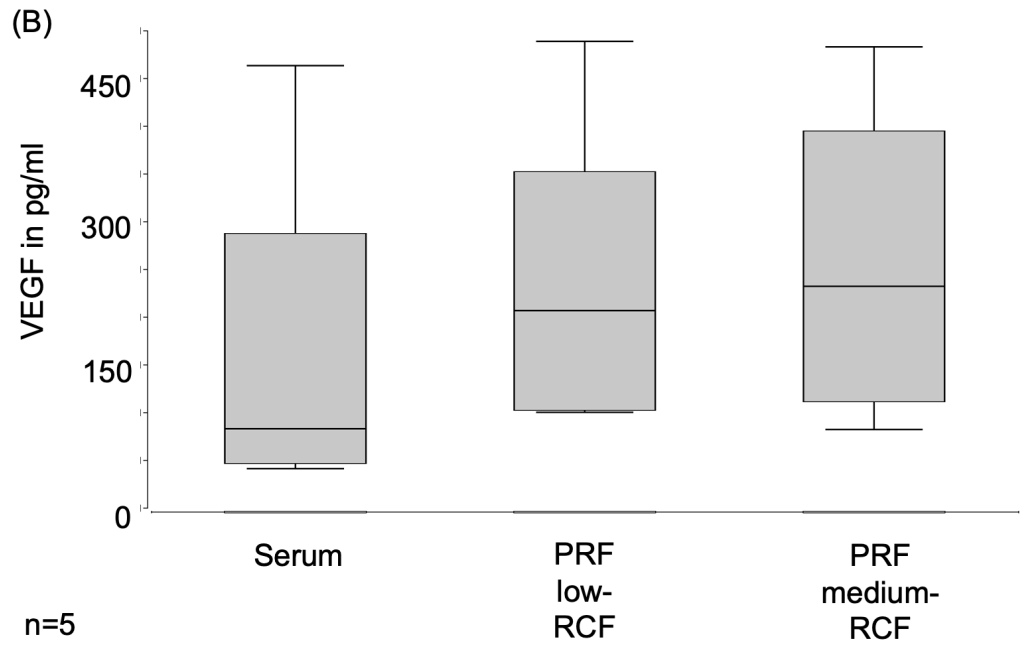
Es sind Boxplots des Medians gezeigt (n=5). Auf der y-Achse ist das metabolische Äquivalent der BMC aufgetragen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Materialien in den verschiedenen Dosierungen dargestellt. Die Dosisfindungskurve wurde mittels MTS-Assay, wie in Material und Methoden (2.2.8) beschrieben, bestimmt. Der höchste Median des Lebendzellanteils der BMC konnte bei einem Zusatz von 10% PRF low-RCF beobachtet werden. Eine höhere PRF-Konzentration bewirkte keine weitere Steigerung der metabolischen Aktivität.

3.2 Hauptversuch

3.2.1 Charakterisierung des PRF

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen PRF-Aufbereitungen wurde die Konzentration an Wachstumsfaktoren in dem PRF im Vergleich zum Serum bestimmt. Aufgrund dessen wurden von 5 Spendern zusätzliche Proben entnommen. Die Messungen wurden direkt im Anschluss an die Zentrifugation und Filtrierung des PRF durchgeführt. Mittels ELISA wurde der Gehalt von IGF-1, sICAM-1, TGF- β und VEGF quantifiziert. Es fand sich eine signifikant höhere Konzentration von IGF-1 und sICAM-1 im PRF low-RCF und PRF medium-RCF im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterhin konnte eine statistisch relevante Erhöhung der TGF- β -Konzentration im PRF low-RCF gegenüber PRF medium-RCF festgestellt werden. Im Vergleich zur Serum-Kontrollgruppe zeigte sich allerdings keine bedeutende Erhöhung. Der Gehalt an VEGF wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (siehe Abbildung 3-3).





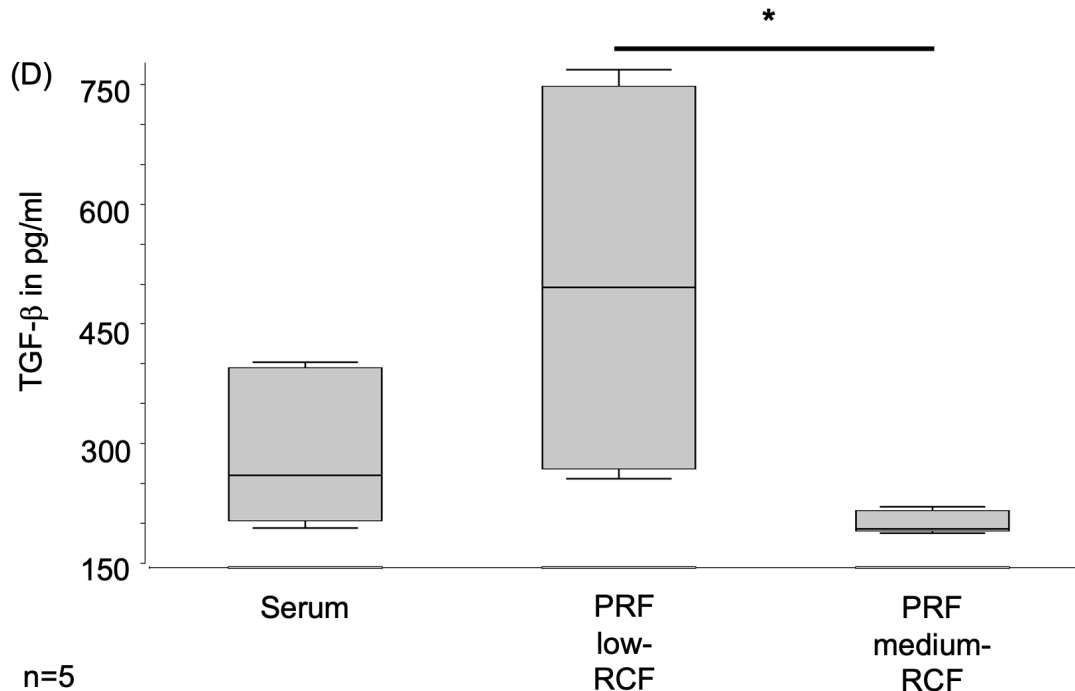


Abbildung 3-3: Charakterisierung der PRF-Matrices per ELISA.

Es sind Boxplots des Medians gezeigt (n=5). Auf der y-Achse sind die Konzentrationen des jeweiligen Wachstumsfaktors in pg/ml dargestellt. Die x-Achse beschreibt die unterschiedlichen Materialien. Die Proteinquantifizierung mittels ELISA erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.6) beschrieben. IGF-1 Konzentration (A) in Serum, PRF low-RCF und PRF medium-RCF. Signifikant gesteigerte Konzentration von IGF-1 in PRF low-RCF und PRF medium-RCF gegenüber Serum. * $p < 0.05$ versus Serum. Keine signifikanten Unterschiede bezüglich des VEGF-Gehaltes (B). Signifikant erhöhter Gehalt von sICAM-1 (C) in beiden PRF-Matrices gegenüber der Serum-Kontrollgruppe. * $p < 0.05$ versus Serum. Statistisch signifikant gesteigerte TGF- β -Konzentration (D) in PRF low-RCF im Vergleich zu PRF medium-RCF. * $p < 0.05$ versus PRF medium-RCF.

3.2.2 Einfluss von PRF auf die metabolische Aktivität der BMC

Die BMC wurden jeweils mit 10% Serum, PRF low-RCF oder PRF medium-RCF in einer Kultur für 2,7 und 14 Tage inkubiert. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mithilfe des MTS-Tests evaluiert. Dabei zeigte sich in allen Gruppen eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität im Zeitverlauf über 14 Tage im Vergleich zu Tag 2 und 7. Der Zusatz von Serum induzierte zudem eine signifikant gesteigerte metabolische Aktivität in den BMC im Vergleich zu Tag 7 der Gruppe mit PRF medium-RCF. (siehe Abbildung 3-4).

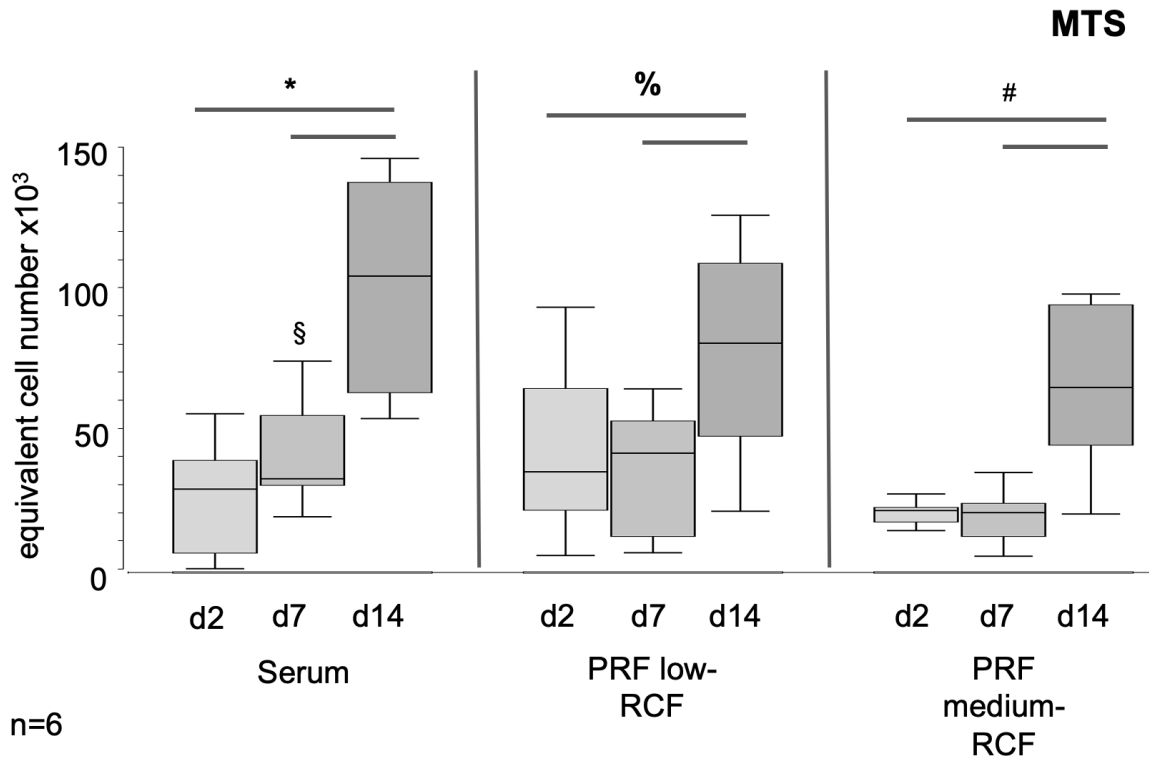


Abbildung 3-4: Nachweis der metabolischen Aktivität der BMC nach Kultivierung mit 10% Serum, 10% PRF low-RCF und 10% PRF medium-RCF in DMEM Medium über 14 Tage.

*Es sind Boxplots des Medians gezeigt (n=6). Auf der y-Achse ist das metabolische Äquivalent der BMC aufgetragen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Materialien nach jeweils 2, 7 und 14 Tagen Inkubation dargestellt. Die Analyse der metabolischen Aktivität der BMC erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.8) erläutert. Signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität der BMC in allen Gruppen an Tag 14. * $p < 0.05$ versus Serum Tag 2 und Tag 7. % $p < 0.05$ versus PRF low-RCF Tag 2 und Tag 7. # $p < 0.05$ versus PRF medium-RCF Tag 2 und Tag 7. Signifikant erhöhte metabolische Aktivität in der Serum-Gruppe gegenüber PRF medium-RCF Tag 7. § $p < 0.05$ versus PRF medium-RCF Tag 7.*

3.2.3 Genexpression in BMC bei Kombination mit PRF

Mithilfe einer Realtime PCR wurde die Genexpression in den BMC bei Kultivierung mit PRF im Vergleich zu Humanserum analysiert. Dazu wurden Messungen an drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (Tag 2,7,14).

3.2.3.1 TGF- β -Genexpression

TGF- β spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Zellen und Geweben. Wir konnten zeigen, dass die Genexpression von TGF- β durch eine Veränderung der relativen Zentrifugalbeschleunigung im PRF-Herstellungsprotokoll hochreguliert werden kann. In Kultur mit PRF low-RCF konnte eine signifikante Steigerung der TGF- β Genexpression in BMC an Tag 7 im Vergleich zu Tag 2 beobachtet werden. Diese Steigerung fand sich ebenfalls im Vergleich zu Tag 2 der Serum-Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu zeigten sich in der PRF medium-RCF Gruppe keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von TGF- β , weder im Zeitverlauf noch verglichen mit der Serum-Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3-5).

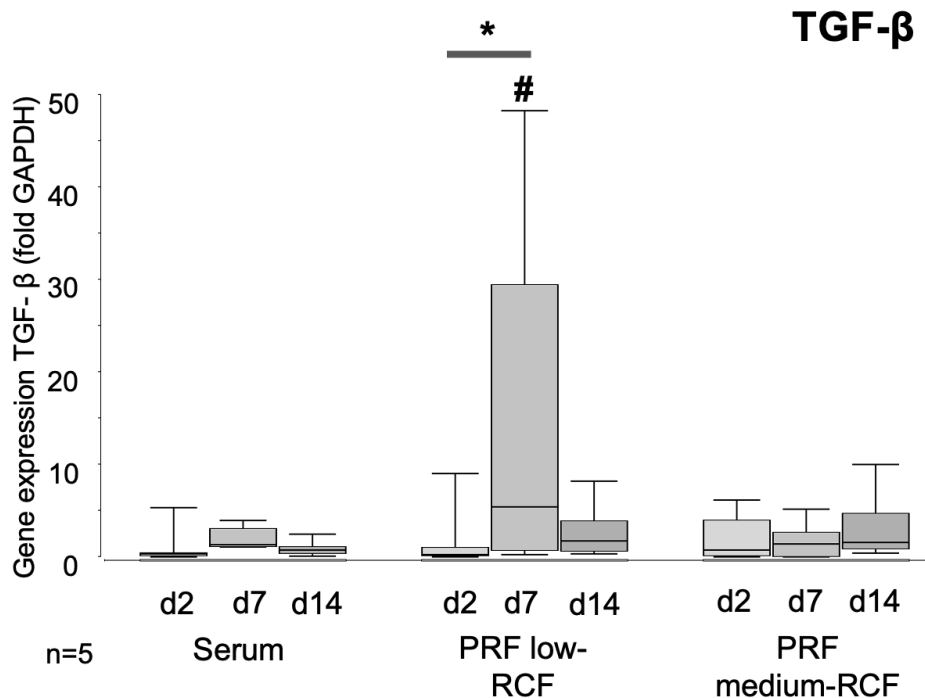
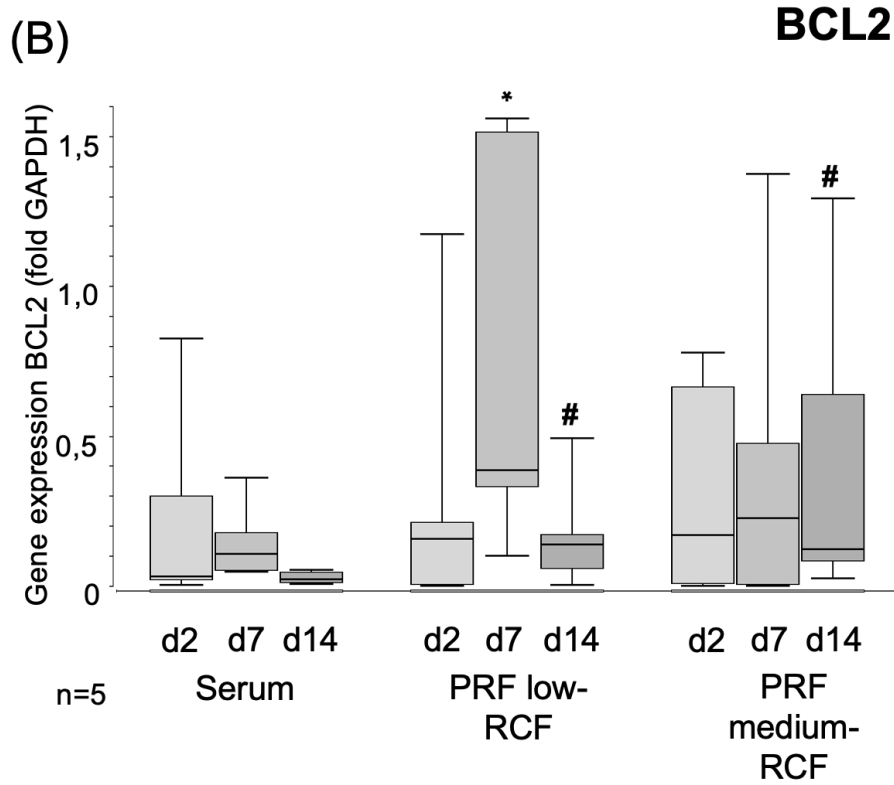
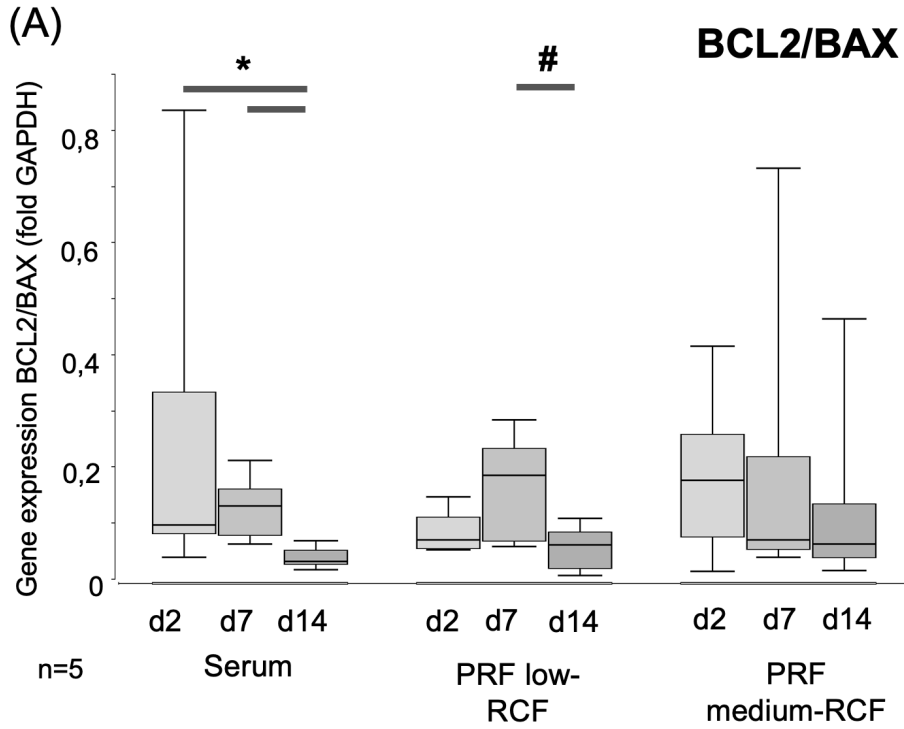


Abbildung 3-5: Genexpression von TGF- β in BMC bei Kultivierung mit PRF low-RCF, PRF medium-RCF und Serum nach Tag 2, 7 und 14.

Es sind Boxplots des Medians gezeigt ($n=5$). Auf der y-Achse ist die Genexpression von TGF- β in Bezug zu dem Haushaltsgen GAPDH aufgezeichnet. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Materialien zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Realtime PCR erfolgte wie in 2.2.12 Material und Methoden erläutert. Signifikant gesteigerte TGF- β Genexpression an Tag 7 PRF low-RCF im Vergleich zu Tag 2 PRF low-RCF und Tag 2 Serum. * $p < 0.05$ versus PRF low-RCF Tag 2. # $p < 0.05$ versus Serum Tag 2.

3.2.3.2 *BCL-2 / BAX - Genexpression*

Als Indikator für ein mögliches proapoptotisches Verhalten des PRF in Bezug auf die BMC wurde der Quotient des antiapoptotischen BCL-2 und des proapoptotischen BAX bestimmt. Diesbezüglich zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Quotienten in der Serum-Gruppe an Tag 2 und 7 gegenüber Tag 14. Ebenso fand sich eine Erhöhung des BCL-2 / BAX – Verhältnisses in der PRF low-RCF Gruppe an Tag 7 im Vergleich zu Tag 14 (siehe Abbildung 3-6). Einzeln betrachtet fand sich ein signifikanter Anstieg der Expression von BCL-2 an Tag 7 in der PRF low-RCF Gruppe gegenüber der Serum-Kontrollgruppe. An Tag 14 kam es zu einer statistisch signifikant erhöhten BCL-2 Genexpression in den beiden PRF-Gruppen verglichen zur Serum-Kontrolle. Die BAX-Genexpression zeigte keine relevanten Unterschiede in den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 3-6).



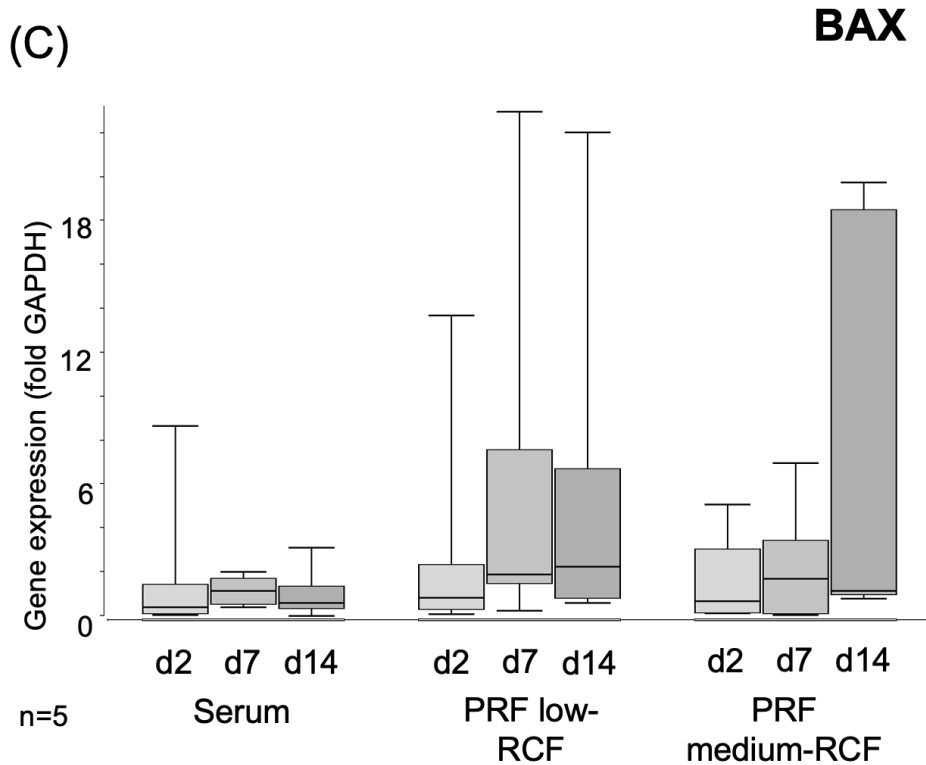
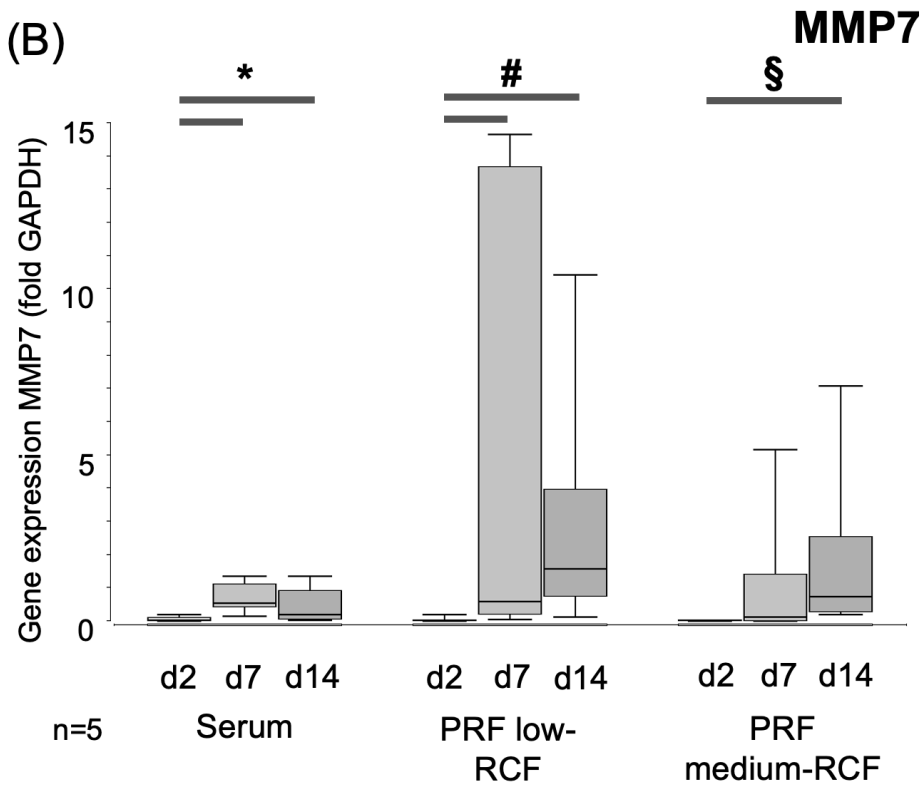
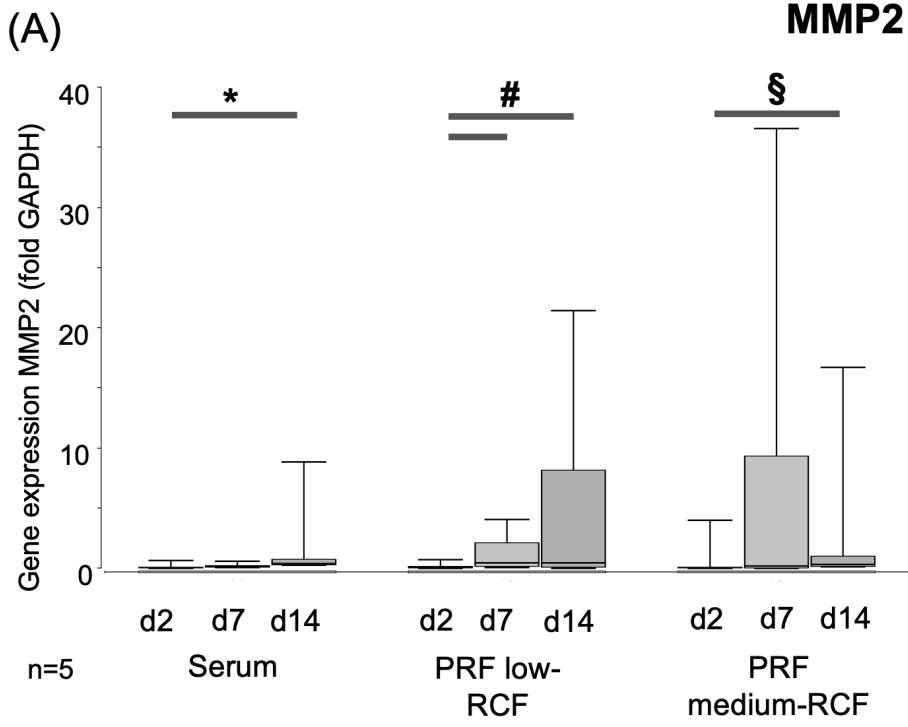


Abbildung 3-6: Genexpression von BCL-2 und BAX in BMC nach Kultivierung mit den PRF-Aufbereitungen und Serum nach Tag 2, 7 und 14.

Gezeigt sind Boxplots des Medians ($n=5$). Auf der y-Achse ist die Genexpression von BCL-2 und BAX bzw. des Quotienten in Bezug zu dem Haushaltsgen GAPDH aufgezeichnet. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Materialien zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Realtime PCR erfolgte wie in 2.2.12 Material und Methoden erläutert. Signifikanter Anstieg des BCL-2 / BAX-Quotienten (A) in der Serum-Gruppe an Tag 2 und 7 gegenüber Tag 14. $*p < 0.05$ versus Serum Tag 14. Signifikante Erhöhung der Ratio in der PRF low-RCF Gruppe an Tag 7 im Vergleich zu Tag 14. $\#p < 0.05$ versus PRF low-RCF Tag 14. Statistisch signifikant gesteigerte Expression von BCL-2 (B) an Tag 7 PRF low-RCF im Vergleich zu Serum. $*p < 0.05$ versus Serum Tag 7. An Tag 14 signifikante Erhöhung der BCL-2 Genexpression in der PRF low-RCF Gruppe und PRF medium-RCF Gruppe im Vergleich zu Serum. $\#p < 0.05$ versus Serum Tag 14. Bezüglich der BAX-Genexpression (C) konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

3.2.3.3 *Genexpression der Matrix-Metalloproteasen*

Außerdem wurde die Genexpression der an dem Umbau der Extrazellulärmatrix beteiligten Matrix-Metalloproteasen analysiert. Diese war sowohl in der Kultur mit PRF low-RCF als auch mit PRF medium-RCF hochreguliert. Es fand sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression von MMP2 in allen Gruppen an Tag 14 gegenüber Tag 2. In der PRF low-RCF Gruppe zeigte sich bereits eine statistisch relevante Steigerung an Tag 7 im Vergleich zu Tag 2. Ebenso erhöhte sich die Genexpression von MMP7 in allen Versuchsgruppen signifikant an Tag 14 verglichen mit Tag 2. Ein früherer Anstieg der MMP7 Genexpression konnte in der Serum- und PRF low-RCF Gruppe bereits an Tag 7 gemessen werden. Auch im zuletzt gemessenen Gen aus der Familie der Matrix-Metalloproteasen, dem MMP9, zeigte sich eine Hochregulation der Genexpression. Nach Inkubation mit PRF low-RCF konnte in den BMC eine signifikante Erhöhung der MMP9 Genexpression an Tag 7 und 14 im Gegensatz zu Tag 2 gemessen werden. Der Zusatz von PRF medium-RCF führte ebenfalls zu einer statistisch relevanten Steigerung der Expression von MMP9 an Tag 14 gegenüber Tag 2. In beiden PRF-Aufbereitungen fand sich eine signifikant vermehrte Expressierung des MMP9-Gens an Tag 14 im Vergleich zu der Serum-Kontrollgruppe (Abbildung 3-7).



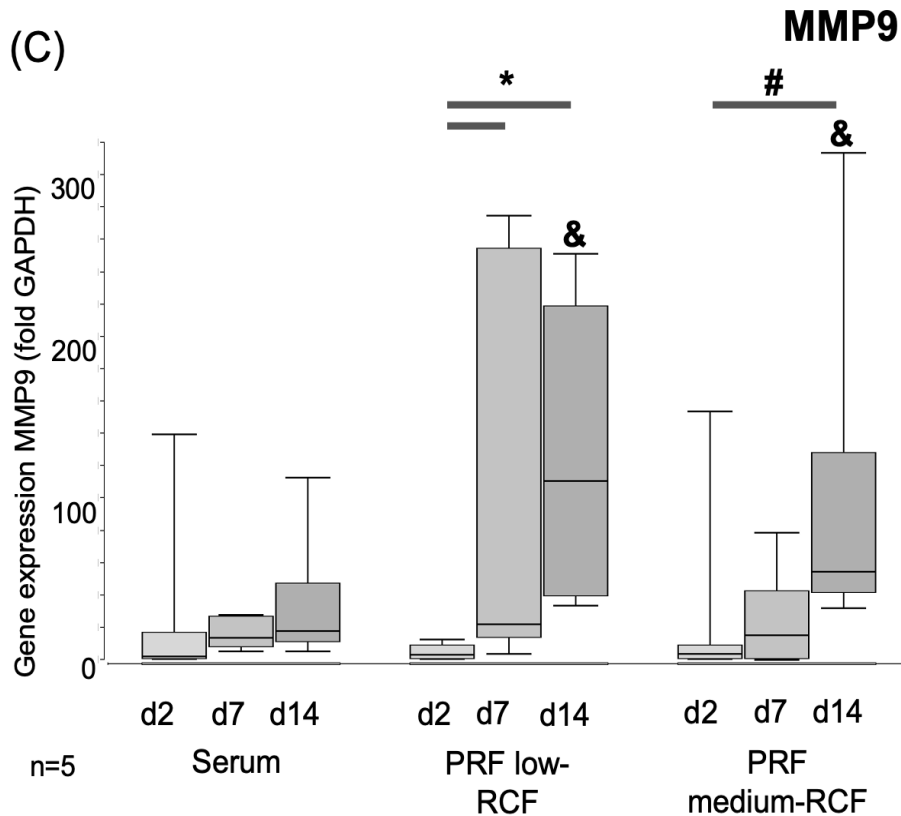


Abbildung 3-7: Genexpression von MMP2, MMP7 und MMP9 in den BMC nach Inkubation mit Serum, PRF low-RCF und PRF medium-RCF an Tag 2, Tag 7 und Tag 14.

Es sind Boxplots des Medians gezeigt (n=5). Auf der y-Achse ist die Genexpression von jeweils MMP2, MMP7 und MMP9 in Bezug zu dem Haushaltsgen GAPDH aufgezeichnet. Die x-Achse zeigt die unterschiedlichen Materialien zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die Realtime PCR erfolgte wie in 2.2.12 Material und Methoden erläutert. Die Genexpression von MMP2 (A) zeigte einen signifikanten Anstieg in allen Gruppen an Tag 14 im Vergleich zu Tag 2. In der PRF low-RCF Gruppe konnte bereits eine signifikante Erhöhung an Tag 7 festgestellt werden. *p < 0.05 versus Serum Tag 2. #p < 0.05 versus PRF low-RCF Tag 2. §p < 0.05 versus PRF medium-RCF Tag 2. Bezüglich der Expression von MMP7 (B) konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung an Tag 14 versus Tag 2 in allen Gruppen beobachtet werden. In der Serum-Gruppe sowie der PRF low-RCF Gruppe fand sich dieser Anstieg bereits an Tag 7. *p < 0.05 versus Serum Tag 2. #p < 0.05 versus PRF low-RCF Tag 2. §p < 0.05 versus PRF medium-RCF Tag 2. Die MMP9-Genexpression (C) zeigte einen signifikanten Anstieg in PRF low-RCF an Tag 7 und Tag 14 gegenüber Tag 2 und in PRF medium-RCF an Tag 14 verglichen mit Tag 2. In beiden PRF-Matrices konnte eine signifikant gesteigerte Genexpression von MMP9 an Tag 14 im Vergleich zur Serum-Kontrollgruppe nachgewiesen werden. *p < 0.05 versus PRF low-RCF Tag 2. #p < 0.05 versus PRF medium-RCF Tag 2. §p < 0.05 versus Serum Tag 14.

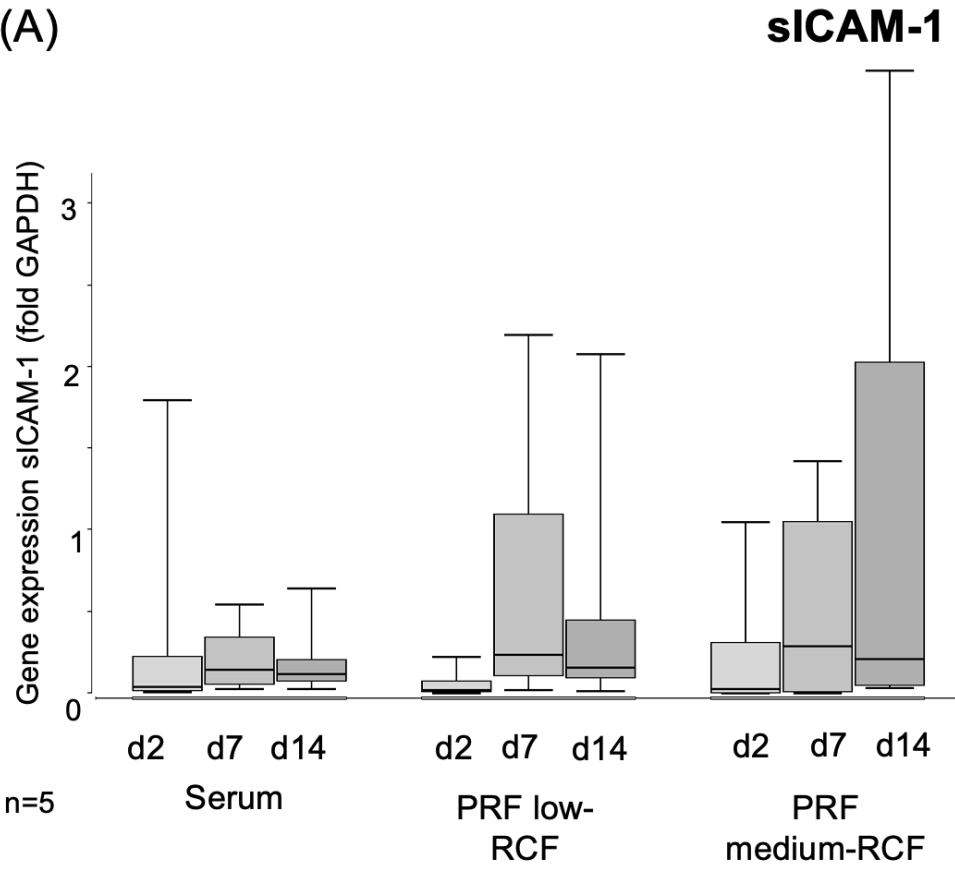
3.2.3.4 Genexpression von sICAM-1, ALP, COL1A1

sICAM-1 (soluble Intercellular Adhesion Molecule-1) ist ein Zelladhäsionsmolekül, das unter anderem von Endothelzellen exprimiert wird. Auf der Zellmembran ist es beispielweise wichtig für die Einwanderung von Lymphozyten bei der Leukodiapedese im Rahmen von entzündlichen Prozessen. Außerdem werden sICAM-1 stimulierende Effekte bei der Angiogenese und der Migration von Endothelzellen zugeschrieben. Während des Beobachtungszeitraums zeigten sich in den verschiedenen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression der sICAM-1 Gene in den BMC. Es konnte allerdings ein Trend zu erhöhten Werten in den PRF-Aufbereitungen beobachtet werden.

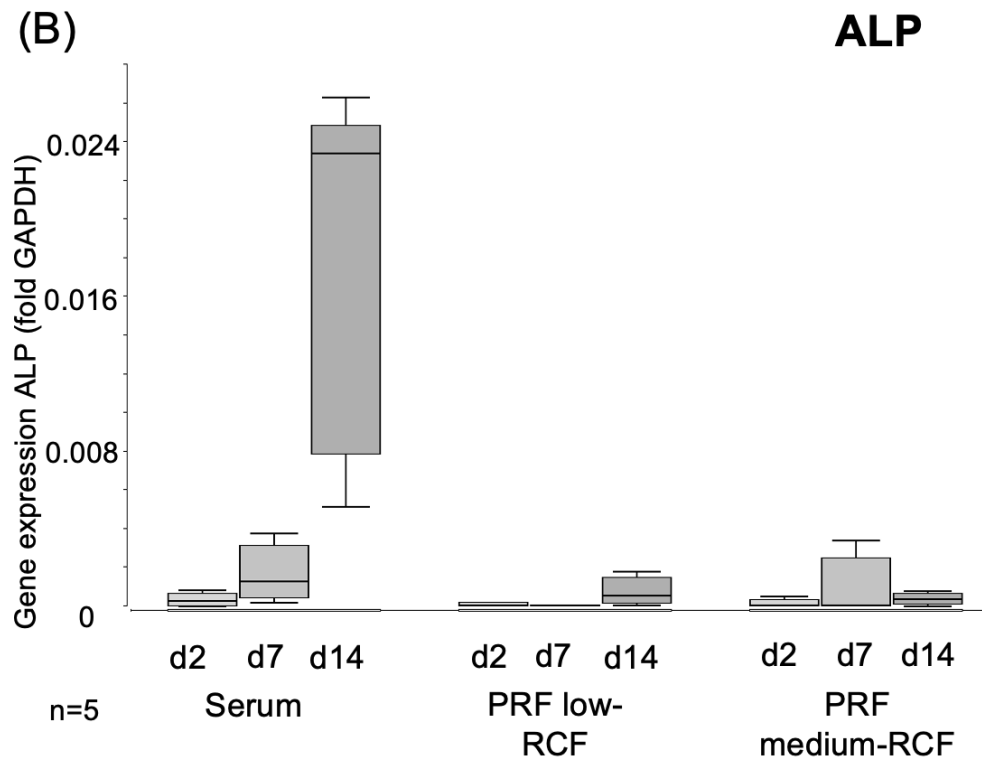
Zudem wurde die Genexpression von ALP und COL1A1 untersucht. COL1A1 ist ein Gen, das im menschlichen Körper für das Protein Kollagen Typ 1 kodiert. Kollagen Typ 1 ist der häufigste Kollagentyp und findet sich unter anderem in Knochen, Bindegewebe, Sehnen und Knorpel. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, dient ALP als Marker für osteogene Aktivität.

In unseren Messungen konnten keine bedeutenden Veränderungen in der Genexpression von ALP und COL1A1 nachgewiesen werden (Abbildung 3-8).

(A)



(B)



(C)

COL1A1

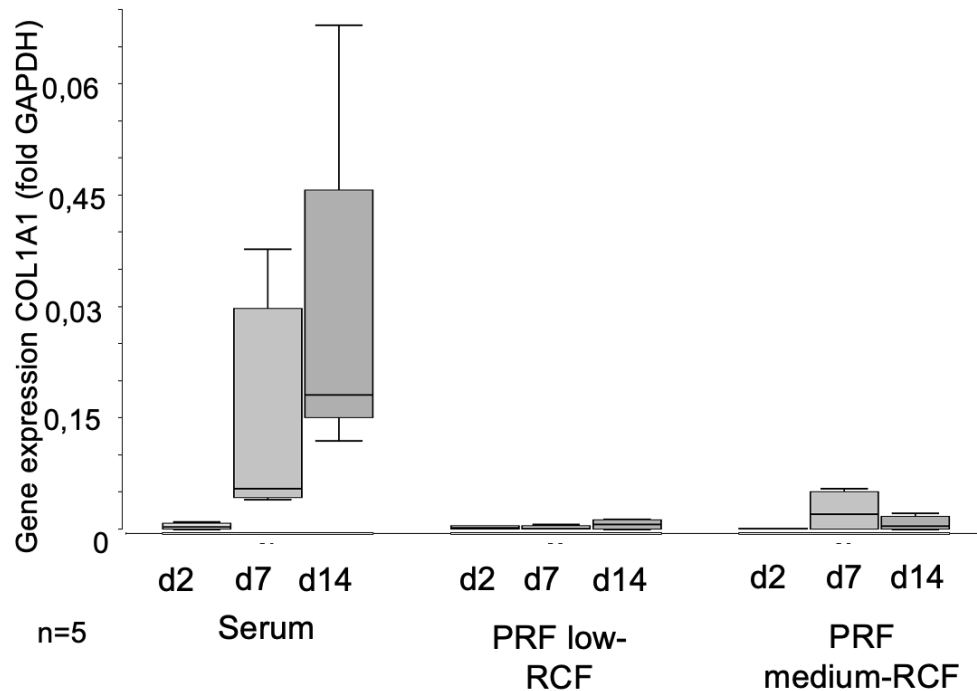


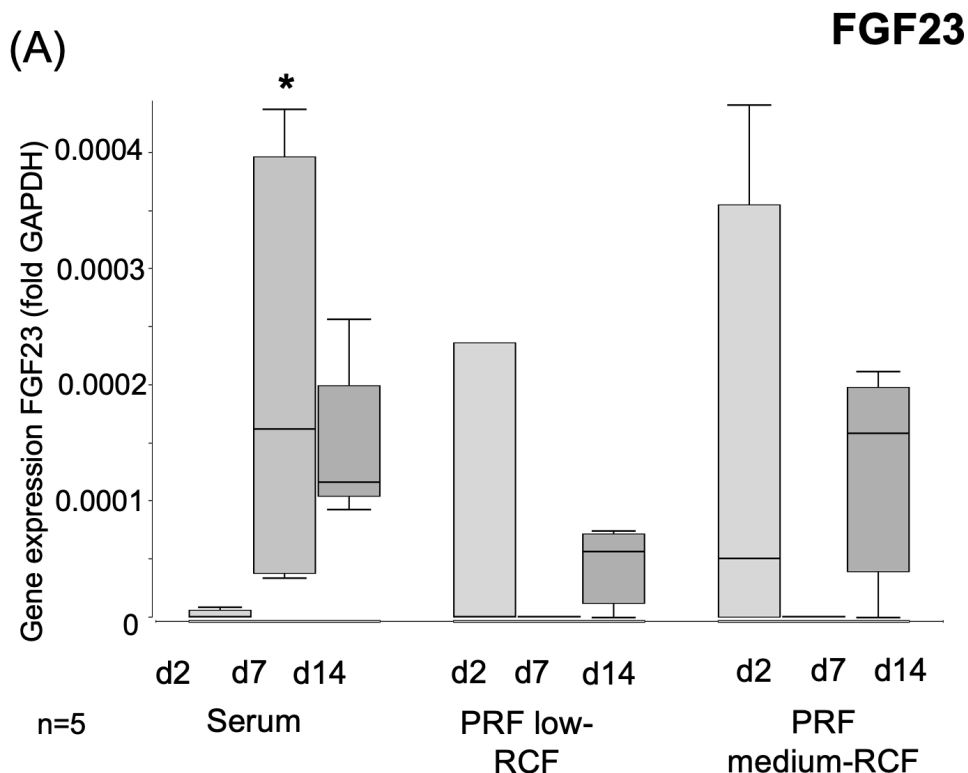
Abbildung 3-8: Genexpression von sICAM-1, ALP und COL1A1 in BMC nach Inkubation mit den verschiedenen Materialien.

Messpunkte an Tag 2, 7 und 14. Gezeigt sind Boxplots des Medians ($n=5$). Auf der y-Achse ist jeweils die Genexpression von sICAM-1, ALP und COL1A1 in Bezug zu dem Haushaltsgen GAPDH aufgezeichnet. Die x-Achse zeigt die Inkubation mit Serum, PRF low-RCF und PRF medium-RCF an den verschiedenen Messpunkten. Die Realtime PCR erfolgte wie in 2.2.12 Material und Methoden erläutert. In Bezug auf die Genexpression von sICAM-1 (A) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt werden. Es fanden sich keine bedeutenden Veränderungen in der Genexpression von ALP (B) und COL1A1 (C) zwischen den Versuchsgruppen.

3.2.3.5 Genexpression von FGF23 und SPP1

Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) wird von Osteozyten sezerniert und beeinflusst direkt den Knochenumbau und die Knochenmineralisierung. Für die Genexpression von FGF23 war eine deutliche Erhöhung an Tag 7 im Serum gegenüber den beiden PRF-Gruppen messbar (Abbildung 3-9).

SPP1 (Secreted Phosphoprotein 1) kodiert im menschlichen Körper für das Protein Osteopontin. Osteopontin bindet mit hoher Affinität an Hydroxylapatit und ist unter anderem an der Erhaltung der Knochenmatrix beteiligt. Die Expression des Gens SPP1 war nach der Inkubation mit PRF medium-RCF an Tag 2 und 7 im Vergleich zu Tag 14 signifikant gesteigert. Weiterhin zeigte sich hier eine erhöhte Genexpression an Tag 2 verglichen mit der Serum-Kontrollgruppe und der PRF low-RCF Aufbereitung. Auch an Tag 7 konnte eine signifikante Steigerung der Genexpression von SPP1 in der PRF medium-RCF Gruppe gegenüber Tag 7 der Serum-Kontrollgruppe sowie der PRF low-RCF Gruppe beobachtet werden (Abbildung 3-9).



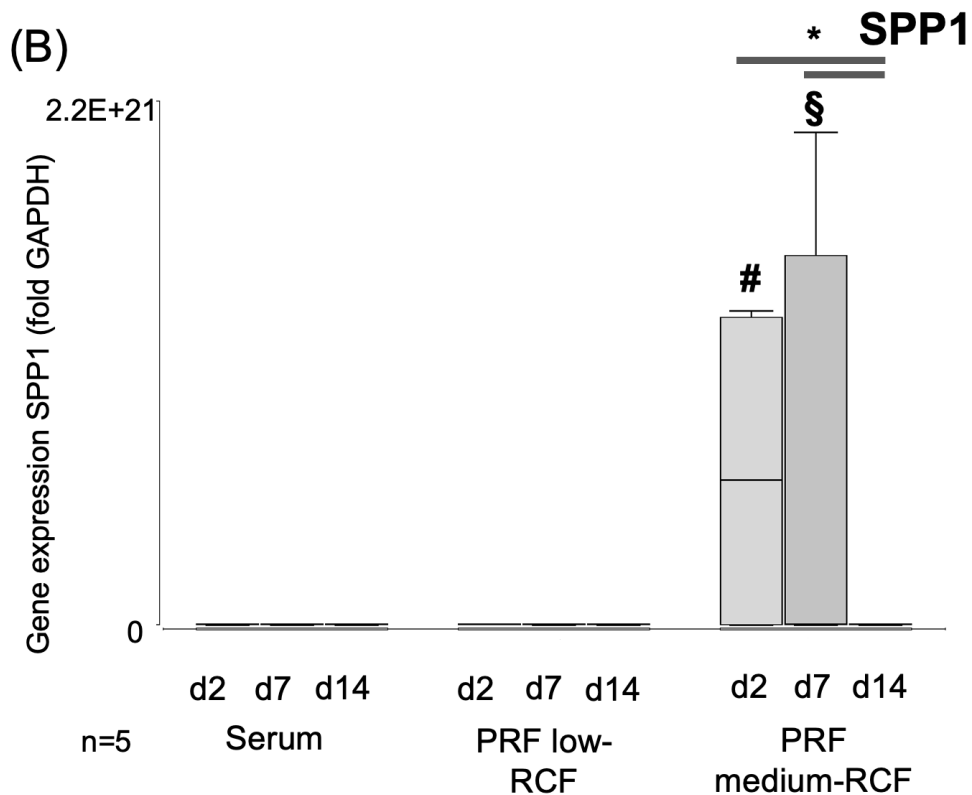
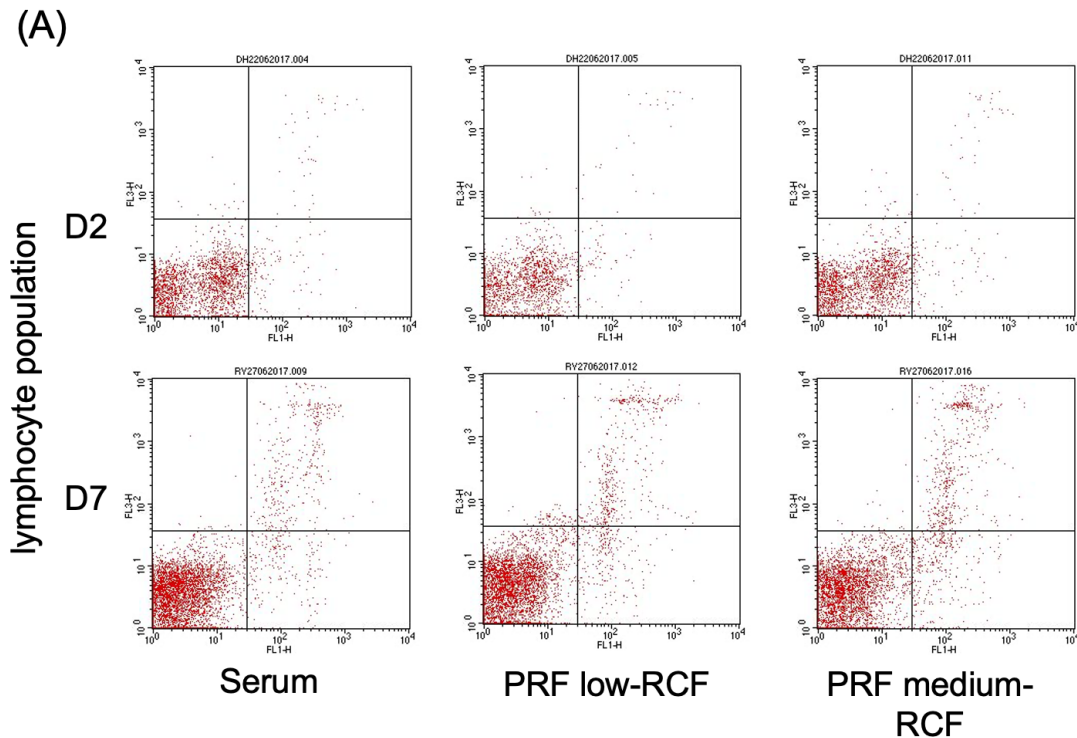


Abbildung 3-9: Genexpression von FGF23 und SPP1 in BMC nach Inkubation mit Serum, PRF low-RCF und PRF medium-RCF an Tag 2, 7 und 14.

Gezeigt sind Boxplots des Medians ($n=5$). Auf der y-Achse ist jeweils die Genexpression von FGF23 und SPP1 in Bezug zu GAPDH aufgezeichnet. Die x-Achse zeigt die verschiedenen Materialien und die Messpunkte. Die Realtime PCR erfolgte wie in 2.2.12 Material und Methoden erläutert. Signifikant gesteigerte Genexpression von FGF23 (A) im Serum an Tag 7 gegenüber PRF low-RCF und PRF medium-RCF. * $p < 0.05$ versus PRF low-RCF Tag 7 und PRF medium-RCF Tag 7. Die Genexpression von SPP1 (B) zeigte eine signifikante Erhöhung in PRF medium-RCF an Tag 2 und 7 im Vergleich zu Tag 14. * $p < 0.05$ versus PRF medium-RCF an Tag 14. Es fand sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression in PRF medium-RCF an Tag 2 gegenüber Serum und PRF low-RCF an Tag 2 und an Tag 7 gegenüber Serum und PRF low-RCF an Tag 7. # $p < 0.05$ versus Serum Tag 2 und PRF low-RCF Tag 2. § $p < 0.05$ versus Serum Tag 7 und PRF low-RCF Tag 7.

3.2.4 Einfluss von PRF auf die Apoptose der BMC

Die Apoptoserate der BMC nach Zugabe von entweder Serum, PRF low-RCF oder PRF medium-RCF wurde jeweils nach 2 und 7 Tagen Inkubation analysiert. Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer BMC wurde eine FITC-Annexin-V und 7-AAD Färbung angewandt. Durch den durchflusszytometrischen Ansatz konnte zwischen den einzelnen Populationen der BMC wie Lymphozyten und Monozyten unterschieden werden (Abbildung 3-10). Es wurde eine höhere Tendenz zur Apoptose in den Monozyten an Tag 2 im Vergleich zu den Lymphozyten beobachtet. Der Anteil an apoptotischen Lymphozyten stieg zwischen Tag 2 und 7 in allen Gruppen signifikant an. Die Apoptoserate der Monozyten betrug in allen Gruppen in etwa 20%. Es konnten keine relevanten Unterschiede über den Zeitverlauf von 7 Tagen festgestellt werden. Innerhalb der einzelnen Zellpopulationen fand sich kein Einfluss des PRF auf die Apoptoserate im Vergleich zur Serum-Kontrollgruppe (Abbildung 3-11).



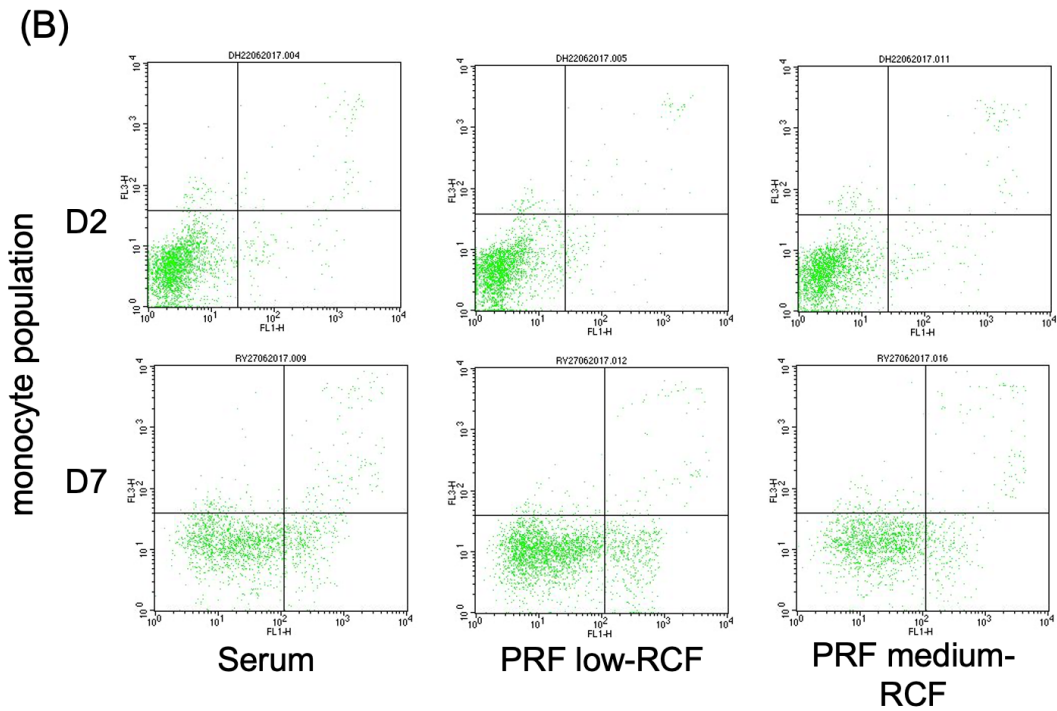
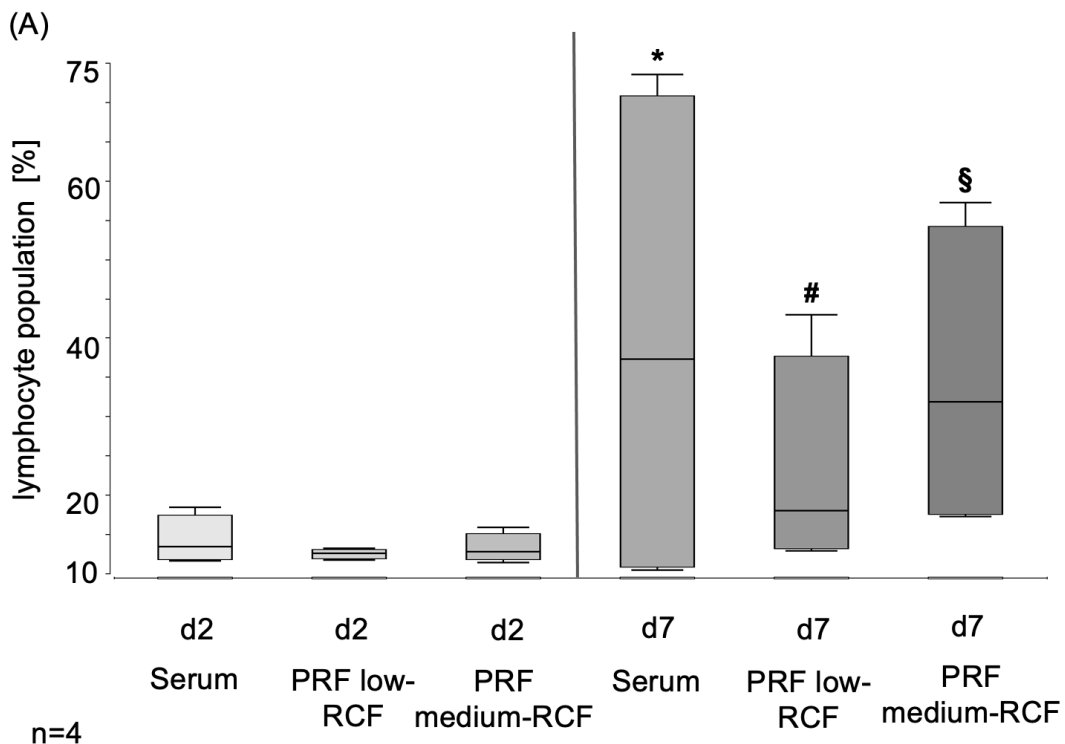


Abbildung 3-10: Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose

Die Bestimmung der Apoptose erfolgte mittels Annexin-V-FITC und 7-AAD-Färbung nach Inkubation von BMC mit Serum (links), PRF low-RCF (Mitte) oder PRF medium-RCF (rechts). Repräsentative Dot-Blots der Lymphozytenfraktion (A) und der Monozytenfraktion (B) nach 2 (D2) und 7 Tagen (D7) Inkubation mit den angegebenen Zusätzen werden gezeigt.



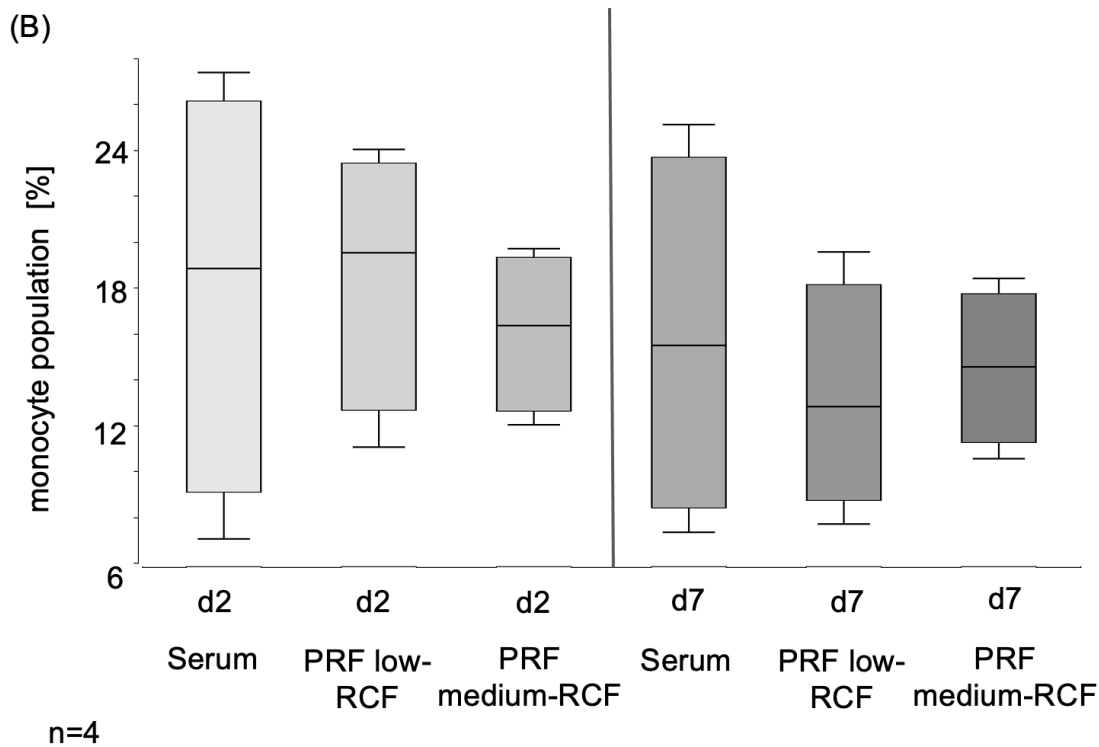


Abbildung 3-11: Apoptoserate der BMC nach Zugabe von Serum, PRF low-RCF und PRF medium-RCF nach 2 und 7 Tagen.

Es sind Boxplots des Medians gezeigt ($n=5$). Auf der x-Achse ist die Rate der Zellen in Prozent aufgezeichnet, die in Apoptose gegangen sind. Auf der y-Achse sind die verschiedenen Materialien und die unterschiedlichen Messpunkte dargestellt. Die Bestimmung der Apoptoserate wurde wie in Material und Methoden 2.2.13 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikant gesteigerte Apoptose in den Lymphozyten (A) in allen Gruppen nach 7 Tagen. * $p < 0.05$ versus Serum Tag 2. # $p < 0,05$ versus PRF low-RCF Tag 2. § $p < 0.05$ versus PRF medium-RCF an Tag 2. Die Prozentzahl an apoptotischen Monozyten (B) änderte sich nicht signifikant innerhalb der unterschiedlichen Gruppen über den Zeitverlauf von 7 Tagen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Aufbereitungen flüssiger PRF-Matrices (PRF low-RCF und PRF medium-RCF) auf *bone marrow mononuclear cells* (BMC) *in vitro* analysiert. Als Kontrollgruppe diente hierbei humanes Serum. Ziel unserer Versuche war es, einen Einfluss des PRF auf die BMC hinsichtlich pro-angiogenetischer Effekte nachzuweisen. Zusätzlich wurde untersucht, ob der hohe Gehalt an regenerativ wirkenden Wachstumsfaktoren in PRF zur Stimulation der BMC beitragen kann. Positive Ergebnisse könnten auf eine verbesserte Gewebeheilung durch die Kombination von PRF und BMC hinweisen. Darüber hinaus wurde der Gehalt an unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in den zwei Aufbereitungen des PRF analysiert und die Verarbeitung in Anlehnung an das *low speed centrifugation concept*⁸² reevaluiert. Wir konnten zeigen, dass es in PRF, das mittels low-RCF hergestellt wird, zu deutlich erhöhten Konzentrationen von Wachstumsfaktoren wie IGF-1, sICAM-1 und TGF- β kommt. Die Inkubation der BMC mit sowohl PRF low-RCF als auch PRF medium-RCF führte in unseren Versuchen zu einer ähnlich gesteigerten metabolischen Aktivität in den BMC wie der Zusatz von Serum. Allerdings konnte eine vermehrte Genexpression von MMP-2, MMP-7 und MMP-9 in den PRF-Gruppen im Vergleich zum Serum nachgewiesen werden. Ferner konnten wir zeigen, dass der Zusatz von *platelet rich fibrin* die Apoptoserate in den BMC nicht beeinflusst.

4.2 Aktueller Forschungsstand und Studiendesign

Zur Therapie großer Knochendefekte stehen verschiedene klinisch etablierte Verfahren zur Verfügung wie beispielweise die Transplantation von autologem Knochenmaterial, die Knochenaugmentation nach Ilizarov oder die sogenannte induzierte Membrantechnik nach Masquelet. Diese Verfahren sind jedoch mit Nachteilen wie der Entnahmemorbidity bei der Gewinnung des autologen Knochens oder, im Falle der Ilizarov-Technik, einer erhöhten Infektionsgefahr assoziiert.^{15,20,21} Eine Alternative bieten Tissue-Engineering Techniken. Vereinfacht dargestellt werden hierbei regenerativ wirkende Zellen mit Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren kombiniert, um eine Defektheilung zu erzielen. Benötigt wird dafür unter anderem eine ausreichende Vaskularisierung, um die Nährstoffversorgung und den Gasaustausch zu gewährleisten. Außerdem müssen Wachstumsfaktoren und osteogene Zellen bereitgestellt werden, die das Potential besitzen, sich in knöchernes Gewebe zu differenzieren.²⁵ Eine Methode des Tissue-Engineering ist beispielweise die Kombination von Biomaterialien mit rekombinanten Knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP). BMPs besitzen als osteoinduktive Zytokine die Fähigkeit zur Stimulation der Knochenneubildung.^{93,94} Die optimale Konzentration der Wachstumsfaktoren wie BMP und die einfache, zeitnahe Bereitstellung stellen in der therapeutischen Anwendung allerdings noch immer ein Problem dar.

Ein Zellprodukt, das potenziell für Tissue-Engineering-Applikationen nutzbar ist, sind die mononukleären Knochenmarkzellen (BMC). Sie umfassen mehrere Zelltypen mit regenerativem Potential wie hämatopoetische Stammzellen, MSC-Vorläuferzellen und Monozyten.^{32,95} BMC wirken dabei wahrscheinlich hauptsächlich pro-angiogenetisch über eine Unterstützung der Vaskularisierung. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass BMC die Knochendefektheilung im *critical size defect* am Femur der athymischen Nacktratte signifikant unterstützen. Seebach et al. wiesen eine Verbesserung der Knochenheilung durch die Transplantation von humanen BMC im Vergleich zu einer Implantation von β -TCP ohne den Zellzusatz

nach.⁴² Der klinische Einsatz der BMC wurde bereits in einer Phase-I Studie bei Patienten mit proximaler Humerusfraktur untersucht. Dabei wurden bei 10 Probanden BMC auf β -TCP-Knochenersatzmaterial in den Defekt gegeben. Obwohl proximale Humerusfrakturen statistisch gesehen häufig mit sekundären Dislokationen und einer Komplikationsrate von bis zu 30% assoziiert sind,⁹⁶ heilten alle Frakturen innerhalb von 12 Wochen komplikationslos ab.⁴⁰ Trotz des bereits nachgewiesenen Heilungspotentials der BMC wurde bisher noch kein ideales Trägermaterial gefunden, das zur Implantation der Zellen in den Defekt dienen kann. Aktuell existieren auf dem Markt eine Vielzahl an möglichen Scaffolds für das Tissue Engineering. Vorangegangene Arbeiten zeigen allerdings signifikante Unterschiede in der Aussaat-effizienz, der nachfolgenden metabolischen Aktivität und der Genexpression von Wachstumsfaktoren der BMC bei Kombination mit den verschiedenen Knochenersatzmaterialien.³² Gleichmaßen ist die Suche nach einem qualifizierten Additiv, das die heilungsfördernde Wirkung der BMC unterstützen und verbessern kann, noch nicht abgeschlossen. Nachteile von geeigneten Zusätzen sind häufig aufwendige Herstellungsprotokolle oder Abstoßungsreaktionen bei körperfremden Materialien. Geeignete biologische Matrices müssten also vorzugsweise einfach herzustellen sein und aus patienteneigenem Material bestehen.

Das *platelet rich fibrin* (PRF) fußt auf einer Entwicklung von Dr. Joseph Choukroun und bezeichnet ein Thrombozytenkonzentrat, das aus einer dreidimensionalen Fibrinmatrix besteht, in die Wachstumsfaktoren eingelagert sind. Diese Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF- β 1, VEGF und EGF werden durch aktivierte Thrombozyten freigesetzt. Im Gegensatz zu bereits auf dem Markt erhältlichen Thrombozytenkonzentraten wie Platelet rich plasma (PRP) ist die Herstellung von PRF mit einem deutlich simpleren Protokoll verbunden. Die Aufbereitung von PRP geschieht zumeist in einem zeitaufwendigen Verfahren mit multiplen Schritten, das unter anderem den Zusatz von bovinem Thrombin oder Calciumchlorid verlangt.⁹⁷ PRF hingegen kann innerhalb weniger Minuten aus patienteneigenem Blut mittels Zentrifugation hergestellt und direkt angewandt

werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PRF die Vaskularisierung *in vitro* unterstützt.^{75,85}

Aufgrund dessen stellten wir die Hypothese auf, dass die Kombination von BMC mit flüssigen PRF-Matrices zu einer gesteigerten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und damit zu einer verbesserten heilungsfördernden Wirkung der BMC führt.

Die Fibrinmatrix des *platelet rich fibrin* ist angereichert mit regenerativ wirkenden Zellen wie Thrombozyten und Leukozyten. Je nach Zentrifugationsprotokoll lassen sich solide oder flüssige PRF-Matrices herstellen. In ersten histologischen Analysen der soliden PRF-Clots konnte eine Ansammlung von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Stammzellen und Monozyten im proximalen Anteil des PRF dargestellt werden.⁸³ Ghanaati et al. nahmen daher an, dass durch eine Variation der relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) und der Drehzahl der Zentrifuge eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen und Wachstumsfaktoren in dem PRF erreicht werden könne. Sie entwarfen das Protokoll für ein neues Advanced-PRF (A-PRF), dass für 14 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert wurde. Im Gegensatz zum Standard-PRF, dass bei 2700 rpm für 12 Minuten zentrifugiert wird, ist in dem Clot des A-PRF eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der Thrombozyten und Leukozyten nachzuweisen. Außerdem konnte eine erhöhte Anzahl von Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten, nachgewiesen werden.⁸³ In ihrem *Low Speed Centrifugation Concept* analysierten Choukroun et Ghanaati den Effekt einer systematischen Reduktion der relativen Zentrifugalbeschleunigung auf flüssige PRF-Matrices. Sie reduzierten die RCF innerhalb einer Spanne von 710g - 44g und halbierten die Drehzahl der Zentrifuge schrittweise. Dementsprechend wurden drei verschiedene Zentrifugationsprotokolle getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Modulation der Zentrifugationsparameter eine erhöhte Anreicherung von Leukozyten, Thrombozyten und Wachstumsfaktoren in der flüssigen PRF-Matrix erzielt werden kann.⁸² In Anlehnung an das *Low Speed Centrifugation Concept* wurde von El Bagdadi et al. das solide Advanced-PRF+ entwickelt. Dabei wurde zusätzlich zur RCF auch die Zentrifugationszeit reduziert. In dieser Arbeit konnte

eine gleichmäßige Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, EGF und TGF- β 1 aus dem A-PRF+ über den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen werden. Zudem fand sich ein erhöhter Gehalt an Wachstumsfaktoren in A-PRF und A-PRF+ im Vergleich zu dem etablierten Standardprotokoll.⁷⁹

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse haben wir für unsere Versuche zwei verschiedene Protokolle zur Herstellung der injizierbaren PRF-Matrices ausgewählt.

4.3 Wachstumsfaktoren in PRF low-RCF und PRF medium-RCF

Zur Qualifizierung der Aufbereitungen wurde der Proteingehalt von IGF-1, sICAM-1, TGF- β und VEGF in PRF medium-RCF und PRF low-RCF im Vergleich zu humanem Serum bestimmt. Sowohl die Konzentrationen von IGF-1, sICAM-1 als auch TGF- β zeigten sich vor allem in PRF low-RCF deutlich erhöht. Lediglich in Bezug auf die VEGF-Konzentrationen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen.

Die Annahme liegt nahe, dass die erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren in PRF low-RCF zu einer Stimulation der Knochenheilung führt. Schmidmaier et al. konnten zeigen, dass sowohl die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren als auch die systemische Gabe von *Growth Hormone* (GH) zu einer verkürzten Regenerationszeit von knöchernem Gewebe beitragen. Die Frakturversorgung des Knochendefektes der Ratte durch mit IGF-1 und TGF- β 1 beschichtete Kirschnerdrähte führte in den Versuchsgruppen zu einem gesteigerten Remodeling des Kallus. Nach der subkutanen Gabe von Somatotropin (GH) konnten Schmidmaier et al. im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine verbesserte biomechanische Stabilität des Knochens beobachten. Eine Kombination der systemischen und lokalen Applikationsform von Wachstumshormonen führte in den Versuchen allerdings nicht zu einer weiteren Verbesserung der Frakturheilung.⁹⁸

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesteigerte Ausschüttung von TGF- β und IGF-1 in dem PRF gleichartig osteoinduktiv wirkt.

Ein wichtiger Faktor bei der Knochenheilung ist die Vaskularisierung des neu gebildeten Gewebes. Gho et al. konnten zeigen, dass sICAM-1 angiogenetische

Aktivität besitzt. In ihren angewandten Angiogenese-Modellen konnten durch die Zugabe von sICAM-1 unter anderem das Aussprossen neuer Gefäße und eine stimulierte Differenzierung endothelialer Zellen beobachtet werden. Die Fähigkeit von sICAM-1 zur Induktion der Angiogenese *in vivo* konnten Gho et al. im *chick chorioallantoic membrane assay* nachweisen.⁹⁹

Aufgrund dessen kann man annehmen, dass eine gesteigerte Ausschüttung von sICAM-1, wie sie in unserer Aufbereitung des PRF vorliegt, die bereits bestehende pro-angiogenetische Wirkung des PRF und somit wahrscheinlich auch der BMC zusätzlich unterstützt. Auf der anderen Seite konnten mehrere Studien zeigen, dass sich erhöhte sICAM-1-Konzentrationen vor allem auch im Rahmen von pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum oder bei der diabetischen Retinopathie finden. sICAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei tumorinduzierter Angiogenese und Metastasierung. Außerdem bindet es an LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen*), einem Integrin, das auf T-Lymphozyten, aber auch anderen Leukozyten exprimiert wird. Die Interaktion von sICAM-1 mit LFA-1 ist unter anderem notwendig für die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten und der Leukozyten-Extravasation. Dies beschreibt das Austreten der Leukozyten aus der Blutbahn und das Einwandern in ein Gewebe. Dadurch kann sICAM-1 Tumorzellen helfen, sich vor einer Antwort des Immunsystems zu verstecken.^{100,101} Aufgrund der für die Knochenheilung benötigten Gefäßproliferation ist dennoch von einem positiven Effekt des sICAM-1 auf das PRF auszugehen.

In unseren Versuchen wurde lediglich in Bezug auf die Konzentration von VEGF kein signifikanter Unterschied zwischen den Testgruppen gefunden. In vorangegangenen Studien konnte allerdings eine erhöhte Ausschüttung des Wachstumsfaktors durch das PRF beobachtet werden. Zudem wurden ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Aufbereitungen des soliden PRF gezeigt. Bagdadi et al. beschrieben signifikant gesteigerte Konzentrationen von VEGF in A-PRF+, das mit einer reduzierten RCF hergestellt wurde, im Vergleich zu PRF und A-PRF.⁷⁹ Es ist fraglich, ob der fehlende Anstieg der VEGF-Konzentration mit der unterschiedlichen Struktur des injizierbaren PRF, im Vergleich zu dem soliden PRF-Clot, zusammenhängt.

Trotz des hier dargestellten potenziell positiven Effektes der Wachstumsfaktoren auf BMC, bleiben die genauen Mechanismen wenig verstanden und Gegenstand der Forschung. Ebenso können sie nur einen Auszug der Realität abbilden. In unserer Arbeit wurden lediglich vier für die Gewebeheilung und Angiogenese wichtige Wachstumsfaktoren untersucht. Es ist allerdings anzunehmen, dass noch weitere potente stimulierende Faktoren in den unterschiedlichen PRF-Sorten enthalten sind.

Neben den Wachstumsfaktoren muss auch die besondere Struktur des PRF mit ihrer dreidimensionalen Fibrinmatrix betrachtet werden. Soofi et al. heben in ihrer Arbeit die Bedeutung der Extrazellulärmatrix und im Speziellen der Basalmembran für das Verhalten von eingebetteten Zellen hervor. Die zelluläre Umgebung beeinflusst, stimuliert und reguliert das Gewebe. Dies ist ein wichtiger Faktor, der sich ebenfalls für das Tissue Engineering nutzen lässt.¹⁰² Wenn man diese Erkenntnisse auf unsere Ergebnisse anwendet, lässt sich vermuten, dass der dreidimensionale Aufbau des injizierbaren PRF ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf die eingebetteten Zellen ausübt und die Zell-Zell-Interaktion beeinflusst. In einer in-vivo Studie von Kubesch et al. konnten bereits ähnliche Effekte für solides PRF nachgewiesen werden. In Anlehnung an das LSCC (*low-speed centrifugation concept*) wurden auch hier zwei unterschiedliche Protokolle zur Herstellung des PRF verwandt. Verglichen wurde die subkutane Implantation eines PRF high-RCF sowie eines, mit verringerter RCF hergestellten, PRF medium-RCF am Modell der SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) Maus. PRF high-RCF zeigte in diesen Versuchen eine sehr dichte und stabile Fibrinstruktur, die das Einwandern von Zellen der Maus in diese behinderte. PRF medium-RCF wies auf der anderen Seite eine eher poröse Struktur der Matrix auf. In dieser Gruppe konnten zudem eine erhöhte Rate an Vaskularisation und signifikant mehr Zellen in dem PRF gefunden werden.⁹¹ Dies verdeutlicht die Bedeutung, die die unterschiedliche Aufbereitung des PRF und damit die Veränderung der Extrazellulärmatrix auf die inkludierten Zellen hat.

4.4 Genexpression in BMC nach Inkubation mit PRF

Ein weiterer wichtiger Aspekt, den wir untersucht haben, ist die Genexpression der BMC nach Koinkubation mit den injizierbaren PRF-Matrices. Wir konnten zeigen, dass es durch die Inkubation von BMC mit PRF low-RCF zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von TGF- β kommt. Wie bereits erwähnt spielt TGF- β eine entscheidende Rolle beim Umbau von Geweben und diversen Heilungsvorgängen. Die positive stimulierende Wirkung von TGF- β auf das Knochen-Remodeling konnte bereits bewiesen werden.⁹⁸ Darüber hinaus ist TGF- β ein potenter Immunmodulator. Das Zytokin wirkt antiinflammatorisch, indem es die Aktivität von Makrophagen und TH1-Zellen supprimiert. Zudem antagonisiert es inflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-1 β , TNF- α oder Interferon (IFN) γ .^{103,104} Weiterhin trägt die Signaltransduktion über die TGF- β -Superfamilie wesentlich zur Zellproliferation und Stammzellendifferenzierung bei.¹⁰⁵ So fördert TGF- β unter anderem die Differenzierung von Chondroblasten und Osteoprogenitorzellen und stimuliert die vermehrte Matrixproduktion während der Gewebsregeneration.^{106,107}

Neben der TGF- β -Expriemierung konnte auch eine gesteigerte Genexpression der Matrix-Metalloproteasen in den BMC der PRF-Versuchsgruppen gefunden werden. Die große Gruppe der MMPs bildet eine wichtige Familie von zinkhaltigen Endopeptidasen. Sie sind an zahlreichen Umbauprozessen beteiligt und können nahezu alle Komponenten der Extrazellulärmatrix abbauen. Damit sind sie sowohl für die Embryonalentwicklung, Wachstums- und Wundheilungsprozesse, als auch für die Angiogenese und das Knochen-Remodeling von Bedeutung. Eine vermehrte Expression der MMPs wurde außerdem bei verschiedenen Krankheiten wie Arthritis und Arteriosklerose sowie im Rahmen von Tumorinvasion und Metastasierung nachgewiesen.¹⁰⁸ Die MMPs lassen sich anhand ihrer Struktur und Substratspezifität in vier Subkategorien einteilen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysin und Matrilysin. Diese Einteilung ist allerdings eher historisch bedingt. Einige Autoren unterscheiden hier beispielweise noch eine fünfte Subgruppe der

membrangebundenen MMPs. Aktuell sind etwa 23 verschiedene MMPs bekannt.

108–110

Die gesteigerte Genexpression von MMP2, 7 und 9 lässt auf eine vermehrte proteolytische Aktivität der BMC durch die Zugabe von PRF schließen. Dies könnte einige Vorteile für die Knochenheilung mit sich bringen. MMPs können inaktivierte Wachstumsfaktoren und Zytokine aus der Extrazellulärmatrix freisetzen. Durch die Degradation von *Insulin-like Growth Factor binding proteins* (IGFBP) setzen die MMPs aktives IGF frei. MMP2 und MMP9 sind außerdem als aktivierende Proteasen von TGF- β beschrieben.¹¹¹ Auf der anderen Seite gibt es aber auch Hinweise, dass Wachstumsfaktoren wie EGF oder TGF- β die Expression von MMPs modulieren und hochregulieren können.^{108,109} Man kann also annehmen, dass sich MMPs und Wachstumsfaktoren gegenseitig beeinflussen. Dementsprechend lässt sich diskutieren, ob die vermehrte Genexpression der Matrix-Metalloproteasen in den BMC durch den hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren im PRF bedingt ist. Dies kann allerdings allein durch unsere Daten nicht sicher bestätigt werden.

Der Umbau der Extrazellulärmatrix ist eine wichtige Voraussetzung für eine suffiziente Angiogenese. Das Remodeling der Interzellulärsubstanz durch die Proteasen ermöglicht das Einwandern von Endothelzellen und somit das Aussprossen eines kapillären Gefäßsystems.¹¹² Die lokale Aktivität von MMP2 ist direkt an der endothelialen Zellmigration und somit der Angiogenese beteiligt. MMP9 hingegen spielt hier eine indirekte Rolle. Die Protease beeinflusst die Freisetzung von VEGF aus der Extrazellulärmatrix und ist damit ebenfalls wichtig für die Vaskularisierung des Knochens.¹¹³ Die pro-angiogenetischen Effekte von MMP9 erklären unter anderem auch die beschriebene tumorfördernde Wirkung der Gelatinasen. Allerdings sind für diese Gruppe auch negative Einflüsse auf die Angiogenese durch die Ausschüttung von antiangiogenetischen Faktoren nachgewiesen.^{108,110} Das Wachstum von neuen Gefäßen ist essentiell für die Bildung und Regeneration von Knochen. Sie sorgen für eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Zusätzlich bilden die Gefäße Nischen für die hämatopoetischen Stammzellen, die im Knochenmark verbleiben.¹¹³ Die vermehrte Genexpression von MMP2, MMP7 und MMP9 in BMC nach Inkubation

mit PRF könnte also bereits in den frühen Phasen eine verbesserte Vaskularisation der Knochenheilung bedingen.

Die Genexpression von sICAM-1 in den BMC unterschied sich in unseren Versuchen nicht signifikant in den drei Gruppen, obwohl, wie oben beschrieben, ein erhöhter Gehalt von sICAM-1 in den PRF-Aufbereitungen zu finden ist. In Versuchen von Guo et al. konnte gezeigt werden, dass sowohl MSC als auch EPC alleine nur geringe Mengen von sICAM-1 exprimieren. Durch Kokultivierung von MSC und EPC konnte allerdings eine signifikant höhere Genexpression von sICAM-1 beobachtet werden.

¹¹⁴ Die Adhäsion und Interaktion von MSC und EPC spielen eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisierung und Knochenregeneration. sICAM-1 wiederum unterstützt die Adhäsion der beiden Zelltypen. Die niedrige Genexpression von sICAM-1 in unseren Versuchen lässt sich am ehesten durch den relativ niedrigen Gehalt an MSC-Vorläuferzellen und EPC in den BMC erklären. Letztere können sich aus den, in den BMC enthaltenen, HSC differenzieren. Es wäre interessant zu analysieren, ob die von extern durch das PRF zugeführte Konzentration von sICAM-1 einen ähnlichen Effekt zwischen MSC und EPC vermittelt, wie in den Versuchen von Guo beschrieben ist. Dies bedarf jedoch weiterer Experimente.

Zur Evaluation eines möglichen positiven Effektes des PRF auf die osteogene Differenzierung von Osteoprogenitorzellen wurde die Expression der biochemischen Marker ALP und COL1A1 analysiert. Die alkalischen Phosphatasen sind eine Gruppe von Enzymen, die dazu befähigt sind, Phosphorsäureester zu spalten. Neben der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase werden noch weitere Isoformen mit Vorkommen unter anderem in der Leber, der Plazenta, dem Gallensystem und der Niere unterschieden. ¹¹⁵ Die Alkalische Phosphatase spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Mineralisierung des Knochens. Bei diesem Prozess kommt es zur Einlagerung von Hydroxylapatit in die Kollagenfibrillen der Extrazellulärmatrix. Die Bildung von Hydroxylapatit wird allerdings durch extrazellulär vorkommende anorganische Pyrophosphate inhibiert. Die Esterbindung der Pyrophosphate kann durch die Alkalische Phosphatase

hydrolysiert werden. Dadurch wird anorganisches Phosphat zur Biomineralisation bereitgestellt. ^{116,117} ALP kann also als Marker für Knochenformation und Osteoblastenaktivität herangezogen werden. ⁸⁶

COL1A1 ist ebenfalls ein bedeutender Marker bei der Entstehung von Knochen. Mutationen im Gen COL1A1 können unterschiedliche Krankheiten wie beispielsweise Osteogenesis imperfecta verursachen. ¹¹⁸

Wir konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Genexpression der beiden Gene zwischen den verschiedenen Gruppen feststellen. Im Vergleich zu vorangegangenen Experimenten von Seebach et al. fand sich sogar eine geringere Genexpression von ALP und COL1A1 in den BMC über den Kultivierungszeitraum von 14 Tagen. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Kulturmedien und Zusätze zurückzuführen. So wurden in der vorherigen Arbeit von Seebach et al. β -TCP als Scaffold und fetales bovines Serum als Zusatz verwandt. Allerdings fiel auch hier eine verhältnismäßig niedrige Genexpression von osteogenen Genen in den BMC auf. ⁴²

Lediglich in der PRF medium-RCF Gruppe konnte in unseren Versuchen eine vermehrte osteoblastenähnliche Genaktivität beobachtet werden. Denn hier fand sich eine signifikant gesteigerte Expression des Gens SPP1 im frühen Zeitverlauf gegenüber den anderen beiden Gruppen. Wie bereits erwähnt, kodiert SPP1 für das Protein Osteopontin. Osteopontin kann im Knochen von Osteoblasten und Osteoklasten sezerniert werden und agiert unter anderem im Rahmen des Remodelings der Knochenmatrix. Außerdem erhöht es die Adhäsion von Osteoblasten und Osteoklasten. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Reaktionen. Es erhöht die Anzahl an T-Zellen und Makrophagen während der Immunantwort. ¹¹⁹ Die gesteigerte Expression von SPP1 könnte also für eine erhöhte osteogene Aktivität in der PRF medium-RCF Gruppe sprechen. ¹²⁰ Im Kontrast dazu konnten wir keine gesteigerte Expression von FGF23 in den BMC nach Inkubation mit den PRF-Aufbereitungen finden. FGF23 wird direkt von Osteozyten sezerniert und dient damit als Marker für osteozytische Aktivität. ¹²¹ In unseren Versuchen zeigte sich allerdings nur eine signifikante Erhöhung der Expression von FGF23 in der Serum-Kontrollgruppe an Tag 7.

4.5 Osteogene Aktivität von BMC und PRF

Es ist anzunehmen, dass der positive Effekt der BMC auf die Knochenheilung, wie er unter anderem von Seebach et al. beschrieben wurde, nicht vorrangig durch direkte osteogene Aktivität vermittelt wird.⁴² Dies lässt sich durch den niedrigen Gehalt an Zellen mit definitivem osteogenem Potential, wie beispielsweise MSC, erklären. Die fördernde Wirkung der BMC im Rahmen von Heilungsprozessen ist vermutlich hauptsächlich durch eine Unterstützung der Angiogenese bedingt. Zudem konnte in vorangegangenen Arbeiten ein osteoinduktiver Effekt der Monozyten-Fraktion der BMC im Hinblick auf die Knochendefektheilung nachgewiesen werden.¹²² Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es während der Knochenheilung zu einer Entzündungsreaktion und nachfolgend unter anderem zur Einwanderung von Monozyten. Monozyten unterstützen somit die Wundheilung des Weichgewebes und tragen darüber hinaus auch zur Revaskularisation bei.¹²³

In ähnlicher Weise lässt sich vermuten, dass das PRF durch seinen hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren ebenfalls vorwiegend durch eine verbesserte Angiogenese zu regenerativen Prozessen beiträgt. So lassen sich in den unterschiedlichen PRF-Aufbereitungen vor allem pro-angiogenetische Faktoren wie VEGF oder Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und TGF- β nachweisen.⁷⁹ Zytokine wie BMP-2, die zur Osteogenese beitragen, finden sich hingegen nur in Spuren in dem PRF.¹²⁴

4.6 Apoptose in BMC nach Inkubation mit PRF

Um die Möglichkeit einer Kombination von PRF und BMC zu analysieren, ist es wichtig, eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen durch den Zusatz der flüssigen PRF-Matrices auszuschließen. Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren in den hergestellten PRF-Aufbereitungen ergab unter anderem eine erhöhte Konzentration an TGF- β und IGF-1. Es lässt sich annehmen, dass beide Wachstumsfaktoren zu

einer niedrigen Apoptoserate in den BMC beitragen können. Für durch IGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion ist unter anderem eine Förderung des Zellüberlebens beschrieben. Zudem konnte gezeigt werden, dass IGF einen protektiven Effekt gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli ausüben kann.¹²⁵ Auch für TGF- β sind in Bezug auf gewisse Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, antiapoptotische Eigenschaften beschrieben. Nichtsdestotrotz hemmt TGF- β in einigen Fällen auch die Zellproliferation und kann ebenfalls proapoptotisch wirken.¹²⁶ Unsere Ergebnisse lassen dennoch die Annahme zu, dass die gesteigerte Konzentration von Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 und TGF- β , einen antiapoptotischen Effekt des PRF im Vergleich zu humanem Serum bedingt.

Zur näheren Untersuchung des Apoptoseverhaltens von BMC nach Inkubation mit PRF wurde außerdem die Genexpression von BCL-2 und BAX analysiert. Die BCL-2 Familie umfasst eine Gruppe von Regulatorproteinen der Apoptose. Einige von ihnen supprimieren die Apoptose, während andere eher fördernd wirken. Bei dem programmierten Zelltod kommt es unter anderem zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Cytosol der Zelle. Durch verschiedene Mechanismen werden daraufhin sogenannte Caspasen aktiviert. Diese Proteasen spalten spezifische Funktionsproteine und führen so zur Apoptose der Zelle. BCL-2 und BCL-xL gehören zu den antiapoptotischen Proteinen. Über eine Stabilisierung des Membranpotentials des Mitochondriums verhindern sie die Ausschüttung von Cytochrom C. Die Expression des BAX-Gens wird durch den Tumorsuppressor p53 induziert. BAX fördert, vermutlich über die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran und einer daraus resultierenden erhöhten Freisetzung von Cytochrom C, die Apoptose.^{127,128} Wir konnten einen signifikanten Anstieg der BCL-2 Genexpression an Tag 7 und 14 in der PRF low-RCF Gruppe und an Tag 14 in der PRF medium-RCF Gruppe gegenüber der Serum-Kontrolle nachweisen. Die vermehrte Expression des antiapoptotischen BCL-2 nach Inkubation mit PRF weist auf eine Reduktion der intrinsischen Apoptose in den BMC hin.

In Bezug auf die Genexpression des BCL-2 / BAX-Quotienten fand sich in den PRF-Gruppen allerdings nur eine signifikante Erhöhung in der PRF low-RCF Gruppe an

Tag 7 gegenüber Tag 14. Ein antiapoptotischer Effekt konnte hier vor allem in der Serum-Gruppe beobachtet werden. Es zeigte sich ein signifikant erhöhter Anstieg des BCL-2 / BAX-Quotienten in der Serum-Gruppe an Tag 2 und 7.

Die zusätzlich durchgeführte Bestimmung der Apoptoserate der BMC per FITC-Annexin-V und 7-AAD-Färbung zeigte keine gesteigerte Apoptoseaktivität von Lymphozyten oder Monozyten durch die Zugabe von PRF low-RCF oder PRF medium-RCF verglichen mit der Serum-Kontrollgruppe. In den Monozyten lag die Rate der intrinsischen Apoptose in allen Gruppen und über alle Messzeitpunkte in etwa bei 20%. Diese Werte decken sich mit der in der Literatur beschriebenen spontanen Apoptoserate in Monozyten.¹²⁹ Im Vergleich zu den Lymphozyten fanden wir an Tag 2 eine höhere Anzahl an apoptotischen Monozyten. Die Prozentzahl der Zellen in der Lymphozytenpopulation, die in den programmierten Zelltod gingen, stieg allerdings in allen Gruppen signifikant über die Zeit an und näherte sich annähernd der Rate der Monozyten. Die spontane Apoptoserate der Lymphozyten zu frühen Messzeitpunkten, die sich in unseren Versuchen darstellen ließ, ist mit den Ergebnissen bereits publizierter Daten vereinbar. Dort wird unter anderem eine Rate von 4-20% an apoptotischen Lymphozyten in gesunden Kontrollgruppen als Referenz angegeben.¹³⁰ Ferrarini et al. konnten in ihrer Arbeit Hinweise auf eine gesteigerte Apoptoseneigung von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bei Langzeitkultivierung im Vergleich zu kurzzeitiger Inkubation finden. Sie konnten nachweisen, dass NF- κ B eine zentrale Rolle als antiapoptotischer Transkriptionsfaktor in den $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten einnimmt. Über einen Kultivierungszeitraum von 7, 14 und 21 Tagen zeigten sich in den Langzeitkulturen der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten unter anderem eine geringere NF- κ B-Aktivierung und eine resultierende vermehrte Sensitivität gegenüber apoptotischen Einflüssen.¹³¹ Diese Ergebnisse bieten einen Erklärungsansatz für die gesteigerte Apoptoserate in der Lymphozytenpopulation nach 7 Tagen in unseren Messungen. Dadurch, dass sich diese Steigerung in allen Gruppen findet, kann man davon ausgehen, dass sie nicht durch den Einfluss der PRF-Matrices zustande gekommen ist. Wir konnten in dieser Studie also

nachweisen, dass der Zusatz von PRF zu BMC nicht zu einer gesteigerten Apoptose der Zellen führt.

4.7 Limitationen der Studie

Durch die angewandten Methoden ergeben sich Limitationen für diese Studie. Neben den Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Thrombozyten sind in dem Fibrinnetz des PRF auch Leukozyten integriert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte in PRF eine erhöhte Bindung von aktivierten Thrombozyten an neutrophile Granulozyten und Monozyten gezeigt werden. Die erhöhte Bindung führt zu einer vermehrten Ausschüttung von zusätzlichen Wachstumsfaktoren wie IL-6, IL-8 und TNF- α durch die Leukozyten.⁷⁹ Durch die Tatsache, dass es sich bei unserer Arbeit um unterschiedliche Knochenmarks- und Blutspender handelte, wurde das PRF vor der Inkubation mit den BMC gefiltert. So wurde eine Graft-versus-Host-Reaktion der Leukozyten des PRF gegenüber den BMC verhindert. Aufgrund dieser Leukozytendepletion gehen dementsprechend aber auch die positiven Effekte der Leukozyten auf die Wundheilung verloren.

Eine weitere Limitation dieser Studie betrifft die Populationen der BMC. Sowohl in Bezug auf die metabolische Aktivität als auch auf die Genexpression wurde in dieser Studie immer nur die Gesamtheit der BMC betrachtet. Es konnte nicht differenziert werden, welche Populationen der Mononukleären Knochenmarkzellen von dem Einfluss des PRF profitieren.

Zusammenfassend konnte durch diese Studie belegt werden, dass sich in PRF low-RCF, das in Anlehnung an das *low speed centrifugation concept* hergestellt wurde, eine deutlich erhöhte Konzentration an Wachstumsfaktoren findet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination von PRF low-RCF mit BMC die metabolische Aktivität der Zellen stimuliert. Außerdem konnten wir eine gesteigerte Genexpression der Matrix-Metalloproteasen 2, 7 und 9 in den BMC nach Zusatz von PRF beobachten. Dies spricht für einen pro-angiogenetischen Effekt in den Zellen durch das Fibrinprodukt. Wir konnten beweisen, dass PRF keinen negativen Einfluss

auf die Apoptose der BMC ausübt. Die Kombination von BMC mit PRF low-RCF bietet einen technisch simplen und wenig zeitaufwendigen Ansatz. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kombination mit PRF das bereits nachgewiesene therapeutische Potential der BMC noch steigern kann. Nichtsdestotrotz sind diesbezüglich noch weitere Studien vonnöten. Der Effekt von PRF auf BMC kann nicht allein durch eine *in-vitro* Studie analysiert werden. Es bedarf geeigneter Tiermodelle zur Überprüfung unserer Ergebnisse.

5 Zusammenfassung

Die Therapie des *critical size defects* stellt eine große Herausforderung der Medizin dar. Die Knochendefekte können beispielsweise in Folge von Tumorresektionen, Knochenheilungsstörungen oder nach Frakturen entstehen. Den aktuellen Goldstandard in der Therapie großer Knochendefekte stellt die Transplantation von autologem Knochenmaterial dar. Die Entnahme des Materials aus dem Beckenkamm ist allerdings mit Nachteilen wie der Entnahmemorbidität verbunden. Alternativ können Tissue-Engineering Techniken eingesetzt werden, bei denen Zellen mit regenerativem Potential mit Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren kombiniert werden, um eine Defektheilung zu erzielen. Der Einsatz von *bone marrow mononuclear cells* (BMC) mit einem osteokonduktiven Gerüst wie β -TCP hat sich als geeignetes Therapiekonzept bewiesen. Einen weiteren Ansatz stellt die Verwendung von autologen Blutkonzentraten wie beispielsweise des *platelet rich fibrin* (PRF) dar. Das PRF kann innerhalb weniger Minuten aus patienteneigenem Blut mittels Zentrifugation hergestellt und direkt angewandt werden. Durch seine charakteristische dreidimensionale Fibrinmatrix dient das PRF als Reservoir für Wachstums- und Regenerationsfaktoren.

Die Kombination von BMC mit PRF könnte also durch die gesteigerte Konzentration an Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie VEGF und TGF- β zu einer Unterstützung der regenerativen Wirkung der BMC führen. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Effekt von PRF auf BMC *in vitro* zu analysieren.

In Anlehnung an das *low speed centrifugation concept* wurden zwei verschiedene PRF-Matrices hergestellt. Diese wurden entweder mit mittlerer relativer Zentrifugalbeschleunigung (RCF) (208g) oder mit geringer RCF (60g) zentrifugiert. Um eine geeignete Konzentration des PRF zur Kombination mit den BMC zu finden, wurde im Vorfeld eine Dosisfindungskurve erstellt. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss ansteigender PRF-Konzentrationen auf die metabolische Aktivität der BMC nach 7 Tagen Inkubation analysiert. Wir konnten einen Trend zu erhöhten Werten bei einer Konzentration von 10% des PRF beobachten. Die metabolische Aktivität der BMC wurde durch höhere PRF-Konzentrationen nicht weiter gesteigert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Experimente eine Konzentration von 10% der PRF-Aufbereitungen und der Serum-Kontrolle eingesetzt.

Zur Charakterisierung der beiden PRF-Aufbereitungen wurde der Gehalt an Wachstumsfaktoren im Vergleich zu humanem Serum untersucht. Es zeigten sich signifikant gesteigerte Konzentrationen von *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), *soluble Intercellular Adhesion Molecule-1* (sICAM-1) und *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) in dem PRF. Bezüglich des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Gehaltes ließ sich allerdings kein Unterschied zwischen humanem Serum und den PRF-Matrices darstellen.

Der Effekt des PRF low-RCF und PRF medium-RCF auf die Viabilität der BMC wurde anhand der metabolischen Aktivität nach 2, 7 und 14 Tagen Inkubation untersucht. Als Kontrollgruppe diente hierbei der Zusatz von humanem Serum. Die metabolische Aktivität der BMC zeigte sich an Tag 14 in allen Gruppen signifikant gesteigert.

Außerdem konnten wir zeigen, dass der Zusatz von PRF zu BMC zu einer statistisch signifikant erhöhten Genexpression der Matrix-Metalloproteasen (MMP) -2, -7 und -9 im Vergleich zur Serum-Kontrollgruppe führt.

In unseren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die apoptotische Aktivität der BMC durch Kombination mit PRF nicht negativ beeinflusst wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich PRF-Matrices als geeignete allogene oder autologe Quelle von Wachstums- und Regenerationsfaktoren nutzen lassen. Sie besitzen damit die Kapazität, Zellen wie die BMC zu stimulieren und zu aktivieren. Unsere Studie zeigt, dass der Zusatz von PRF für BMC-gestützte Therapien förderlich sein könnte. Dies muss jedoch in geeigneten Tiermodellen überprüft werden.

6 Summary

Large bone defects and their therapy have always represented a big challenge in medicine. These *critical size defects* can occur due to cancer surgery, disorders of wound healing or even after bone fractures. Current gold standard in therapy is the transplantation of autologous bone, using mainly iliac crest bone grafts. Despite the numerous advantages of autologous bone grafts, there still remain issues like the donor-site morbidity or the limited available amount of bone grafts. In recent years, bone tissue engineering using cells with regenerative potential, bone substitute material and growth factors has become an important alternative. The use of *bone marrow mononuclear cells* (BMC) in combination with an osteoconductive scaffold like β -TCP has been proven a suitable therapy concept regarding fracture healing. Another autologous source with regenerative potential is *platelet rich fibrin* (PRF). PRF is a blood-derived platelet concentrate, which can be obtained using solely a one-step centrifugation. It is enriched with leucocytes and thrombocytes and its three-dimensional matrix serves as a reservoir of different growth factors. The combination of PRF and BMC might therefore support the regenerative potential of BMC. The aim of this study was to evaluate the effect of PRF on BMC *in vitro*.

According to the *low speed centrifugation concept*, we generated a PRF centrifuged with medium relative centrifugation force (RCF) (208g) and a PRF low-RCF (60g). In order to select a suitable concentration of the PRF, the metabolic activity of the BMC was assayed after incubation with three different doses of PRF and human serum. The activation of the cell metabolic activity peaked at a dose of 10% concentration. An increase of the PRF concentration showed no further effect on the BMC. Based on these findings, we selected a 10% concentration performing the subsequent analyses.

Initially we characterized PRF low-RCF as well as PRF medium-RCF in comparison to human serum regarding their growth factor content. Our results showed a significant increase in concentrations of *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *soluble intercellular adhesion molecule-1* (sICAM-1), and *transforming growth factor- β*

(TGF- β) in PRF. However, no differences were found between the different groups with regard to the concentration of *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

The effect of PRF on BMC was analyzed based on the BMC's metabolic activity after incubation for 2,7, and 14 days. Human serum served as a control group. The metabolic activity of BMC increased in all groups significantly on day 14.

Moreover, we were able to show a significantly stimulated gene expression of *matrix metalloproteinases* (MMP) -2, -7, and -9 in BMC following the cultivation with the PRF-matrices as compared with serum.

In addition, we found that the rate of apoptotic cells in BMC was not affected by both sorts of PRF in comparison to serum.

In conclusion, PRF could be used as an allogenic or autologous source of growth factors with a regenerative potential. Therefore, PRF is able to stimulate and activate cells such as BMC. Our studies indicate that the combination of PRF and BMC could be a technically feasible approach to increase the therapeutic potential of BMC. Nevertheless, further studies and animal experiments are required to prove this concept.

7 Literaturverzeichnis

1. Prof. Dr. med. Scharf H-P, Prof. Dr. med. Rüter A, Prof. Dr. med. Pohlemann T, Prof. Dr. med. Marzi I, Prof. Dr. med. Kohn D, Prof. Dr. med. Günther K-P, eds. *Orthopädie Und Unfallchirurgie: Facharztwissen Nach Der Neuen Weiterbildungsordnung*. 2nd ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011.
2. PD Dr. Jäger M, Dr. Wild A, Prof. Dr. Krauspe R. Knochenregeneration und Knochenrekonstruktion durch Stammzellen. In: *Jahrbuch Der Heinrich-Hein-Universität Düsseldorf 2002*.
3. Heberer G, Köle W, Tscherne H, eds. *Chirurgie: Lehrbuch Für Studierende Der Medizin Und Ärzte (Heidelberger Taschenbücher)*. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1979. doi:10.1007/978-3-662-00666-5
4. Siewert JR. *Chirurgie: Mit Integriertem Fallquiz - 40 Fälle Nach Neuer AO*. 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. doi:10.1007/978-3-540-30639-9
5. Prof. Dr. med. Winker KH. *Facharzt Orthopädie Unfallchirurgie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011.
6. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
7. Neukam F, Wichmann M, Wiltfang J, eds. Wundheilung der Hartgewebe (Knochenheilung). In: *Zahnärztliche Implantologie Unter Schwierigen Umständen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007. doi:10.1055/b-0034-39424
8. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-

308.

9. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60-68.
10. Gugala Z, Lindsey RW, Gogolewski S. New Approaches in the Treatment of Critical-Size Segmental Defects in Long Bones. *Macromol Symp*. 2007;253(1):147-161. doi:10.1002/masy.200750722
11. Egol KA, Nauth A, Lee M, Pape H-C, Watson JT, Borrelli J. Bone Grafting: Sourcing, Timing, Strategies, and Alternatives. *J Orthop Trauma*. 2015;29:S10-S14. doi:10.1097/BOT.0000000000000460
12. Conway JD. Autograft and Nonunions: Morbidity with Intramedullary Bone Graft versus Iliac Crest Bone Graft. *Orthop Clin North Am*. 2010;41(1):75-84; table of contents. doi:10.1016/j.ocl.2009.07.006
13. Miller CP, Chiodo CP. Autologous Bone Graft in Foot and Ankle Surgery. *Foot Ankle Clin*. 2016;21(4):825-837. doi:10.1016/j.fcl.2016.07.007
14. Pfeifer R, Kobbe P, Knobe M, Pape H-C. Das Reamer-Irrigator-Aspirator (RIA)-System. *Oper Orthop Traumatol*. 2011;23(5):446-452. doi:10.1007/s00064-011-0117-8
15. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med*. 2006;10(1):7-19. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00287.x
16. Togawa D, Bauer TW, Lieberman IH, Sakai H. Lumbar Intervertebral Body Fusion Cages: Histological Evaluation of Clinically Failed Cages Retrieved from Humans. *J Bone Jt Surgery-American Vol*. 2004;86A(1):70-79. doi:10.2106/00004623-200401000-00012
17. Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*.

1999;30(4):571-581. doi:10.1016/S0030-5898(05)70110-3

18. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2(4):224-247. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007
19. Dendrinios GK, Kontos S, Lyritis E. Use of the Ilizarov technique for treatment of non-union of the tibia associated with infection. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 1995;77(6):835-846. doi:10.2106/00004623-199506000-00004
20. Aronson J, Johnson E, Harp JH. Local bone transportation for treatment of intercalary defects by the Ilizarov technique. Biomechanical and clinical considerations. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(243):71-79. doi:10.1097/00003086-198906000-00011
21. Tong K, Zhong Z, Peng Y, et al. Masquelet technique versus Ilizarov bone transport for reconstruction of lower extremity bone defects following posttraumatic osteomyelitis. *Injury.* 2017;48(7):1616-1622. doi:10.1016/j.injury.2017.03.042
22. Schieker M, Heiss C, Mutschler W. Knochenersatzmaterialien. *Unfallchirurg.* 2008;111(8):613-620. doi:10.1007/s00113-008-1489-6
23. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-926.
24. Dawson JI, Oreffo ROC. Bridging the regeneration gap: Stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):124-131. doi:10.1016/j.abb.2008.03.024
25. Giannoudis P V, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007;38 Suppl 4:S3-6.
26. Seebach C, Henrich D, Kähling C, et al. Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Seeded onto β -TCP Granules Enhance Early

- Vascularization and Bone Healing in a Critical-Sized Bone Defect in Rats. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):1961-1970. doi:10.1089/ten.tea.2009.0715
27. Schnürer SM, Gopp U, Kühn K-D, Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe. *Orthopade*. 2003;32(1):2-10. doi:10.1007/s00132-002-0407-9
 28. Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. *Lancet (London, England)*. 1999;353 Suppl:S128-9. doi:10.1016/S0140-6736(99)90228-3
 29. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*. 2003;21(5):610-619. doi:10.1634/stemcells.21-5-610
 30. Schieker M, Seitz S, Gülkan H, et al. Tissue Engineering von Knochen. *Orthopade*. 2004;33(12):1354-1360. doi:10.1007/s00132-004-0740-2
 31. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*. 2002;13(2):231-239; discussion 240-3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000879>.
 32. Henrich D, Verboket R, Schaible A, et al. Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/762407
 33. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-899. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5319761>.
 34. Drosse I, Volkmer E, Capanna R, Biase P De, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury*. 2008;39(SUPPL.2):S9-S20. doi:10.1016/S0020-1383(08)70011-1
 35. Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-114.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454418>.

36. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>.
37. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 8(4):498-508. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601578>.
38. Henrich D, Seebach C, Kaehling C, et al. Simultaneous Cultivation of Human Endothelial-like Differentiated Precursor Cells and Human Marrow Stromal Cells on β -Tricalcium Phosphate. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(4):551-560. doi:10.1089/ten.tec.2008.0385
39. Eldesoqi K, Seebach C, Nguyen Ngoc C, et al. High Calcium Bioglass Enhances Differentiation and Survival of Endothelial Progenitor Cells, Inducing Early Vascularization in Critical Size Bone Defects. Bhattacharya S, ed. *PLoS One*. 2013;8(11):e79058. doi:10.1371/journal.pone.0079058
40. Seebach C, Henrich D, Meier S, Nau C, Bonig H, Marzi I. Safety and feasibility of cell-based therapy of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in plate-stabilized proximal humeral fractures in humans. *J Transl Med*. 2016;14(1):314. doi:10.1186/s12967-016-1066-7
41. Wang Y, Han ZZC, Song Y, Han ZZC. Safety of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application. *Stem Cells Int*. 2012;2012:652034. doi:10.1155/2012/652034
42. Seebach C, Henrich D, Schaible A, et al. Cell-Based Therapy by Implanted Human Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Improved Bone Healing of Large Bone Defects in Rats. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(9-10):1565-1578. doi:10.1089/ten.tea.2014.0410

43. Henrich D, Seebach C, Sterlepper E, Tauchmann C, Marzi I, Frank J. RIA reamings and hip aspirate: a comparative evaluation of osteoprogenitor and endothelial progenitor cells. *Injury*. 2010;41(SUPPL. 2):S62-68.
doi:10.1016/S0020-1383(10)70012-7
44. Kuçi Z, Kuçi S, Zircher S, et al. Mesenchymal stromal cells derived from CD271(+) bone marrow mononuclear cells exert potent allosuppressive properties. *Cytotherapy*. 2011;13(10):1193-1204.
doi:10.3109/14653249.2011.605118
45. Assmus B, Rolf A, Erbs S, et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Hear Fail*. 2010;3(1):89-96.
doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.843243
46. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020076>.
47. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(3):C572-9.
doi:10.1152/ajpcell.00330.2003
48. Pearson JD. Endothelial progenitor cells - hype or hope? *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):255-262. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03214.x
49. Wang QR, Wang BH, Huang YH, Dai G, Li WM, Yan Q. Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells. *J Cell Biochem*. 2008;103(1):21-29. doi:10.1002/jcb.21377
50. Challen GA, Little MH. A Side Order of Stem Cells: The SP Phenotype. *Stem Cells*. 2006;24(1):3-12. doi:10.1634/stemcells.2005-0116
51. Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak

- MZ. Evidence That Very Small Embryonic-Like Stem Cells Are Mobilized into Peripheral Blood. *Stem Cells*. 2008;26(8):2083-2092.
doi:10.1634/stemcells.2007-0922
52. Kucia M, Reza R, Campbell FR, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*. 2006;20(5):857-869. doi:10.1038/sj.leu.2404171
53. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002;30(8):896-904.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160841>.
54. PARK C, MA Y, CHOI K. Evidence for the Hemangioblast. *Exp Hematol*. 2005;33(9):965-970. doi:10.1016/j.exphem.2005.06.003
55. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biol Cell*. 2005;97(2):133-146.
doi:10.1042/BC20040069
56. Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis*. 32(1):52-57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757413>.
57. D'Ippolito G. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci*. 2004;117(14):2971-2981.
doi:10.1242/jcs.01103
58. Jeon O, Su JS, Suk HB, Choi CY, Mi JK, Kim BS. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. *J Biomed Sci*.

2007;14(3):323-330. doi:10.1007/s11373-007-9145-7

59. Verboket R, Leiblein M, Seebach C, et al. Autologous cell-based therapy for treatment of large bone defects. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(5):649-665. doi:10.1007/s00068-018-0906-y
60. Dill T, Schächinger V, Rolf A, et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: Results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cel. *Am Heart J.* 2009;157(3):541-547. doi:10.1016/j.ahj.2008.11.011
61. Schächinger V, Assmus B, Erbs S, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(10):973-979. doi:10.1093/eurjhf/hfp113
62. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2005;87(7):1430-1437. doi:10.2106/JBJS.D.02215
63. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-674. doi:10.1038/386671a0
64. Smith JD, Melhem ME, Magge KT, Waggoner AS, Campbell PG. Improved growth factor directed vascularization into fibrin constructs through inclusion of additional extracellular molecules. *Microvasc Res.* 2007;73(2):84-94. doi:10.1016/j.mvr.2006.10.007
65. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59(9):1119-1121. doi:10.1053/joms.2001.26801

66. Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest*. 2004;113(4):516-527. doi:10.1172/JCI18420
67. Xue L, Greisler HP. Angiogenic effect of fibroblast growth factor-1 and vascular endothelial growth factor and their synergism in a novel in vitro quantitative fibrin-based 3-dimensional angiogenesis system. *Surgery*. 2002;132(2):259-267. doi:10.1067/msy.2002.125720
68. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, et al. Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res*. 2004;94(8):1124-1132. doi:10.1161/01.RES.0000126411.29641.08
69. Drake CJ, Little CD. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):7657-7661. doi:10.1073/pnas.92.17.7657
70. Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489-496. doi:10.1016/j.joms.2003.12.003
71. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353-2360. doi:10.1007/s00784-016-1719-1
72. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1207-1230. doi:10.2174/138920112800624391
73. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, et al. Current knowledge and

perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1231-1256. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740370>.

74. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-167. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009
75. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):e37-e44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
76. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001;42:55-62.
77. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):e45-e50. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.009
78. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):e51-e55. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.010
79. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg*. March 2017:1-13. doi:10.1007/s00068-017-0785-7
80. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr*

Opin Biotechnol. 2000;11(6):617-624. doi:10.1016/S0958-1669(00)00153-1

81. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation.* 1997;95(10):2387-2394. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9170401>.
82. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: The first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018;44(1):87-95. doi:10.1007/s00068-017-0767-9
83. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. *J Oral Implantol.* 2014;40(6):679-689. doi:10.1563/aaid-joi-d-14-00138
84. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, et al. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(2):197-250. doi:10.1177/10454411930040020401
85. Dohle E, El Bagdadi K, Sader R, Choukroun J, James Kirkpatrick C, Ghanaati S. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(3):598-610. doi:10.1002/term.2475
86. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(4):97-122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648882>.
87. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.011

88. Kawamura M, Urist MR. Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*. 1988;(235):302-310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3416537>.
89. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;108(5):707-713. doi:10.1016/j.tripleo.2009.06.044
90. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):299-303. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012
91. Kubesch A, Barbeck M, Al-Maawi S, et al. A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: an experimental study in vivo. *Platelets*. 2019;30(3):329-340. doi:10.1080/09537104.2018.1445835
92. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009-3017. doi:10.1161/01.CIR.0000043246.74879.CD
93. Liu Y, Möller B, Wiltfang J, Warnke PH, Terheyden H. Tissue Engineering of a Vascularized Bone Graft of Critical Size with an Osteogenic and Angiogenic Factor-Based In Vivo Bioreactor. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(23-24):3189-3197. doi:10.1089/ten.tea.2013.0653
94. Springer ING, Açil Y, Kuchenbecker S, et al. Bone graft versus BMP-7 in a critical size defect—Cranioplasty in a growing infant model. *Bone*. 2005;37(4):563-569. doi:10.1016/j.bone.2005.05.010

95. Nau C, Henrich D, Seebach C, et al. Treatment of Large Bone Defects with a Vascularized Periosteal Flap in Combination with Biodegradable Scaffold Seeded with Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells: An Experimental Study in Rats. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(1-2):133-141. doi:10.1089/ten.tea.2015.0030
96. Ockert B, Braunstein V, Kirchoff C, et al. Monoaxial Versus Polyaxial Screw Insertion in Angular Stable Plate Fixation of Proximal Humeral Fractures: Radiographic Analysis of a Prospective Randomized Study. *J Trauma Inj Infect Crit Care*. 2010;69(6):1545-1551. doi:10.1097/TA.0b013e3181c9b8a7
97. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006;38(2):174-187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921694>.
98. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, et al. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1. *Bone*. 2002;31(1):165-172. doi:10.1016/S8756-3282(02)00798-6
99. Gho YS, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res*. 1999;59(20):5128-5132. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10537287>.
100. Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 1991;147(12):4398-4401. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684377>.
101. Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Brück W, Wöckel L, Felgenhauer K. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J Neuroimmunol*. 1995;60(1-2):9-15. doi:10.1016/0165-5728(95)00047-6

102. Soofi SS, Last JA, Liliensiek SJ, Nealey PF, Murphy CJ. The elastic modulus of Matrigel™ as determined by atomic force microscopy. *J Struct Biol.* 2009;167(3):216-219. doi:10.1016/j.jsb.2009.05.005
103. O'Connor W, Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of TH17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol.* 2010;11(6):471-476. doi:10.1038/ni.1882
104. Roberts AB, Sporn MB. Physiological Actions and Clinical Applications of Transforming Growth Factor- β (TGF- β). *Growth Factors.* 1993;8(1):1-9. doi:10.3109/08977199309029129
105. Massagué J, Xi Q. TGF- β control of stem cell differentiation genes. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1953-1958. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.023
106. Edwards JR, Nyman JS, Lwin ST, et al. Inhibition of TGF- β signaling by 1D11 antibody treatment increases bone mass and quality in vivo. *J Bone Miner Res.* 2010;25(11):2419-2426. doi:10.1002/jbmr.139
107. Tang Y, Wu X, Lei W, et al. TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 2009;15(7):757-765. doi:10.1038/nm.1979
108. Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2004;1705(2):69-89. doi:10.1016/j.bbcan.2004.09.006
109. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor Cell Interactions with the Extracellular Matrix During Invasion and Metastasis. *Annu Rev Cell Biol.* 1993;9(1):541-573. doi:10.1146/annurev.cb.09.110193.002545
110. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005;9(2):267-285. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x
111. Annes JP. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.*

2003;116(2):217-224. doi:10.1242/jcs.00229

112. Ingber DE, Folkman J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*. 1989;58(5):803-805. doi:10.1016/0092-8674(89)90928-8
113. Sivaraj KK, Adams RH. Blood vessel formation and function in bone. *Development*. 2016;143(15):2706-2715. doi:10.1242/dev.136861
114. Guo J, Zhang H, Xia J, et al. Interleukin-1 β induces intercellular adhesion molecule-1 expression, thus enhancing the adhesion between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells via the p38 MAPK signaling pathway. *Int J Mol Med*. January 2018. doi:10.3892/ijmm.2018.3424
115. Obermayer-Pietsch B, Schwetz V. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung. *Z Rheumatol*. 2016;75(5):451-458. doi:10.1007/s00393-016-0083-5
116. Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch*. 2010;77(1):4-12. doi:10.1272/jnms.77.4
117. Halling Linder C, Ek-Rylander B, Krumpel M, et al. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2017;101(1):92-101. doi:10.1007/s00223-017-0259-2
118. Augusciak-Duma A, Witecka J, Sieroń AL, et al. Mutations in COL1A1 and COL1A2 Genes Associated with Osteogenesis Imperfecta (OI) Types I or III. *Acta Biochim Pol*. 2018;65(1):79-86. doi:10.18388/abp.2017_1612
119. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem*. 2018;59:17-24. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003

120. Matta C, Szűcs-Somogyi C, Kon E, et al. Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is enhanced by an aragonite scaffold. *Differentiation*. 2019;107:24-34. doi:10.1016/j.diff.2019.05.002
121. Sapir-Koren R, Livshits G. Bone mineralization is regulated by signaling cross talk between molecular factors of local and systemic origin: The role of fibroblast growth factor 23. *BioFactors*. 2014;40(6):555-568. doi:10.1002/biof.1186
122. Henrich D, Seebach C, Verboket R, Schaible A, Marzi I, Bonig H. The osteo-inductive activity of bone-marrow-derived mononuclear cells resides within the CD14+ population and is independent of the CD34+ population. *Eur Cells Mater*. 2018;35:165-177. doi:10.22203/eCM.v035a12
123. Barbeck M, Unger RE, Booms P, et al. Monocyte preseeding leads to an increased implant bed vascularization of biphasic calcium phosphate bone substitutes via vessel maturation. *J Biomed Mater Res Part A*. 2016;104(12):2928-2935. doi:10.1002/jbm.a.35834
124. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018;29(2):171-184. doi:10.1080/09537104.2017.1293812
125. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(3):256-262. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00822.x
126. Zhang Y, Alexander PB, Wang X-F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(4):a022145. doi:10.1101/cshperspect.a022145
127. Cosulich SC, Worrall V, Hedge PJ, Green S, Clarke PR. Regulation of

apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. *Curr Biol.* 1997;7(12):913-920. doi:10.1016/S0960-9822(06)00410-6

128. Kim CN, Wang X, Huang Y, et al. Overexpression of Bcl-xL Inhibits Ara-C-induced Mitochondrial Loss of Cytochrome c and Other Perturbations That Activate the Molecular Cascade of Apoptosis. *Cancer Res.* 1997;57(15):3115-3120.
129. Rajasekhar M, Olsson AM, Steel KJA, et al. MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2017;79:53-62. doi:10.1016/j.jaut.2017.01.002
130. Saito T, Dworacki G, Gooding W, Lotze MT, Whiteside TL. Spontaneous Apoptosis of CD8+ T Lymphocytes in Peripheral Blood of Patients with Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res.* 6(4):1351-1365.
131. Ferrarini M, Delfanti F, Gianolini M, et al. NF- κ B Modulates Sensitivity to Apoptosis, Proinflammatory and Migratory Potential in Short- versus Long-Term Cultured Human $\gamma\delta$ Lymphocytes. *J Immunol.* 2008;181(9):5857-5864. doi:10.4049/jimmunol.181.9.5857

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| °C | Grad Celsius |
| AAD | Aminoactinomycin |
| ALP | Alkalische Phosphatase |
| A-PRF | advanced platelet-rich fibrin |
| BAX | BCL-2 associated X |
| BCL2 | B-cell-lymphoma 2 |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| BMC | bone marrow mononuclear cell |
| BMP | bone morphogenetic protein |
| cDNA | complementary DNA |
| COL1A1 | Alpha-1-Typ-I-Kollagen |
| CSD | critical size defect |
| DBM | demineralized bone matrix |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle's medium |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | epidermal growth factor |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EPC | endothelial progenitor cell |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | fluorescence-activated cell sorting |
| FGF | fibroblast growth factor |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GDF | growth and differentiation factor |
| GH | growth hormone, Wachstumshormon |
| GOI | gene of interest |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HSC | hematopoietic stem cell |
| IFN | Interferon |

| | |
|--------------------------------|--|
| IGF | insulin-like growth factor |
| IL | Interleukin |
| LFA | lymphocyte function-associated antigen |
| LSCC | low speed centrifugation concept |
| min | Minute |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| MSC | mesenchymal stem cell |
| MTS | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| NF-κB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PDGF | platelet-derived growth factor |
| PI | Propidiumiodid |
| POB | primäre Osteoblasten |
| PRF | platelet rich fibrin |
| PRP | platelet rich plasma |
| RCF | relative Zentrifugalbeschleunigung |
| RIA | reamer-irrigator-aspirator |
| rpm | revolutions per minute |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| SCID | severe combined immunodeficiency |
| sICAM | soluble intercellular adhesion molecule |
| SPP1 | secreted phosphoprotein 1 |
| TCP | Tricalciumphosphat |
| TGF-β | transforming growth factor |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor- α |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

9 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------------------|--|----|
| Abbildung 2-1 | Zellaussaat für das MTS-Assay nach 14 Tagen Inkubation | 38 |
| Abbildung 3-1 | FACS-Messung zur Überprüfung der Zellfreiheit des PRF nach Filtrierung | 43 |
| Abbildung 3-2 | Dosisfindungskurve mittels MTS-Assay | 45 |
| Abbildung 3-3 | Charakterisierung der PRF-Matrices per ELISA | 46 |
| Abbildung 3-4 | Metabolische Aktivität der BMC nach Kultivierung mit Serum, PRF low-RCF und PRF medium-RCF | 49 |
| Abbildung 3-5 | TGF- β -Genexpression in BMC nach Kultivierung mit PRF | 50 |
| Abbildung 3-6 | BCL-2 und BAX-Genexpression in BMC nach Kultivierung mit PRF | 52 |
| Abbildung 3-7 | MMP2, MMP7 und MMP9-Genexpression in BMC nach Kultivierung mit PRF | 55 |
| Abbildung 3-8 | sICAM-1, ALP und COL1A1-Genexpression in BMC nach Kultivierung mit PRF | 58 |
| Abbildung 3-9 | FGF23 und SPP1-Genexpression in BMC nach Kultivierung mit PRF | 60 |
| Abbildung 3-10 | Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose der BMC nach Inkubation mit PRF | 62 |
| Abbildung 3-11 | Apoptoserate der BMC nach Inkubation mit PRF | 63 |

10 Tabellenverzeichnis

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tabelle 2-1 | Apparaturen und Materialien | 25 |
| Tabelle 2-2 | Zellen | 28 |
| Tabelle 2-3 | Materialien zur Herstellung von Platelet rich fibrin | 28 |
| Tabelle 2-4 | Nährmedien | 29 |
| Tabelle 2-5 | Puffer und Lösungen | 29 |
| Tabelle 2-6 | Materialien zur Zellfärbung | 30 |
| Tabelle 2-7 | Materialien ELISA | 31 |
| Tabelle 2-8 | Materialien RT-PCR | 31 |
| Tabelle 2-9 | Materialien Apoptose | 32 |
| Tabelle 2-10 | PRF-Herstellungsprotokoll | 35 |
| Tabelle 2-11 | Aussaat der Zellen für die Dosisfindungskurve | 37 |