

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

**Der Einfluss von Trauma-aktiviertem platelet-rich fibrin auf
mesenchymale Stammzellen *in vitro***

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

vorgelegt von
Isabell Bohl

aus Köln

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	PD Dr. René D. Verboket
Korreferent:	Herr Prof. Dr. Halvard Björn Bönig
Tag der mündlichen Prüfung:	31.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Gewebedefekte	6
1.1.1 Gewebearten	6
1.1.2 Wundheilung	7
1.1.3 Knochenheilung.....	8
1.1.4 Einflussfaktoren auf die Wundheilung	9
1.1.5 Wundheilungsstörungen.....	11
1.1.6 Gewebeersatz	12
1.2 Platelet-rich fibrin (PRF)	15
1.2.1 Eigenschaften des PRFs.....	15
1.2.2 Herstellung und Unterteilung.....	18
1.2.3 Verwendung von PRF	19
1.3 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	21
1.4 Problematik	24
1.5 Fragestellung.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 2: Apparaturen	29
Tabelle 3: Medien, Puffer und Lösungen	31
Tabelle 4: FACS Antikörper.....	33
Tabelle 5: ELISA	34
Tabelle 6: RNA-Isolierung und PCR.....	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Ethik	37
2.2.2 MSC Isolierung und MSC-Pool-Herstellung	37
2.2.3 Ansatz der Zellkultur aus kryokonservierten Zellen.....	37
2.2.4 Mediumwechsel der Zellkulturen.....	38
2.2.5 Ablösen der Zellen und Verteilung auf Zellkulturflaschen	38
2.2.6 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer	39
2.2.7 Einfrieren von Zellen	40
2.2.8 Durchflusszytometrie.....	40
2.2.9 Osteogene Differenzierung (Alazarin Rotfärbung)	41

2.2.10 Adipogene Differenzierung (Oil Red O Färbung)	42
2.2.11 Chondrogene Differenzierung	42
2.2.12 PRF-Herstellung und Weiterverarbeitung	44
2.2.13 MTT-Test.....	46
2.2.14 ELISA	47
2.2.15 RNA-Isolierung	48
2.2.16 cDNA-Synthese	49
2.2.17 Realtime PCR.....	49
2.2.18 Statistik.....	50
2.2.19 Patientenkollektiv	50
3. Ergebnisse	51
3.1 <i>Demographische Daten</i>	51
3.2 <i>Vorversuche</i>	53
3.2.1 Charakterisierung der MSC.....	53
3.2.2 Differenzierbarkeit der MSC	56
3.3 <i>Messung der Metabolischen Aktivität der MSC (MTT-Test)</i>	58
3.4 <i>Bestimmung von Mediatoren im Überstand mittels ELISA</i>	61
3.5 <i>Modulation der Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF</i>	67
4. Diskussion	77
4.1 <i>Haupterkenntnisse</i>	77
4.2 <i>Diskussion der Ergebnisse</i>	79
4.2.1 Diskussion des Patientenkollektivs	79
4.2.2 Diskussion PRF-Herstellung und Anwendung	81
4.2.3 Diskussion MSC	84
4.2.4 Diskussion Inflammation	87
4.2.5 Diskussion Angiogenese	89
4.2.6 Diskussion osteogenes Differenzierungspotenzial.....	90
4.2.7 Diskussion Regeneration	91
4.2.8 Diskussion Gewebeersatz.....	93
4.3 <i>Limitationen</i>	95
4.4 <i>Relevanz und Ausblick</i>	96
5. Zusammenfassung.....	99
6. Summary	101
7. Abkürzungsverzeichnis	103

8. Abbildungsverzeichnis	105
9. Tabellenverzeichnis	106
10. Literaturverzeichnis	107
11. Lebenslauf	119
12. Danksagung.....	119
13. Schriftliche Erklärung	119

1. Einleitung

Es existieren multiple Therapieansätze, um Gewebedefekte zu versorgen, welche jeweils verschiedenen Nutzen und diverse Risiken aufweisen. Die vorliegende Arbeit soll den Einfluss von PRF auf mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC) *in vitro* überprüfen, da die Kombination dieser beiden Komponenten einen möglichen Therapieansatz für die Versorgung von Knochendefekten bieten kann. Die einzelnen Faktoren werden in diesem Kapitel zunächst genauer dargestellt und im Anschluss deren Wechselwirkung erläutert.

1.1 Gewebedefekte

Frakturen sind ein häufig auftretender Gewebeschaden.¹ Um die Versorgung dieser Defekte gewährleisten zu können und die Heilung potenziell sogar zu fördern, ist es von Bedeutung die physiologischen Abläufe im Gewebe nachzuvollziehen. Im Folgenden werden daher die anatomischen und physiologischen Grundlagen der Gewebeheilung sowie zugehörige Therapieverfahren aufgezeigt.

1.1.1 Gewebearten

Der humane Körper weist diverse Gewebearten auf, welche sich in ihren Eigenschaften und Funktionen voneinander unterscheiden. Eine Einteilung dieser Gewebe kann in 4 Gruppen erfolgen: Deckgewebe, Binde- und Stützgewebe, Muskelgewebe und Nervengewebe. Die Gruppe des Binde- und Stützgewebes beinhaltet neben dem Bindegewebe auch Fettgewebe, Knorpel und Knochen. Im physiologischen Zustand unterliegen die verschiedenen Gewebe einen andauernden Auf- und Abbau, was ihnen eine gewisse Anpassungsfähigkeit verleiht.²

1.1.2 Wundheilung

Traumata können Gewebe beschädigen und sogar zu einem Gewebeerlust führen, welcher einen Defekt nach sich zieht. Für den Körper ist es wichtig, diesen Defekt zu beheben, um möglichst schnell die Funktionalität wieder herzustellen. Dazu leitet er die Wundheilung ein, welche nach einem Trauma in verschiedenen, in einander übergehenden und sich teilweise überschneidenden Phasen abläuft.^{3 4}

Direkt nach einem Trauma wird die Koagulation des Blutes initiiert, damit sich ein *Fibrin*clot bildet, der in der Lage ist, die Wunde zu verschließen.⁵ Die daran anschließende inflammatorische Phase zeichnet sich unter anderem durch das Vorkommen von Thrombozyten und Leukozyten am Defektort aus. Das Freisetzen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren führt zur Chemotaxis von inflammatorischen Zellen wie beispielsweise Monozyten.³ Eine besondere Rolle bei der Interaktion zwischen den Zellen dieser Phase spielen das Interleukin 6 (IL-6) und das Interleukin 10 (IL-10). Thrombozyten und Leukozyten können diese sowohl ausschütten als auch auf sie reagieren, wodurch es zu einer positiven Feedbackreaktion und zur Aufrechterhaltung der Entzündung kommt.⁶ Das Auftreten einer Entzündungsreaktion nach einem Trauma ist zudem wichtig für die Rekrutierung von MSC. Diese können sich zu Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren und spielen eine wichtige Rolle für die Geweberegeneration.⁷ Langanhaltende Entzündungsreaktionen indessen können einen gegenteiligen Effekt bewirken und die Regeneration negativ beeinträchtigen. Durch die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, deren Lebensspanne durch eine hohe IL-6-Konzentration verlängert werden kann, wird die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und die Heilung verzögert.⁶ Eine Balance zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Reizen ist somit entscheidend für die Gewebeheilung.⁸

In der nächsten Phase der Wundheilung entsteht, ausgelöst durch die Komponenten der vorangegangenen Phase, das Narbengewebe. Dieses ersetzt zwar primär das defekte Gewebe, ist jedoch durch vermehrte fibröse Anteile weniger funktionsfähig als das physiologische Gewebe. Beeinflussbar ist die

Zusammensetzung des Narbengewebes durch Wachstumsfaktoren und kann durch die Aktivierung oder Inhibition dieser verändert werden.³

Zuletzt findet das *Remodeling* statt. In dieser Phase wird das entstandene Narbengewebe durch funktionsfähiges Gewebe ersetzt.⁹

1.1.3 Knochenheilung

Die Knochen dienen der Stabilität und Bewegung des Körpers sowie als Speicher für Calcium und Phosphat. Die Zellen des Knochengewebes sorgen für seinen ständigen Auf- und Abbau.² Dabei sind Osteoklasten für den fortwährenden Abbau verantwortlich, während Osteoblasten für den Wiederaufbau zuständig sind. Die für diesen Prozess benötigten Osteoblasten differenzieren sich aus MSC.¹⁰ Die Bildung und Formation von Knochen wird darüber hinaus von molekularen Signalen und Wachstumsfaktoren gesteuert.¹¹ Werden diese Prozesse gestört, kann ein Ungleichgewicht entstehen, welches wiederum zum Stabilitätsverlust des Knochengewebes führen kann.¹² Ein funktionierender Ablauf ist zudem bedeutsam für die Heilung von Frakturen.¹³

Wenn Kräfte auf den Knochen ausgeübt werden, welche das Gewebe nicht kompensieren kann, da es beispielsweise an einigen Stellen weniger widerstandsfähig ist, entstehen Brüche. Diese sorgen für eine Instabilität und müssen je nach Ausmaß unterschiedlich versorgt werden.¹⁴

Die physiologische Antwort auf einen Knochenbruch ist die Bildung eines Hämatoms an der Bruchstelle. Es gelangen Makrophagen an den Defektort, welche untergegangenes Gewebe phagozytieren können. Auch Osteoklasten können hier zum Abbau des zugrunde gegangenen Knochenmaterials beitragen. Der Defekt im Knochen wird zuerst durch ein aus Knorpel und Bindegewebe bestehendes Material gedeckt und in einem darauffolgenden Schritt durch belastbaren Lamellenknochen ersetzt.¹⁵

Beim Wiederaufbau des Knochens spielen Osteoblasten eine wichtige Rolle, da sie das Knochengewebe neu bilden und somit maßgeblich an der Regeneration beteiligt sind.² MSC, welche sich zu Osteoblasten differenzieren können,

wandern zum Defekt und können durch Anlocken von osteogenen Zellen die Knochenheilung positiv beeinflussen.¹⁶

Ebenfalls Einfluss nehmend auf die Knochenheilung ist die Vaskularisierung, da diese sowohl für die Nährstoffversorgung als auch für den Abtransport von Abfallprodukten sorgt.^{17 18}

Eine unzureichende Knochenheilung kann die Morbidität des Patienten begünstigen und ist damit nachteilig für die Genesung.¹²

Im Falle von Defekten, bei welchen mit hoher Wahrscheinlichkeit kein optimaler Heilungsverlauf erwartet werden kann, können chirurgische Maßnahmen herangezogen werden.^{19 20} Diese chirurgischen Maßnahmen bedingen eine primäre Frakturheilung, bei welcher, durch direktes Aufeinanderlegen der Bruchstellen, eine Knorpelbildung als Zwischenstufe ausgelassen wird. Somit kann unmittelbar der Lamellenknochen entstehen, wodurch die Frakturheilung beschleunigt wird.¹⁵

1.1.4 Einflussfaktoren auf die Wundheilung

Um den Prozess der Gewebeheilung vollständig darzustellen, ist es notwendig, alle Faktoren zu identifizieren, welche diesen beeinflusse.²¹ Für die Gewebeheilung sind bestimmte Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie Zytokine entscheidend.²² Für die Knochenheilung sind zusätzlich Osteoblasten von grundlegender Bedeutung, da sie die Knochenmatrix bilden.¹⁰ Die Erkenntnis über das Zusammenspiel der beteiligten Faktoren und Osteoblasten sowie die Rolle der MSC ist wichtig für das ganzheitlichen Verständnis des Knochenheilungsprozesses.²¹

Nahles *et al.* beschreiben, dass der *runx-related transcription factor 2* (RUNX2)/ das *core binding factor- α 1 gene* (Cbfa1) sich auf die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten auswirkt und bereits in den Vorläufern der Osteoblasten vorkommt. RUNX2/Cbfa1 dient als Anhaltspunkt für die osteogene Differenzierungsfähigkeit von Zellen und kann einen Ausblick auf das Potenzial der Knochenformation geben.²¹ Die Expression von RUNX2/Cbfa1 wird von

Wachstumsfaktoren beeinflusst und kann bei einer Erhöhung auf ein vermehrtes osteogenes Potenzial hindeuten.²³

Um die Energie für den Umbau von MSC auf Osteoblasten bereit zu stellen, müssen die MSC sich metabolisch anpassen und verstärken dafür die mitochondriale Atmung bei heruntergefahrterer Glykolyse. Die hierbei entstehenden, endogenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können gewebeschädlich sein und müssen durch ein antioxidatives System aufgefangen werden. In diesem Prozess spielen die Transkriptionsfaktoren der FOXO-Gruppe eine Rolle, welche durch die mitogen-aktivierte Proteinkinase 8 (MAPK8) und mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 (MAPK14) reguliert werden können.¹⁰

Ein weiterer Faktor, der sich auf die Wundheilung auswirkt, ist das *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL10). Dieses Chemokin wird durch unterschiedliche Zelltypen, wie beispielsweise MSC, ausgeschüttet und wirkt unter anderem auf die Immunreaktion, indem es Leukozyten rekrutiert. Die inflammatorische Phase wird dadurch länger aufrechterhalten, was wiederum Auswirkungen auf den Zustand des Gewebes hat. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CXCL10 bei rheumatoider Arthritis neben dem Knochengewebe auch die Knochenstruktur beeinflussen kann, indem es den *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) induziert und die Knochenerosion fördert.²⁴

Des Weiteren hat Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO-1) als Immunmodulator Auswirkungen auf Gewebe des Bewegungsapparats sowie auf verschiedene weitere Gewebearten. Es kommt in Immun- und Nichtimmunzellen vor und wird durch Faktoren wie Interferon- γ (IFN- γ) reguliert. Besonders bei der Abwehr von bakteriellen und viralen Infektionen spielt es eine Rolle.²⁵ Der Einfluss auf regulierende T-Zellen wird bei IDO-1 und auch bei IDO-2, einem dem IDO-1 ähnelnden Protein, beschrieben.²⁶

Die hier aufgeführten Faktoren stellen nur eine Auswahl an möglichen Einflussfaktoren dar. Darüber hinaus existieren viele weitere Faktoren, welche die Wundheilung direkt oder indirekt beeinflussen können.

1.1.5 Wundheilungsstörungen

Eine ausbleibende und fehlerhafte Regeneration kann zu langfristigen Beschwerden führen und die Funktionsfähigkeit des Gewebes dauerhaft einschränken. Die Patienten können dadurch beispielweise an langfristigen Schmerzen und/oder psychischer Belastung leiden.²⁷

Zu den möglichen Ursachen einer verzögerten Regeneration zählen Wundheilungsstörungen, welche beispielsweise im Rahmen eines Diabetes vorliegen können.²⁸ Jiao, Xiao and Graves beschreiben, dass die Knochenheilung bei diabetischen Tieren vermindert und verspätet stattfindet. Letztendlich führen eine verminderte Wachstumsfaktorkonzentration in diabetischen Wunden und eine erhöhte Konzentration an inflammatorischen Faktoren zu einer verspäteten Gewebeheilung.⁷

Ein weiterer einschränkender Faktor für die Frakturheilung ist die Osteoporose, welche zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität und zu einer geringeren Knochendichte führt.¹³ Wachstumsfaktoren wie rhBMP-2 können die Osteogenese beeinflussen, indem sie Vorläuferzellen stimulieren und die Bildung von Zellen der osteogenen Linie induzieren. Durch diese osteoinduktiven Prozesse kann die Frakturheilung angeregt werden, welche sonst durch die Osteoporose eingeschränkt wäre.²⁹

Ball et al. beschreiben, dass der Einsatz des Wachstumsfaktors *recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2* (rhBMP-2) wirkungsvolle Ergebnisse bei der Behandlung zeigt und für die Therapie von Osteoporose zugelassen ist.²⁹ Neben dem hier gezeigten Einsatz von Wachstumsfaktoren bei Frakturbehandlungen erzielen diese ebenfalls Behandlungserfolge bei der Therapie von chronischen Wunden.³⁰

Es kann somit angenommen werden, dass Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Heilung von Gewebsdefekten wie Frakturen spielen und somit therapeutischen Nutzen besitzen.³¹

1.1.6 Gewebeersatz

Wenn eine hinreichende Defektheilung über den konservativen Weg nicht vollständig gewährleistet werden kann, besteht die Möglichkeit auf chirurgische Maßnahmen und Ersatzmaterialien zurückzugreifen.²⁰

Als ideal zur Defektversorgung gilt ein Material, wenn es nicht nur die Wunde abdeckt, sondern zeitgleich die Fähigkeit besitzt, die Wundheilung zu fördern.³²

Generell kann bei Ersatzmaterialien unterschieden werden, ob das Material von (a) einem Spender oder (b) vom Patienten selbst entnommen wurde oder ob es (c) synthetisch hergestellt wird.^{33 34}

Bei körperfremden Transplantaten von Spendern muss beachtet werden, dass eine Abstoßungsreaktion auftreten kann. Dieses Abstoßen kann negative Auswirkungen auf die Wundheilung haben und beispielsweise zu Infektionsreaktionen führen. Die Gefahr einer Abstoßungsreaktion kann durch die Verwendung von autologen, also körpereigenen Materialien reduziert werden.¹⁶

Körpereigenes Gewebe oder Zellen können für die Defektabdeckung verwendet werden, indem man sie direkt einsetzt oder *in vitro* vermehrt und erst anschließend im Körper an den Defektort reimplantiert. Das letztgenannte Verfahren wird als *Tissue Engineering* bezeichnet und kann zur Rekonstruktion von Geweben dienen.^{35 36} Es bieten sich vor allem resorbierbare Produkte für das *Tissue Engineering* an, da nur ein einzelner Eingriff erfolgen muss und die Gefahr einer Bakterienkolonisation gering ist.³⁴

In der Orthopädie werden körpereigene, natürliche Produkte des Körpers auch *orthobiologics* genannt. Neben autologen Blutprodukten zählen auch Knochentransplantate, das Knochenmark und Stammzellen dazu. Durch Verwendung dieses Gewebes kann die bisherige Behandlung verbessert und teilweise auf Operationen (OP) verzichtet werden.²⁷

Die Blutversorgung, welche von einem funktionierenden Gefäßsystem abhängt, ist bedeutend für die Wundheilung und somit auch für die Behandlung eines Defektes. Durch die Vaskularisierung werden der Nährstoff- und Sauerstofftransport am defekten Ort gewährleistet und die Zellfunktion

aufrechterhalten. Eine nicht funktionierende Vaskularisierung ist ein limitierender Faktor für die Defektheilung.³²

Bei nur geringer oder fehlender Gefäßversorgung ist die Diffusion zum Nährstoff- und Sauerstoffaustausch entscheidend. Diese kann allerdings nur über einen Bereich von circa (ca.) 1000 Mikrometern aufrechterhalten werden und kann somit keine optimale Versorgung darstellen.¹⁷ Bei dem Einsatz von Gewebstransplantaten avaskulärer Natur sollte demnach zusätzlich besonders auf die Vaskularisierung der Umgebung geachtet werden.⁴

Um die Umgebung für Transplantate möglichst optimal zu gestalten, haben einige Studien die Kombination aus Transplantaten mit Plättchenkonzentraten erforscht. Es konnte eine schnellere Anhaftung des Implantats sowie ein positiver Einfluss auf die Knochenreifung und -dichte gezeigt werden.³⁷ Die Kombination der beiden genannten Komponenten zeigt somit einen gewinnbringenden Ansatz zur Weiterentwicklung der Defektversorgung.¹⁷

Beim Füllen von Knochendefekten sollte neben der genannten intakten Vaskularisierung und einem Matrixgerüst auch auf das Vorkommen von osteoinduktiven Faktoren und Osteoprogenitorzellen geachtet werden. Diese Faktoren und Zellen spielen ebenso eine entscheidende Rolle bei der Defektheilung.³⁸

Der bisherige Goldstandard für die Behandlung von Knochendefekten ist die Transplantation von autologem Knochenmaterial. Eine Herausforderung dieses Vorgehens ist die limitierte Verfügbarkeit des Materials. Zudem verlängert sich bei Entnahme des Materials am Patienten die Operationszeit und es bestehen die generellen Risiken der Gewebeentnahme.^{33 39} Diese Beeinträchtigungen haben dazu geführt, dass sich viele Forschungsgruppen mit weiteren Behandlungsmöglichkeiten beschäftigt haben.

Zur Deckung von Defekten werden neben autologen Transplantaten auch Materialien wie Kollagenmembranen erforscht. Sie unterstützen die Wundheilung, indem sie Weichteile schließen und die Bildung des darunterliegenden Knochens fördern. Neben diesen Vorteilen weisen sie ein erhöhtes Risiko für eine Bakterienkontamination auf sowie negative regenerative Effekte auf das Gewebe.⁴⁰

Ein weiteres Produkt zur Behandlung von Defekten ist Fibrinkleber. Fibrin, welches die aktivierte Form von Fibrinogen darstellt und in Granula von Thrombozyten gefunden werden kann, fördert die Thrombozytenaggregation und fungiert als eine Art biologischer Kleber. Obwohl kleine, diffuse Blutungen gut mit diesem Material versorgt werden können, wird das minimale, aber dennoch existierende Risiko einer Virusübertragung durch das Produkt diskutiert.⁴¹

Auf Grund der genannten Risiken der jeweiligen Therapieansätze wird nach einem autologen Material gesucht, welches weniger Nachteile aufweist. In den Fokus rücken hierdurch Plättchenkonzentrate, da diese autologen Produkte aus Blut gewonnen werden können und eine über der physiologischen Grenze liegende Konzentration an Plättchen und Wachstumsfaktoren bieten. Es konnte gezeigt werden, dass Plättchenkonzentrate die Wundheilung von Weichteilgewebe nach chirurgischen Eingriffen verbessern können.²²

Eines dieser Plättchenkonzentrate, welches bereits Anwendung in der Praxis findet, ist das *platelet-rich plasma* (PRP).⁴² Grundlage für die Herstellung des PRPs ist venöses Blut. Durch Zugabe von Antikoagulantien wird bei der Herstellung die Koagulation gestoppt und durch weitere Zugabe von Thrombin und Calciumchlorid die Degranulation der Thrombozyten induziert. Die hierdurch freiwerdenden Wachstumsfaktoren wirken auf verschiedene regenerative Zellen stimulierend und können dadurch die Heilungsreaktion von Gewebsdefekten unterstützen.^{43 44}

Es zeigte sich, dass durch die Anwendung von PRP in der Parodontalmedizin Entzündungsreaktionen gehemmt werden können und die Behandlungsdauer verkürzt werden kann.⁴⁴

Greco et al. konnten nachweisen, dass die Konzentration der freigesetzten Wachstumsfaktoren, zu denen beispielsweise der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und der transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) gehören, in den ersten Minuten (min) besonders ansteigt und früh ihr Maximum erreicht.²⁷ Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass der kurzfristige Einsatz von PRP vorteilhaft sein kann.⁴⁵ Allerdings wird dadurch auch das Potenzial von PRP als zeitlich begrenzt angesehen.⁴¹

Es wird angenommen, dass der Einsatz von Antikoagulantien bei der Herstellung von PRP dazu führt, dass die Angiogenese und die Regeneration beeinflusst werden. Der Einfluss besteht in einer Hemmung der, für die Angiogenese und Regeneration entscheidenden, Thrombozyten.⁴⁶

Durch die Notwendigkeit zusätzlicher Produkte bei der insgesamt aufwendigen Herstellung ist PRP nicht das optimale Material, um den Ansprüchen einer schnellen und einfachen Traumaversorgung gerecht zu werden.⁶

1.2 Platelet-rich fibrin (PRF)

1.2.1 Eigenschaften des PRFs

Vielversprechend für die Behandlung von Gewebsdefekten scheint das platelet-rich fibrin (PRF). Bei PRF handelt es sich um ein Plättchenkonzentrat der zweiten Generation, welches von Fibrinklebern und PRP zu unterscheiden ist. Das von Choukron im Jahre 2001 als erstes beschriebene autologe Produkt PRF kann, ebenso wie PRP, aus venösem Blut gewonnen werden und entsteht durch Zentrifugation in glasbeschichteten Röhrchen. Dabei befindet sich das PRF nach dem Zentrifugieren im Röhrchen zwischen den Erythrozyten, welche sich durch ihre höhere Dichte pelletieren, und dem azellulären Plasma, welches die geringste Dichte aufweist.⁴⁷ PRF zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass für seine Herstellung keine biochemische Manipulation am Blut vorgenommen werden muss.^{48 49 50}

Durch das Zentrifugieren und den Kontakt mit der Oberfläche der Sammlungsröhrchen werden die Thrombozyten im Blut aktiviert und bioaktive Moleküle wie Zytokine freigesetzt. Gleichzeitig wird die Gerinnungskaskade aktiviert, so dass ein *Blutclot* entsteht, welcher das Endprodukt PRF bildet.⁴³ Zu beachten ist, dass zwischen der Blutgewinnung und dem Zentrifugieren möglichst wenig Zeit liegen sollte. Eine unmittelbare Weiterverarbeitung muss erfolgen, da das Blut schon durch den ersten Kontakt mit dem

Abnahmeröhrchen zu koagulieren beginnt und das PRF-Produkt bei zeitlicher Verzögerung unbrauchbar wird.⁴¹

Ein dreidimensionales Fibrinnetzwerk bildet die Grundstruktur des *Blutclots* und ahmt die Extrazellulärmatrix nach, so dass eine optimale Funktionsumgebung für die Zellen geschaffen wird. Zu den Zellen, die sich in diese Matrix einbetten, gehören Thrombozyten, Stromazellen und Leukozyten, zu denen auch B- und T-Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten zählen.⁴³ Die Zusatzbezeichnung L-PRF wird unter anderem verwendet, da Leukozyten im PRF neben Thrombozyten vermehrt vorkommen.⁵¹

Wie diese Zellen in die Matrix eingebettet sind und wie sie sich im *Blutclot* verteilen hängt unter anderem von den Zentrifugationsparametern wie Zeit und Zentrifugalbeschleunigung (RCF) ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten bei niedriger Zentrifugalbeschleunigung zunimmt und sich ihre Verteilung verändert.⁵² Bei hoher Beschleunigung siedeln sich viele Zellen im proximalen Bereich des PRF-*Clots* an, während bei niedriger Beschleunigung die Zellen gleichmäßiger über den *Blutclot* verteilt werden.⁵³

Ghanaati et al. konnten zeigen, dass sich vor allem die Verteilung der neutrophilen Granulozyten mit der Zentrifugalbeschleunigung verändert.⁴³ Bei hoher Beschleunigung sind diese in nur ca. 25% des *Blutclots* zu finden, während sie bei niedriger Beschleunigung in ca. 68% des *Blutclots* verteilt sind.⁴³ Diese Erkenntnis hebt die Bedeutung der Zentrifugalbeschleunigung als Variable auf das PRF hervor.

Die hohe Anzahl an Zellen im PRF ist insbesondere im Hinblick auf die Wundheilung ein wichtiger Faktor. Eine besondere Rolle spielen die Thrombozyten und Leukozyten. Thrombozyten, welche auch als Zellfragment angesehen werden, da sie kernlose Abschnürungen von Megakaryozyten darstellen, sind besonders an der Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Koagulationsfaktoren und weiteren Faktoren und Molekülen beteiligt.³⁹ Die Thrombozyten sind nach einem Trauma die ersten Zellen am Defektort und können durch Chemotaxis die Inflammation beeinflussen. Sie sorgen für das *Recruitment* von Entzündungszellen und nehmen Einfluss auf die Wundheilung,

indem sie die Angiogenese induzieren.^{54 18} In der Studie von Dohan *et al.* wird beschrieben, dass Thrombozyten besonders im unteren Teil des *Blutclots* angesiedelt sind (Zentrifugation für 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm)), weshalb vermutet wird, dass dieser untere Teil des *Blutclots* einen größeren therapeutischen Einfluss haben kann als der obere.³⁹

Im PRF ist eine ca. 2,5-fach höhere Konzentration an Thrombozyten zu finden als in einer Blutprobe mit physiologischer Thrombozytenzahl.⁴⁹ Als möglichen limitierenden Faktor für den Einsatz des PRFs führen Dohan Ehrenfest *et al.* an, dass eine zu hohe Thrombozytenkonzentration hemmende Effekte auf die Gewebeheilung haben kann und zu weniger Zellproliferation führt.⁴⁹ Die 2,5-fach höhere Konzentration führt allerdings noch nicht zu den genannten negativen Einflüssen und kann als erfolgsversprechend angesehen werden.

Zusätzlich zu den Thrombozyten sind vermehrt Leukozyten im PRF vorhanden, die eine wichtige Rolle im natürlichen Heilungsprozess spielen.⁵ Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die zu den Leukozyten zählen, sind in der Lage die Wundheilung zu unterstützen, indem sie Trümmer, Mikroben und nekrotisches Gewebe phagozytieren.⁴ Zudem verleihen die Leukozyten dem PRF aller Voraussicht nach antibakterielle Eigenschaften.⁵⁵

Neben dem Fibrinnetzwerk und den beschriebenen Zellen sind auch Wachstumsfaktoren ein Teil des PRFs, da sie durch die genannten Zellen vermehrt freigesetzt werden und sich in die Fibrinmatrix einbetten. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählen TGF- β 1, VEGF und der epidermal growth factor (EGF), welche unter anderem die Gewebsdurchblutung und -regeneration beeinflussen.^{56 48 4} Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Zentrifugalbeschleunigung (1300 rpm; 208 g) zu einer erhöhten Ausschüttung dieser Wachstumsfaktoren führt.⁵⁴

Neben den genannten Faktoren wird auch das Vorkommen von PDGF und der Matrix-Metalloprotease (MMP 8) im PRF-*Clot* beschrieben.³²

Während des Zentrifugierens werden, ebenfalls durch die Granula der Thrombozyten, inflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und IL-8, und wundheilungsfördernde Zytokine, wie IL-4, *soluble intercellular adhesion molecule* (sICAM) und *insuline-like growth factor 1* (IGF-1), freigesetzt. Das

davon ausgehende inflammatorische Potenzial kann zum Auslösen der Regeneration und der Gewebsheilung führen.⁶

Zusammenfassend sind die genannten Faktoren an Prozessen, wie der Zellproliferation, dem *Remodeling* und der Angiogenese beteiligt, welche alle bedeutend für die Wundheilung sind.⁴⁸

Es wird davon ausgegangen, dass die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bis zu 28 Tage nach Herstellung des PRFs erfolgt.^{51 57} Das genaue Zeitintervall, in welchem PRF zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren führt, ist nicht einheitlich definiert. Eine kontinuierliche Freisetzung soll allerdings über mindestens 7 Tage erfolgen.⁴⁹ Clark et al. zeigen, dass die langsame und kontinuierliche Freisetzung der Wachstumsfaktoren darauf zurückzuführen ist, dass die Wachstumsfaktoren, ebenso wie die Leukozyten und Thrombozyten, in die Fibrinmatrix des PRF-*Clots* eingebettet sind.⁵⁸ Die natürliche Veränderung und Reorganisation des PRF-*Clots* ist dafür verantwortlich, dass die Faktoren schrittweise freigesetzt werden.¹⁹ Daher gehen Miron, Zucchelli *et al.* davon aus, dass das therapeutische Potenzial von PRF entscheidend von der Fibrinmatrix abhängt.⁵⁹

1.2.2 Herstellung und Unterteilung

Die Herstellung des PRFs ist nicht einheitlich definiert, so dass unterschiedliche PRF-Formen differenziert werden müssen.⁵² Insgesamt kann zwischen injizierbarem PRF (i-PRF), welches eine flüssige Form annimmt, und solidem PRF, welches aus einem Blut*clot*, auch PRF-*Clot* genannt, besteht, unterschieden werden.³³ El Bagdadi et al. unterscheiden Letzteres in drei verschiedene solide PRF-Gruppen, abhängig von Zentrifugeneinstellungen wie der Zentrifugationszeit, der Rotation und der Zentrifugalbeschleunigung.⁵⁴ Für die Herstellung des PRFs (auch „Standard“ PRF genannt) wird das Blut für 12 min bei 2400 rpm (708 g) zentrifugiert, während die Voreinstellungen beim Advanced PRF (A-PRF) 14 min und 1300 rpm (208 g) betragen. Das A-PRF +,

die dritte PRF-Gruppe, unterscheidet sich vom A-PRF nur durch die Zentrifugationszeit, welche bei diesem bei 8 min liegt.⁵⁴

Während sich die Gruppen makroskopisch nur leicht unterscheiden, konnten Unterschiede im mikroskopischem Aufbau, in der Zellzahl und in der Freisetzung von Wachstumsfaktoren gefunden werden. Beispielsweise weist A-PRF + im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen die höchste Konzentration an VEGF zwischen 72 Stunden und 7 Tagen auf und hat eine höhere Wachstumsfaktorfreisetzung im Vergleich zum „Standard“ und A-PRF. A-PRF hingegen enthält eine erhöhte Konzentration von neutrophilen Granulozyten im distalen Teil des PRF-Clots. Diese Zellen tragen zur Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen bei und induzieren die Bildung von neuem Knochenmaterial.⁴

Vor dem therapeutischen Einsatz kann der PRF-Clot zu einer Membran weiterverarbeitet werden, was zu einer verbesserten klinischen Anwendung führen kann.⁴⁰ Zusätzlich unterstützt die geformte Membran die Bildung neuen Knochens und beschleunigt die Wundheilung.⁶⁰

Das in der vorliegenden Studie verwendete PRF-Produkt ist in der Herstellung mit dem A-PRF + gleichzusetzen und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Vereinfachung als PRF bezeichnet. Zudem wird zur Vereinfachung bei einem Verweis auf PRF-Studien von PRF gesprochen unabhängig davon, wie die Herstellung erfolgte. In der Diskussion wird auf die Unterschiede, welche in den Ergebnissen auf Grund der unterschiedlichen Herstellung entstehen können, eingegangen.

1.2.3 Verwendung von PRF

Auf Grund der genannten Eigenschaften erhofft man sich multiple Einsatzmöglichkeiten des PRFs und dementsprechend wird umfassend Forschung betrieben.

In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Zahnmedizin wird PRF bereits in Zusammenhang mit Knochentransplantationen eingesetzt. Bei der Behandlung von intraossären peridontalen Defekten kann PRF vorteilhafte Ergebnisse erzielen, da es die Füllung der Knochendefekte unterstützt und die Anheftung von Zellen fördert.^{27 61}

Auch in der Orthopädie ist der Einsatz von PRF Teil intensiver Forschung. Der Einsatz von autologen Blutprodukten und der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren bei Verletzungen des Muskels wurde bereits von Wright-Carpenter *et al.* untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Regenerationszeit nach einer Muskelzerrung bei einer Behandlung mit autologem, konditioniertem Serum, welches ebenfalls eine erhöhte Konzentration an Wachstumsfaktoren enthält, im Vergleich zu einer Behandlung mit antientzündlichen Medikamenten verkürzt werden konnte.⁶² Bei Behandlungen von leichten Verletzungen der Rotatorenmanschette konnten ebenfalls begünstigende Effekte bezüglich der Regeneration festgestellt werden, wenn die Verletzung in Kombination mit PRF behandelt wurde.²⁷

Darüber hinaus wird der Einsatz bei Achillessehnenoperationen, Verletzungen der Gluteus-Medius- oder der Patellar-Sehne und weiteren sport-induzierten oder orthopädischen Verletzungen überprüft.²⁷

Zusätzlich wird eine Anwendung bei Knorpeldefekten erwogen. Bei Inkorporation in biologisch abbaubarem Fibrin konnte gezeigt werden, dass die Knorpelheilung durch eine vermehrte Chondrozytenanzahl und eine erhöhte Differenzierung verbessert werden kann. Auch im Tiermodell konnte dieser heilungsfördernde Effekt bei Knorpeldefekten im Knie gezeigt werden.²⁷

Des Weiteren konnten Gassling *et al.* im Zusammenhang mit der Knochenregeneration darstellen, dass die Zytokine, welche vom PRF ausgeschüttet werden, die mitogene Antwort des Periost stimulieren können und somit bei der frühen Phase der Knochenregeneration eine Rolle spielen.³⁶

Insgesamt konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass PRF die Wundheilung und die Geweberegeneration fördern kann.^{63 48 45}

Die multiplen Eigenschaften des Produktes führen dazu, dass PRF vielseitig eingesetzt werden kann und demnach diverse Fachbereiche Interesse an der Anwendung des Produktes haben.⁴

Neben dem alleinigen Einsatz von PRF in der Therapie wird auch überprüft, ob eine Kombination aus Transplantaten unterschiedlicher Art mit PRF vorteilhaft sein könnte. Indiz für eine erfolgsversprechende Kombination wären das regenerative Potenzial, welches von PRF ausgeht, und die hohe Konzentration von Wachstumsfaktoren in der Umgebung, die zu einer besseren Eingliederung der Transplantate führen können. Kang *et al.* wiesen bereits nach, dass bei der Kombination von PRF mit autologem Knochenmaterial die Osteogenese gefördert werden kann und die Qualität des Knochens ansteigt.⁴⁵

Auch Wang *et al.* konnten neue Erkenntnisse bei dem additiven Einsatz von PRF gewinnen. Im Tierversuch zeigen sie, dass das Zusammenwirken aus einer MSC-Membran und PRF bei Kalottendefekten zu mehr Knochenbildung und Knochenvolumen führt als die Anwendung einer MSC-Membran alleine.¹⁷

Die Eigenschaften von MSC und deren Rolle bei der Regeneration vor allem im Zusammenhang mit PRF sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.3 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

MSC zählen zu den undifferenzierten Zellen des menschlichen Körpers und bilden die Vorläufer von Zellen der mesodermalen Linie.¹²

Im Körper gibt es einige Nischen für MSC wie Gefäßwände, endostale Oberflächen, das Knochenmark, perivaskuläres Gewebe und das Periost. Für die Knochenheilung besonders wichtige Nischen sind das Knochenmark, das Endost und perivaskuläre Zellen, wobei dem Knochenmark die größte Bedeutung zugesprochen wird. Von den genannten Nischen aus können MSC bei Traumata in das defekte Gewebe einwandern. Dadurch dass MSC an ihrer Oberfläche Chemokin-Rezeptoren besitzen und das *Homing* bei anderen Zellen wie Leukozyten mittels Rezeptor- und Ligandenwirkung und Adhäsionsmolekülen erfolgt vermutet man einen ähnlichen Mechanismus bei der Migration von MSC. Vollständig verstanden ist das Migrationsverhalten der Stammzellen allerdings noch nicht.⁶⁴

Einheitliche Charakteristika von MSC wurden von der *International Society for Cellular Therapy* zusammengefasst. Zu diesen Charakteristika zählen unter anderem das Vorkommen des *Cluster of differentiation* 105 (CD105), CD73 und CD90 an der Zelloberfläche und das Fehlen von CD45, CD34, CD14/11b, CD79a/19 und des *human leukocyte antigen* DR-Isotyp (HLA-DR). Auch wird das Anhaften der Zellen an Zellkulturkunststoffe als entscheidende Eigenschaft angegeben.^{31 65} Zusätzlich zeichnen sich MSC dadurch aus, dass sie sich zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren können und ein hohes replikatives Potenzial besitzen. Zellen des Knochenmarks können sich beispielsweise zu Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und zu glatten Muskelzellen differenzieren.⁶⁶

Die Differenzierung der MSC kann *in vitro* durch die Stimulation mit Chemokinen, Hormonen oder Vitaminen induziert werden. Durch den Einsatz von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat, Dexamethason und/oder dem knochenmorphogenetischen Protein (BMP) kann beispielsweise die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten initiiert werden. Unterschiedliche Signalwege führen zu einer veränderten Expression von Proteinen, die am Knochenstoffwechsel beteiligt sind.⁶⁷

Neben den genannten Eigenschaften besitzen MSC auch eine antiinflammatorische Wirkung.⁶⁴

Zudem werden MSC eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen, weshalb sie therapeutische Anwendung bei der *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) nach Stammzelltransplantation finden.⁶⁸

Da bei einem therapeutischen Einsatz von MSC nicht immer die Gelegenheit besteht, genügend Zellen zu gewinnen, gibt es die Möglichkeit, diese Zellen zu entnehmen, *in vitro* zu vermehren und dann erst in das Gewebe einzusetzen.⁶⁹

Es wird zudem angenommen, dass es gewinnbringend ist, die MSC bei der Transplantation in ein Gerüst aus anderen Materialien wie in eine Kollagenmembran einzubauen. Die Zellen können dadurch bei der Transplantation präziser eingesetzt werden und lokal ihre Wirkung entfalten.⁷⁰

Zudem konnte gezeigt werden, dass bei der Einbettung der MSC in eine Kollagenmembran ihre Adhäsion, Proliferation und Differenzierung gefördert werden können.⁷¹

Auf Grund des mutmaßlich vorteilhaften Einflusses von MSC auf die Knochenregeneration wurden MSC bereits bei der Behandlung von femoralen Osteonekrosen und Defekten der Mandibula eingesetzt und konnten Erfolge im *Tissue Engineering* erzielen.⁶⁷ Auch bei der Behandlung von Pseudoarthrosen konnten Gómez-Barrena *et al.* MSC bereits erfolgreich verwenden.⁷²

Neben der Verwendung im Gebiet der Knochenheilung ist die therapeutische Anwendung von MSC bei Knorpelschäden Inhalt verschiedener Forschungsarbeiten.

Chondrozyten im Knorpel besitzen eine geringe Fähigkeit zur Regeneration, da sich ihre Umgebung durch Avaskularität auszeichnet und die Zellanzahl gering ist. Der Einsatz von MSC, die sich zu Chondrozyten differenzieren können und zusätzlich immunsuffiziente Eigenschaften besitzen, ist daher vielversprechend.¹²

Bei der Betrachtung von unterschiedlichen Studien zur therapeutischen Anwendung von MSC muss darauf geachtet werden, dass die Methoden zur MSC-Erzeugung und –Dosierung nicht einheitlich definiert sind. Dadurch entstehen inkohärente Ergebnisse zwischen Studien zur Anwendung von MSC.

Ein Problem bei der Transplantation von MSC ist, dass eine einheitliche Transplantation durch spenderspezifische Unterschiede in der Potenz der MSC und eine heterogene Anzahl an Vorläuferzellen kaum möglich ist.⁷³

In der Regel werden MSC für die Transplantation von individuellen Spendern oder einem Pool, der aus MSC von verschiedenen Spendern besteht, entnommen. Die in der vorliegenden Studie verwendeten MSC stammen aus einem speziellen MSC-Pool. Dieser wird auch als MSC-FFM beschrieben und zeichnet sich durch eine bestimmte Art der Zellzusammensetzung aus: Es handelt sich hierbei um das Pooling von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark verschiedener Spender. *In vitro* wurden diese Zellen mit Thrombozytenlysat angereichertem Medium kultiviert und die entstandenen MSC anschließend therapeutisch verwendet.^{74 69} Es zeigte sich, dass diese Methode zu einer höheren Potenz der MSC führt sowie zu einer gesteigerten Homogenität bei Transplantationen. Die Heterogenität der Transplantate, die

normalerweise durch verschiedene Spender entsteht, kann hiermit überwunden werden. Des Weiteren weisen diese MSC ein hohes allosuppressives Potenzial auf und werden bei der GvHD, sowohl bei Kindern, als auch bei Erwachsenen angewandt. Die Antwortrate lag bei der Verwendung der MSC-FFM höher als die der MSC von individuellen Spendern oder der von anderen gepoolten Spender-MSC.⁶⁹

Der Grund für die vermehrte Forschung an MSC als therapeutische Maßnahme ist darauf zurück zu führen, dass die Anwendung schnell und sicher und die Gefahr eine Immunantwort auszulösen relativ gering sind.⁶⁷ Die Verwendung von Zellen zur Transplantation hat die Möglichkeit eröffnet, lebendes Gewebe zu transplantieren und scheint ein aussichtsreicher Kandidat für die Weiterentwicklung der regenerativen Medizin.^{65 14}

Einzelne Studien haben bereits den Effekt von PRF auf MSC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PRF die Proliferation von MSC erhöht, weshalb angenommen wird, dass PRF eine mitogene Aktivität besitzt. Des Weiteren stellte sich eine erhöhte Expression und Aktivität der alkalinen Phosphatase dar, welche als früher Marker der osteogenen Differenzierung dient.⁵²

1.4 Problematik

Ca. 20 Millionen Menschen weltweit erleiden pro Jahr eine Fraktur.⁷⁵ Damit sind Frakturen ein häufig auftretender Gewebeschaden und können einen unproblematischen bis schwerwiegenden Verlauf aufweisen. Schwere Fälle stellen Kliniker vor Herausforderungen und können unterschiedlichsten Ursachen entspringen. Neben Vorerkrankungen wie Diabetes oder Osteoporose, können auch schwere Weichteilschäden oder akute Infektionen Gründe für einen schweren Verlauf sein.^{76 77 29}

Ziel der Forschung ist die Entwicklung einer Behandlungsmethode, welche die Knochenheilung unterstützen und beschleunigen kann.

Ein optimales Produkt für die Behandlung sollte natürlichen und autologen Ursprungs sein, die eigene Wundheilung anregen und schnell herstellbar sein.¹⁸ Ein solches Material, welches alle Kriterien erfüllt, wurde bisher noch nicht beschrieben.³⁶

Dass PRF ein Produkt ist, welches Einfluss auf die Wundheilung nehmen kann und eine hohe Anzahl an Wachstumsfaktoren besitzt, ist bereits bekannt.⁵¹ Wie die Wechselwirkungen jedoch genau zwischen den ausgeschütteten Wachstumsfaktoren und anderen Zellen aussehen und was die zellulären Mechanismen sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist anzunehmen, dass sich die *in vivo* gezeigten Effekte auf die Wundheilung und Regeneration aus verschiedenen Studien auch *in vitro* darstellen lassen.⁵²

Besonders der Einfluss des PRFs auf MSC, welche an der Regeneration beteiligt sind und die Fähigkeit besitzen sich zu differenzieren, ist noch nicht umfassend geklärt.¹⁷ Dadurch, dass MSC eine bedeutende Rolle bei der Regeneration spielen^{78 12}, ist es von Bedeutung, diese Wechselwirkungen zu erforschen und Faktoren zu identifizieren, welche die Wundheilung hemmen. Durch die Beeinflussung oder sogar Neutralisierung der beteiligten Faktoren ist es eventuell möglich, die Frakturheilung zu verbessern.

Aktuell fehlen noch Studien, um den Effekt von PRF auf Gewebe ausreichend zu verstehen.⁵⁹

Eine wichtige Beobachtung bei der Erforschung von PRF ist, dass sich die Blutzusammensetzung bei Patienten situativ verändern kann und beispielsweise nach Traumata eine Anpassung der Zellen und der Wachstumsfaktoren erfolgt. Da PRF ein Blutprodukt ist, verändert sich auch diese Zusammensetzung.⁶ Diese Tatsache sollte bei Forschungsarbeiten beachtet werden, zumal verbesserte Therapiemöglichkeiten vor allem für Traumapatienten von Vorteil sein können.

1.5 Fragestellung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Trauma-aktiviertes PRF ein erhöhtes inflammatorisches Potenzial aufweist.⁶ Folglich wird vermutet, dass bei einer zu stark induzierten Inflammation durch das Trauma-aktivierte PRF das regenerative Potenzial eingeschränkt sein kann und die Gewebeheilung, zu denen auch die Frakturheilung gehört, vermindert ist.

MSC, welche in der Regel am Regenerationsprozess beteiligt sind, wird unter anderem ein antiinflammatorisches Potenzial zugesprochen.⁶⁴

Forschungsinhalt dieser Arbeit ist es, die MSC-PRF-Wechselwirkung darzustellen und Faktoren zu analysieren, die an diesem Zusammenspiel beteiligt sind, um das regenerative Potenzial dieser Kombination besser zu verstehen. Hier ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Beeinflussen PRF und MSC sich wechselseitig über lösliche Mediatoren?
- Führt Trauma-aktiviertes PRF zu einer allgemeinen metabolischen Aktivierung der MSC und proinflammatorischen Signalpfaden und später zu antiinflammatorischen Kompensationsprozessen?
- Führt das proinflammatorische Milieu durch Trauma-aktiviertes PRF zu einer verminderten regenerativen Aktivität der MSC?

Zur Beantwortung der formulierten Fragestellungen wurden die MSC mit Trauma-aktiviertem PRF von Probanden co-inkubiert und der PRF-Einfluss auf MSC jeweils nach einer gewissen Inkubationszeit (24, 72 und 120 Stunden) untersucht. Zu diesem Zweck wurden die metabolische Aktivität der MSC überprüft (MTT), die Faktoren im Überstand identifiziert (ELISA) und die Genexpression analysiert (PCR). Um den Einfluss des Trauma-aktivierten PRF herauszuarbeiten, wurden die Versuche simultan mit PRF von gesunden Probanden durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
8-Cap Strip	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
8-Tube Strip (0,2ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
A-PRF vacuum tube (10 ml)	Process for PRF, Nizza, Frankreich
Abdecktuch	Medline Industries Inc., Northfield, Illinois, USA
Biopsie-Einbettkassetten	Simport Scientific Inc., Quebec, Kanada
Blutentnahme-System, VacuMirage SmartSafe	PIC Solution Inc., Avignon, Frankreich
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Cryotubes (1,8 ml)	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon Polystyrene Round-Bottom Tube (5 ml)	Corning Inc., Corning, New York, USA
Falcon Tubes (15, 50 ml)	Greiere Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Handschuhe Peha-soft nitrile	Paul Hartmann AG (Hartmann Gruppe), Heidenheim, Deutschland

Insulinspritze (1 ml)	Terumo Europe NV, Leuven, Belgien
Multiwell (12 <i>Well</i>)	Corning Inc., Corning, New York, USA
Neubauer Zählkammer	NanoEnTec Inc., Seoul, Korea
Oil Red O Stain Kit (Red Oil O Solution, Propylenglycol, Hematoxylin)	Diagnostic BioSystems Inc., Pleasanton, Kalifornien, USA
Paraffin Paraplast Plus	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Pipettenspitzen (10,100,200,1000 µl)	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
PRF-Material (Schere, Pinzette, Schälchen, Mini <i>Tray</i> , Box inkl. Gewicht)	Process for PRF, Nizza, Frankreich
Reagiergefäße (0,5, 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Roti-Histokitt 2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlruhe, Deutschland
Serologische Pipetten/ costar Stripetten (5, 10, 25 ml)	Corning Inc., Corning, New York, USA
Skalpell (No. 23)	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Superfrost Plus Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
TC-Platte (6, 24, 96 <i>Well</i>)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland

Transwell (6,5mm Insert, 24 Well Plate, 0,4 µm Polycarbonate Membrane)	Corning Inc., Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Apparaturen

Apparaturen	Hersteller
Benchtop 96 tube working rack, Stratagene	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA
CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Duo Zentrifuge	Process for PRF, Nizza, Frankreich
FACScalibur-Durchflusszytometer	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Gefrierschrank -20°C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank +4°C bis -20°C	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
Mehrkanalpipette Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Zeiss Observer Z1 mit Zeiss AxioCam MRM und Power Supply	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Mikrotom RM 3235	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
NanoVue Spectrophotometer	NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, Delaware, USA
Pipetten (0,1-10, 2-20, 10-100, 20-200, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Plate Reader Infinite M200	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Realtime PCR-System, Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA
RNA-Zählung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortex	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Medien, Puffer und Lösungen

Lösung	Hersteller
1,9-Dimethyl-methylenblau (DMMB)	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Adrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
Accutase	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
Alazarinrot	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
Ammoniaklösung 28 %	BASF SE, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland
Ascorbinsäure	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
Chondrogenes Differenzierungsmedium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dexamethason	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco´s modified eagle´s medium (DMEM)	Life Technologies AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dulbecco´s phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride (PBS w/o)	Life Technologies AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
EtOH 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EtOH 70%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

EtOH 80%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EtOH 95%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 0,5-2%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
MesenCult MSC Basal Medium (Human) plus Stimulatory Supplements	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada
MSC adipogenic Differentiation Medium 2	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 5 M	Illinois Tool Works Inc., Chicago, Illinois, USA
Schwefelsäure 1 mol (2N H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
Turks Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylene ≥ 97%	Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Zinc Formal-Fixx	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
β-Glycerolphosphat	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada

Tabelle 4: FACS Antikörper

Material	Hersteller
APC CD90 clone 5E10	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
APC Mouse IgG ₁ κ Isotype Control 2 ml	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
CBL Anti-human CD105 1ml	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, Missouri, USA
FITC Mouse Anti-Human CD14 2 ml	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FITC Mouse Anti-Human CD34 2 ml	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
FITC Mouse IgG ₁ κ Isotype Control 2 ml	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
PE Mouse γ-1 100 µg	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
PerCP CD45 20 µl	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA
PerCP Rat Anti-Mouse IgG ₁	Becton, Dickinson and Company Corporation, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tabelle 5: ELISA

Material	Hersteller
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Human CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA, Lot P240830	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA, Lot P248952	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Human Indolamine 2,3- dioxygenase/IDO DuoSet ELISA Lot P231985	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Human VEGF DuoSet ELISA, Lot P245612	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Substrat Reagent	R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA

Tabelle 6: RNA-Isolierung und PCR

Material	Hersteller
AffinityScript PCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA
RNase-Free DNase Set	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay GAPDH (NM_002046.5) MAPK8 (NM_002750.3) MAPK14 (NM_001315.2) IL-6 (NM_000600) CXCL10 (NM_001565.3) IDO-1 (NM_002164.5) TNFAIP6 (NM_007115.3) VEGFA (NM_003376.5) RUNX2 (NM_004348) COL1A (NM_000088)	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
RT ² qPCR SYBR Green/ROX Master Mix-24	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland

2.2 Methoden

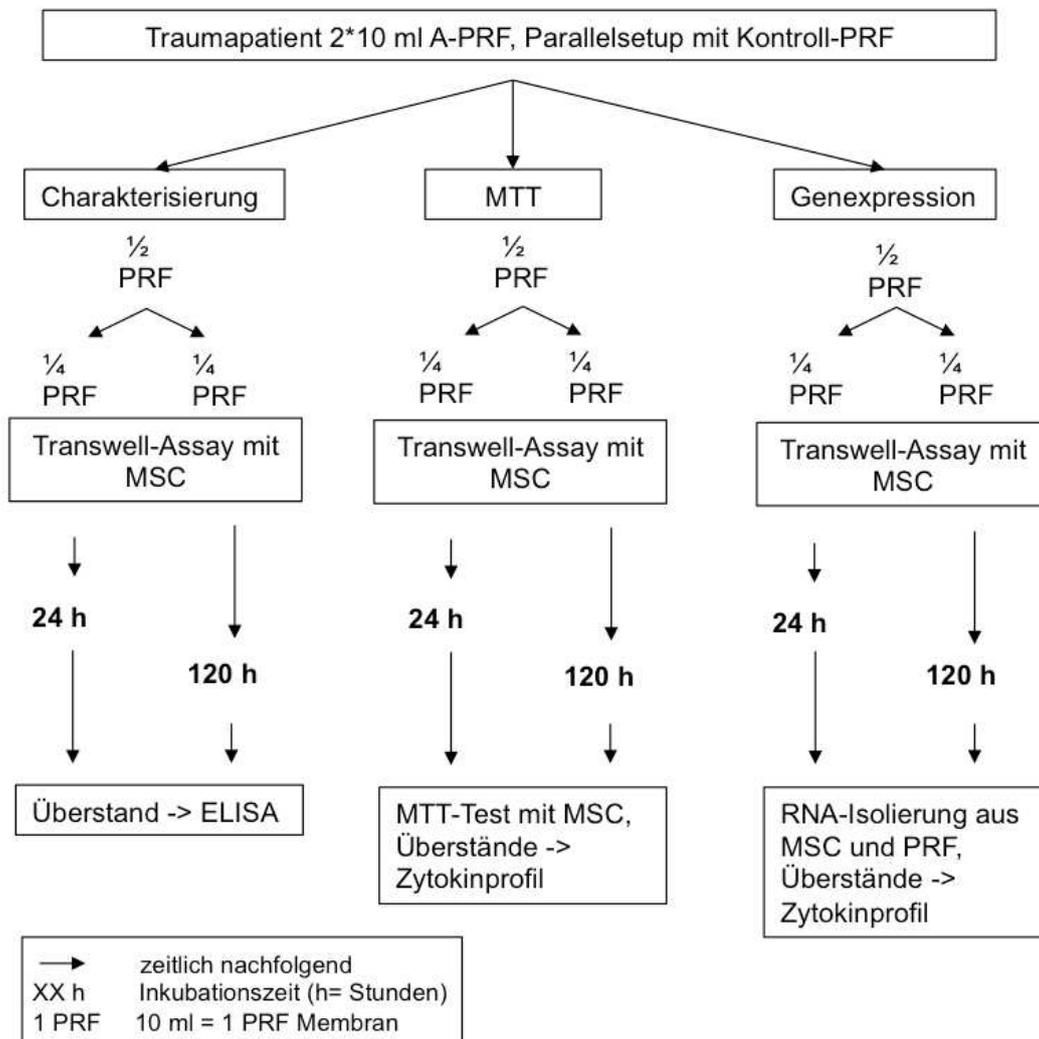


Abbildung 1: Übersicht Studiendesign. Dargestellt ist eine Übersicht über die geplanten Versuche, welche jeweils mit dem PRF von Traumapatienten und Probanden durchgeführt wurden.

2.2.1 Ethik

Die Verwendung von anonymisierten Knochenmarkproben zur Isolierung der MSC ist durch das Ethikvotum 329/10, die Abnahme von Blut von Traumapatienten und gesunden Probanden zur Generierung von PRF durch das Ethikvotum 68/17 abgedeckt.

2.2.2 MSC Isolierung und MSC-Pool-Herstellung

In dieser Studie wurden gepoolte MSC verwendet, um den Einfluss individueller Unterschiede zu verringern. Mononukleäre Zellen wurden durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus EDTA-antikoagulierten Knochenmarkproben (ca. 1–2 ml Volumen) isoliert.⁷⁹ Mononukleäre Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/cm² unter Verwendung von MesenCult + *Supplements* (im Folgenden als „vollständiges Medium“ bezeichnet) ausgesät und in 75-cm²-Kulturflaschen für zwei weitere Passagen nach Erreichen der Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann geerntet und 1×10^6 MSC jeweils pro 1 ml Einfriermedium, das aus 90 % FCS und 10 % DMSO bestand, in flüssigem Stickstoff gelagert bis die Zielzahl an Spendern erreicht war. Um den Pool zu erstellen, wurde ein Fläschchen mit MSC von jedem Spender aufgetaut und über eine weitere Passage in vollständigem Medium kultiviert. Die Zellen wurden dann enzymatisch abgelöst, gezählt und jeweils 1×10^6 MSC pro Spender gepoolt, zentrifugiert, in Gefriermedium resuspendiert und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3 Ansatz der Zellkultur aus kryokonservierten Zellen

Die kryokonservierten MSC wurden aus dem Stickstoff, in welchem sie bei -180°C gekühlt worden waren, entnommen und durch Schwenken im Wasser des Wärmebads bei einer Temperatur von 36°C aufgetaut. Anschließend folgten eine Resuspension in 7 Milliliter (ml) des vollständigen Mediums und

das Zentrifugieren bei 23°C und 420 g für 7 min. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen des Zellpellets in 10 ml Medium resuspendiert. Dafür wurden die Zellen durch ca. 5-maliges aspirieren mit der 10 ml Pipette vom Boden des Zentrifugenröhrchens gelöst. Die Zellen wurden danach in eine Zellkulturflasche überführt, um dort anzuhafeln und sich weiterzuentwickeln. Die Lagerung der Zellkulturflaschen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit.

2.2.4 Mediumwechsel der Zellkulturen

Nachdem die Zellkulturflaschen aus dem CO₂-Inkubator entnommen wurden und eine Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop erfolgte, wurde das verbrauchte Nährmedium komplett entfernt. Anschließend wurden 10 ml des neuen vollständigen Mediums hinzugegeben, welches vorher im Wärmebad bei 37°C erwärmt wurde. Der Mediumwechsel in den Zellkulturflaschen erfolgte dreimal wöchentlich.

2.2.5 Ablösen der Zellen und Verteilung auf Zellkulturflaschen

Das Ablösen der Zellen von den Zellkulturflaschen und die Aufteilung auf neue Zellkulturflaschen sind notwendig, wenn die Zellen konfluent gewachsen sind. Des Weiteren ist das Ablösen der Zellen notwendig, um die Zellen für weitere Versuche verwenden zu können.

Das Medium, welches sich in den Zellkulturflaschen befindet, wurde zu Beginn komplett entfernt. Anschließend wurden ca. 8 ml *Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride* (PBS) hinzugefügt und die Flasche für 8 min bei 37°C im Inkubator gelagert. Das PBS wurde wieder entfernt und 4 ml Accutase zugefügt. Es folgte eine weitere Inkubation für 8 min. Nach dieser Zeit sollten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst haben und als eine Trübung der Flüssigkeit wahrgenommen werden. Die Wirksamkeit der Maßnahme wurde zusätzlich

durch Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop überprüft. Im Idealfall hafteten die Zellen nicht mehr am Flaschenboden, sondern kugelten sich ab und schwammen frei in der Flüssigkeit.

Wenn die Zellen sich gelöst hatten, wurden 4 ml Nährmedium hinzugegeben, um die Reaktion der Accutase zu stoppen. Die insgesamt 8 ml wurden nachfolgend in ein 15 ml Falcontube gegeben und für 7 min bei 420 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet in 4 ml Nährmedium resuspendiert wurde. Dafür wurden die Zellen vom Boden des Falcontubes gelöst und mittels Pipette aspiriert, um Zellaggregate zu vereinzeln. Die 4 ml Zellsuspension wurden auf jeweils zwei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt, welche im Anschluss jeweils mit 8 ml Nährmedium aufgefüllt wurden, sodass die gesamte Füllmenge jeweils 10 ml betrug.

2.2.6 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Für die Zellzählung wurden die Zellen, wie in 2.2.5 beschrieben, aus den Zellkulturflaschen gelöst und in 4 ml des vollständigen Mediums resuspendiert. 20 µl wurden anschließend aus dem Falcontube entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Hinzu wurden 20 µl Türks-Lösung gegeben und die beiden Komponenten mithilfe des Vortex vermischt. Nachfolgend wurden 10 µl entnommen und vorsichtig in eine Kammer der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die vier 16er-Felder gezählt und der Mittelwert berechnet. Mithilfe folgender Gleichung konnte die Zellanzahl pro ml berechnet werden:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl im 16er-Feld} \times 10.000 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

In den vorliegenden Versuchen betrug der Verdünnungsfaktor 2.

2.2.7 Einfrieren von Zellen

Die Zellen mussten zuerst vom Boden der Zellkulturflasche gelöst werden. Dafür wurde, wie oben bereits beschrieben (2.2.5), PBS und Accutase verwendet. Die Zellen wurden nun in ein Falcontube überführt und für 5 min bei 420 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in einer Lösung, bestehend zu 90% aus *Fetal bovine serum* (FBS) und zu 10% aus Dimethylsulfoxid (DMSO). Jeweils ein Milliliter dieser Lösung wurde zur Resuspension verwendet und die Zellen wurden in ein gekühltes Kryoröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden nachfolgend über Nacht bei einer Temperatur von -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse ist eine Art Durchflusszytometrie, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, um MSC-typische Eigenschaften bei den verwendeten Zellen nachzuweisen.

Die Zellen in den Zellkulturflaschen wurden, wie in 2.2.5 bereits beschrieben, vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, wie in 2.2.6 beschrieben, gezählt und ein Volumen definiert, welches 100.000 Zellen enthielt. In 3 FACS-Röhrchen wurden jeweils 5 µl verschiedener Antikörper (AK) hinzugegeben. Das erste Röhrchen enthielt vier Kontrollantikörper, welche das Ausmaß an unspezifischen Bindungen nachweisen sollten. Hierzu wurden anti-mouse IgG₁, die entweder mit FITC, PerCP oder APC konjugiert waren, verwendet. In das zweite Röhrchen wurden Antikörper gegen humanes CD105-FITC, CD90-APC und CD45-PerCP gegeben, wobei MSC CD105 und CD90 exprimieren sollten, jedoch nicht den hämatopoetischen Marker CD45. Das dritte Röhrchen enthielt als weiteren hämatopoetischen Marker CD34-FITC. Zu den Antikörpern wurden jeweils 100.000 MSC in einem Volumen von jeweils 100 µl gegeben und eine Durchmischung der Komponenten mit Hilfe des Vortex durchgeführt. Die

Röhrchen wurden anschließend für 20 min im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Nach genannter Zeit wurden 2 ml PBS hinzugegeben und die Röhrchen für 5 min bei 350 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 250 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte am FACScalibur-Durchflusszytometer.

2.2.9 Osteogene Differenzierung (Alazarin Rotfärbung)

Um nachzuweisen, dass die verwendeten MSC sich osteogen differenzieren können, wurde eine Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, vom Flaschenboden gelöst, gezählt und ein Volumen definiert, welches 50.000 Zellen enthält. In einer 12-Well-Platte wurden in 4 Wells jeweils 50.000 Zellen ausplattiert. Zwei dieser Wells wurden mit 3 ml osteogenem Differenzierungsmedium aufgefüllt, während den anderen beiden Wells 3 ml Kontrollmedium hinzugefügt wurde. Beide Medien enthielten Mesencult Basalmedium und FBS. Das osteogene Differenzierungsmedium enthielt zusätzlich Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat. Es folgte eine Inkubation im CO₂-Inkubator für drei Wochen. Die jeweiligen Medien wurden zweimal wöchentlich ausgetauscht.

Nach drei Wochen Inkubation wurde das Medium komplett entfernt und 1,5 ml 0,5-2%-iges Formaldehyd für 30 Sekunden (sek) zum Fixieren in die Wells gegeben. Die Fixierlösung wurde komplett entfernt und der Zellrasen mit destilliertem Wasser ca. dreimal gespült. Anschließend wurden 1,5 ml der Färbelösung in die Wells pipettiert und die Wellplatte für 15 min dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Die Färbelösung enthielt 0,5 g Alazarinrot und 45 ml destilliertes Wasser. Bei der Herstellung der Färbelösung wurde unter ständigem Rühren zudem 5 ml einer 0,28%-igen Ammoniaklösung hinzugefügt. Um den pH-Wert der Lösung auf 6,36-6,40 einzustellen, wurde bis zum Erreichen dessen weiter Ammoniaklösung ergänzt.

Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Färbelösung vollständig entfernt und der Zellrasen erneut mit destilliertem Wasser gespült. Das Färbeergebnis wurde

mit dem Mikroskop bei 50-facher Vergrößerung überprüft und fotografisch dokumentiert.

2.2.10 Adipogene Differenzierung (Oil Red O Färbung)

Um zudem nachzuweisen, dass die MSC sich adipogen differenzieren können, wurde eine Oil Red O Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen, wie schon in 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, vom Flaschenboden gelöst, gezählt und ein Volumen definiert, welches 50.000 Zellen enthält. In einer 12-Well-Platte wurde in 4 Wells jeweils 50.000 Zellen ausplattiert. Zwei Wells wurden mit je 3 ml adipogenem Differenzierungsmedium aufgefüllt, während den anderen beiden Wells je 3 ml des vollständigen Mediums hinzugefügt wurde. Es folgte eine Inkubation im CO₂-Inkubator für drei Wochen. Die jeweiligen Medien wurden zweimal wöchentlich ausgetauscht.

Nach diesem Zeitraum wurde das Medium aus den Wells entnommen und die Platte zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Propylenglycol in die Wells gegeben und die Platte für 2 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Propylenglycol wieder entfernt und je 500 µl Oil Red O Solution in die Well gegeben. Die Wells wurden 10 min mit der Lösung inkubiert und nach dem Entfernen dieser erneut mit 500 µl Propylenglycol für 1 min inkubiert. Es folgte das zweimalige Waschen der Well-Platte mit H₂O und das Hinzufügen von 500 µl Hematoxylin für 1 min. Nach dieser Zeit wurde das Hematoxylin wieder entfernt und die Platte so lange mit H₂O gewaschen bis das H₂O klar war. Das H₂O verblieb in den Platten bis zur Anfertigung der Bilder mit dem Mikroskop Zeiss Observer Z1 und der Software Axio Vision.

2.2.11 Chondrogene Differenzierung

Ebenso wie für die osteogene und adipogene Differenzierung wurden für die chondrogene Differenzierung die Zellen, wie in 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, vom Flaschenboden gelöst und gezählt. Jeweils 200.000 Zellen wurden in vier

Wells einer 96-*Well*-Platte gegeben und in zwei dieser je 200 µl chondrogenes Differenzierungsmedium hinzugegeben. Zwei weitere *Wells* wurden mit je 200 µl des vollständigen Mediums gefüllt. Es folgte auch hier eine Inkubation im CO₂-Inkubator für drei Wochen. Die jeweiligen Medien wurden zweimal wöchentlich ausgetauscht.

Anschließend wurde das Medium entfernt und die *Wells* zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 200 µl 0,5-2%-iges Formaldehyd zum Fixieren für 15 min hinzugegeben. Nach dem Entfernen des Formaldehyds und anschließendem zweimaligem Waschen mit H₂O wurden die Pellets und der Zellrasen jeweils mit H₂O in ein Reagiergefäß überführt.

Als Vorbereitung für die nächsten Schritte wurde nachfolgend Paraffin bei 58°C geschmolzen. Die Pellets wurden in 1 ml 0,5-2%-iges Formaldehyd für 15 bis 60 min inkubiert. Das Pellet wurde mithilfe einer Pipette auf eine Kassette aufgetragen und die Kassette verschlossen. Das Präparat wurde durch Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Begonnen wurde mit einer zweimaligen, jeweils 10-minütigen Inkubation in je 100 ml 70%-igem EtOH, und anschließender Inkubation in 80%- und 95%-igem EtOH für je 10 min. Die Entwässerung wurde mit einer erneuten Inkubation in 100%-igem EtOH für 10 min weitergeführt. Der letzte Schritt wurde insgesamt dreimal mit frischen EtOH wiederholt. Danach wurden die Pellets in eine Lösung, bestehend aus einer 1:1 Mischung aus EtOH und Xylen, für 10 min überführt, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation in einer 1:2 Mischung von EtOH und Xylen. Die Pellets wurden anschließend vom Alkohol gereinigt, indem sie zweimal jeweils für 10 min in 100%-igem Xylen inkubiert wurden. Für die Paraffininfiltration wurden die Pellets für 30 min in 100 ml einer 2:1 Mischung bestehend aus Xylen und Paraffin inkubiert. Dieser Schritt und alle anschließenden wurden bei 58°C durchgeführt, soweit nicht anders beschrieben. Nachfolgend wurden die Lösung entfernt und eine Inkubation mit einer 1:1 Mischung von Xylene und Paraffin unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach erneutem Entfernen der Lösung erfolgte eine Inkubation in 100 ml einer 1:2 Mischung aus Xylene und Paraffin für weitere 30 min. Die finale Infiltration sah eine Inkubation in 100%-igem Paraffin für 2 Stunden vor. Danach wurden die Pellets zum zweiten Mal in 100%-iges Paraffin gelegt und über Nacht bei 58°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Pellets vorsichtig

mit einer Pinzette in eine Gussform gegeben und Paraffin hinzugegeben. Um das Paraffin zu festigen, folgte eine Inkubation für 30 min bei 4°C. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 2 µm angefertigt und diese auf jeweils einen Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden über Nacht zum Austrocknen gelagert und so lange bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis sie gefärbt werden konnten.

Für die Färbung, welche bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, wurden die Schnitte zweimalig für 5 min in Xylol überführt. Anschließend wurden diese für jeweils 3 min in 95%-, 75%-, 50%- und 25%-igen EtOH gegeben. Nach diesen Vorgängen erfolgte die Waschung mit destilliertem Wasser. Nachfolgend wurde 0,1%-ige DMMB-Lösung mit einem pH von 3.0 für 1-2 min auf die Schnitte gegeben und diese anschließend für 1 min mit Wasser gewaschen. Es folgte die Inkubation für 5 min mit 80%-igem, 90%-igem und zweimal mit 100%-igem Propanol, bevor zweimalig die Schnitte für 3 min in Xylol gegeben wurden. Die Schnitte wurden in ein Roti-Histokitt 2 eingedeckt und im Anschluss unter dem Mikroskop Zeiss Observer Z1 und der Software Axio Vision betrachtet und fotografiert.

2.2.12 PRF-Herstellung und Weiterverarbeitung

Den Probanden wurde mithilfe des Blutentnahmesystems 2 Röhrchen Blut entnommen. Bei den verwendeten Röhrchen handelt es sich um spezielle A-PRF-Röhrchen aus Glas mit einem Abnahmevolumen von 10 ml. Direkt nach der Abnahme erfolgte das Zentrifugieren des Blutes in der Duo-Zentrifuge, welche speziell für das Zentrifugieren von PRF entwickelt wurde. Mit dem A-PRF-Programm wurde das Blut für 8 min bei 208 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren und einer 10-minütigen Wartezeit wurde der PRF-*Clot* unter sterilen Bedingungen und Verwendung sterilisierter Instrumente mit einer Pinzette aus dem Röhrchen entnommen und die rote Blutbestandteile mit einer Schere so weit wie möglich entfernt. Nun wurde der *Clot* auf ein Gitter gelegt und für 3 min mit einem Gewicht beschwert, um die Form des *Clotes* zu einer Membran zu verändern und die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen.

Danach konnte diese Membran in vier gleichgroße Viertel geteilt werden, wobei hierfür Längsschnitte gewählt wurden, damit die Bestandteile der jeweiligen Viertel möglichst identisch waren. Jedes Viertel wurde jeweils in ein *Transwell* mit einer Porengröße von 0,4 μm gegeben und in ein *Well* der 24-*Well*-Platte eingehängt. Die *Well*böden der Platten wurden 2 Tage vorher mit jeweils 20.000 MSC beschichtet (Vorgehen siehe 2.2.5 und 2.2.6) und das *Well* mit 1,5 ml Mesencult-Medium aufgefüllt. Das PRF im *Transwell* war von dem Medium komplett bedeckt.

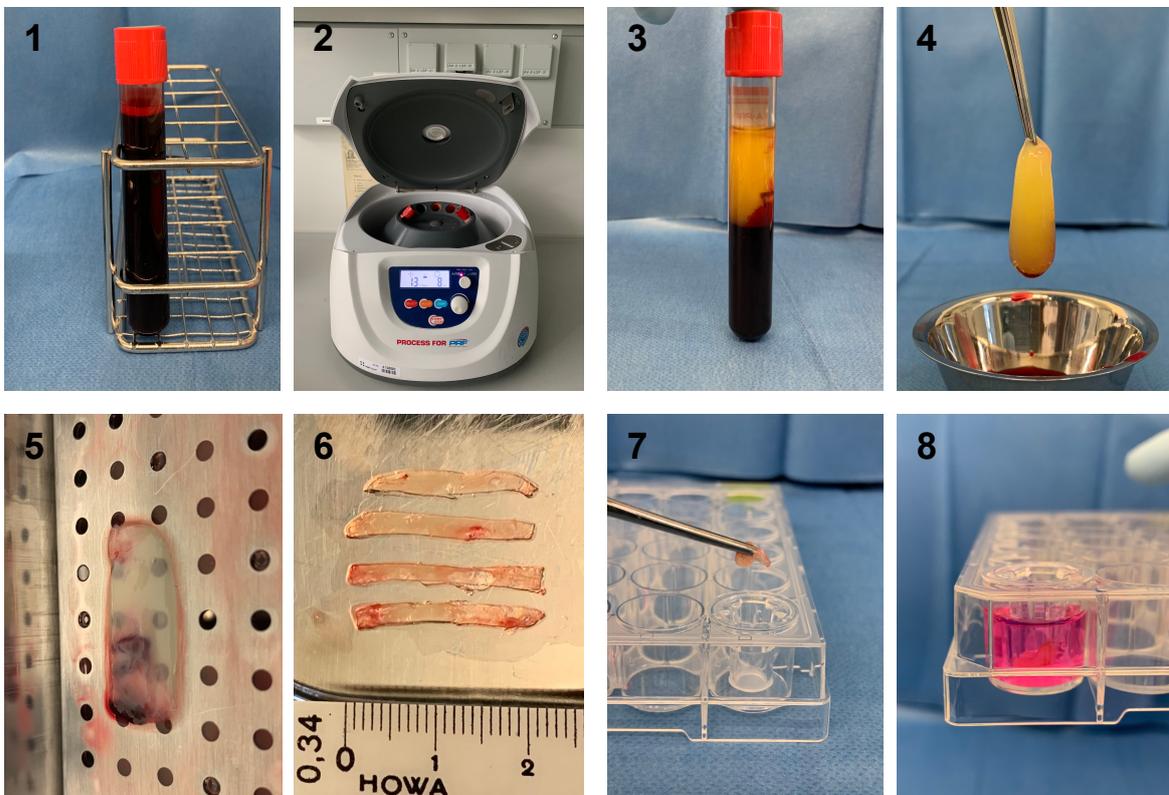


Abbildung 2: Herstellung PRF. Die Abbildung stellt die verschiedenen Schritte der PRF-Herstellung dar. Nach Gewinnung des Blutes (1) erfolgte das Zentrifugieren mit der Duo Zentrifuge (2). Der PRF-Clot wurde mit einer Pinzette entnommen (3+4) und durch Beschweren auf einer Platte zu einer Membran geformt (5). Durch Längsteilung mit einem Skalpell entstanden 4 gleich große Membranen (6), welche in die *Transwells* gegeben werden konnten (7), die wiederum in die *Well*-Platten eingehängt wurden (8). Die *Wells* waren mit Medium gefüllt und bedeckten die PRF-Membranen.

Die Inkubationszeit der MSC mit dem PRF betrug entweder 24 oder 120 Stunden. Nach der jeweiligen Zeit wurden die *Transwells* entfernt und die Zellen und das Medium für die Versuche verwendet. Nach 72 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel bei der Platte mit der 120-stündigen PRF-Inkubationszeit. Das Medium wurde bei diesem Wechsel aufgefangen und eingefroren. Die *Transwells* wurden während des Mediumwechsels kurzzeitig entfernt und anschließend für die weitere Inkubation wieder eingehangen.

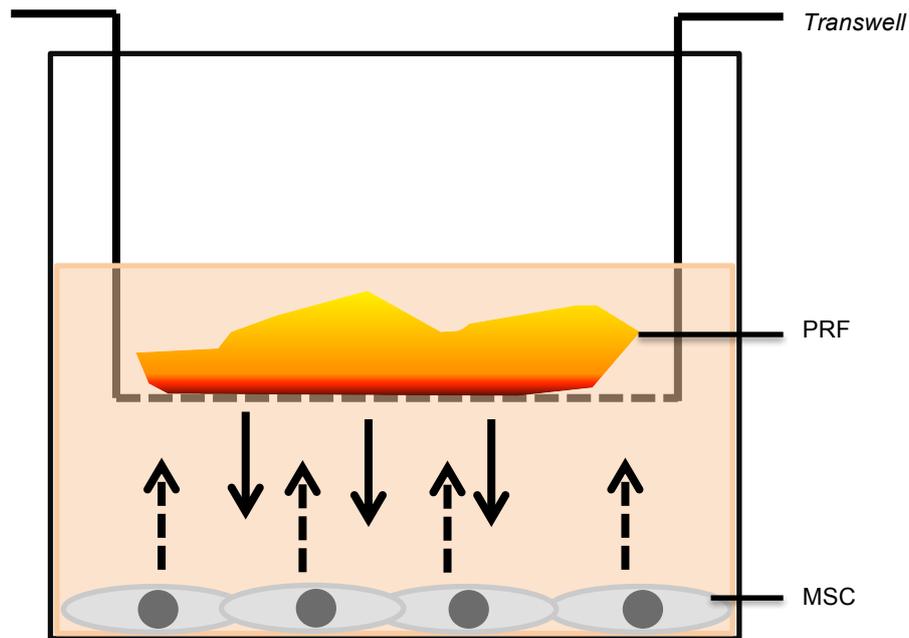


Abbildung 3: Versuchsaufbau PRF. Dargestellt ist ein *Well* der 24-*Well*-Platte. Am Boden des *Wells* sind MSC dargestellt, welche sich im Nährmedium befinden. In das *Well* ist ein *Transwell* mit PRF eingehangen. Die Pfeile stellen den Austausch zwischen dem PRF und den MSC dar.

2.2.13 MTT-Test

Um die metabolische Aktivität der Zellen zu überprüfen, wurde auf den MTT-Test zurückgegriffen.

Für den Versuch wurden die in 2.2.12 beschriebenen vorgefertigten *Well*-Platten verwendet und die Testungen je nach 24-stündiger und nach 120-

stündiger Inkubation der MSC mit PRF durchgeführt. Das PRF-*Transwell* wurde zusammen mit dem Medium entfernt und es wurden 300 µl Mesencult-Medium und 30 µl MTT-Labeling-Reagenz hinzugefügt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C folgte die Zugabe von 300 µl der Solubilisierungslösung. Am nächsten Tag erfolgte die Übertragung von jeweils 100 µl pro *Well* in eine 96-Well-Platte und anschließend die Messung mit Hilfe des Spektralphotometers „Magellan“.

2.2.14 ELISA

Mit dem ELISA-Verfahren (Enzym-linked Immunosorbent Assay) wurden in der vorliegenden Arbeit die Faktoren IL-6, CXCL1, VEGF undIDO-2 im Überstand gemessen.

Zur Beschichtung der *Well*platten wurden je 100 µl der Capture-Antikörper-Mischung, bestehend aus 100 µl Antikörper und 11,9 ml PBS, in die *Wells* gegeben und die Platte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit *Wash Buffer* wurden 300 µl des *Reagent Diluent* (PBS + 1% BSA) pro *Well* hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die *Wells* drei weitere Male gewaschen und anschließend 100 µl Standard Lösung, zusammengesetzt aus 20 µl Probe und 1180 µl *Reagent Diluent*, hinzugefügt. Eine Inkubationszeit von 2 Stunden, ebenfalls bei Raumtemperatur, wurde eingehalten. Anschließend wurden die *Wells* dreimal gewaschen. Dieser Vorgang wurde mit 100 µl *Detection*-Antikörper (200 µl Antikörper und 11,8 ml *Reagent Diluent*) wiederholt bevor die *Wells* mit 100 µl HRP-Streptavidin (300 µl Streptavidin und 11,7 ml *Reagent Diluent*) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden 100 µl Substrat pro *Well* hinzugegeben und die Platte für 20 min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden pro *Well* 50 µl Stop-Reagenz (Schwefelsäure 1 M) hinzugefügt und die Messung am *Plate Reader Infinite M200* bei 450 nm durchgeführt.

2.2.15 RNA-Isolierung

Das PRF-*Transwell* wurde nach 24-stündiger bzw. 120-stündiger Inkubation aus den *Wells* entfernt und das Medium zum Einfrieren in Kryoröhrchen gegeben. Die *Wells* wurden mit jeweils 350 µl RLT RNA-Lyse Buffer, bestehend aus 1000 µl RLT-Puffer und 10 µl β_2 -Mercaptoethanol (Endkonzentration 1% v/v), befüllt und für 3 min inkubiert. Danach wurde der *Well*boden mehrmals mit der Lyselösung abgespült und das Material in ein Kryoröhrchen überführt. Mittels Insulinspritze wurde anschließend die DNA geschert, in dem die Flüssigkeit dreimal in die Spritze gedrückt wurde. Der Inhalt wurde bei -80°C eingefroren.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die 350 µl Lysat aufgetaut und zusammen mit 350 µl Ethanol (70%) auf eine RNeasy-Säule gegeben. Es folgte das Zentrifugieren bei 10.000 g für 15 sek. Das Eluat wurde verworfen, 350 µl RW1-Puffer auf die RNeasy-Säule aufgetragen und die Gefäße erneut zentrifugiert. Nachdem das Eluat wieder verworfen wurde, wurde eine Mischung aus 10 µl DNase-Stock und 70 µl RDD-Puffer auf die RNeasy silica-gel Membran gegeben. Es folgten eine 15-minütige Inkubation und die anschließende Zugabe von 350 µl RW1-Puffer. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Sammelgefäße der einzelnen RNeasy-Säulen ausgetauscht und 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben. Das Eluat wurde nach wiederholtem Zentrifugieren verworfen und erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 13.000 g für 2 min. Es wurden, nachdem das Eluat verworfen wurde, 25 µl DEPC-Wasser auf die Membran aufgetragen und eine Einwirkzeit von 2 min abgewartet. Die letzte Zentrifugation erfolgte bei 10.000 g für 1 min. Der RNA-Gehalt wurde mit einem NanoVue Spektrophotometer gemessen und die Proben anschließend auf Eis gestellt.

2.2.16 cDNA-Synthese

Im nächsten Schritt wurde die RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt. Hierfür wurde eine Lösung bestehend aus 10 µl MasterMix, 3 µl Oligo DT Primer und 1 µl Reverse Transkriptase hergestellt. Diese 14 µl wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 6 µl der isolierten RNA hinzugegeben. Im Thermocycler Biometra wurden die Proben erst für 5 min bei 25°C, dann für 15 min bei 42°C und abschließend für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend folgte die Lagerung bei -80°C.

2.2.17 Realtime PCR

Um die PCR durchzuführen, wurde ein Master-Mix-Ansatz vorbereitet. Dieser enthielt jeweils 12,5 µl SYBR Green, 6,5 µl destilliertes Wasser und 1 µl Primer. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Primer für 10 verschiedene Gene verwendet: GAPDH, MAPK8, MAPK14, IL-6, CXCL10, IDO-1, TNFAIP6, VEGFA, RUNX2 und COL1A.

Die 20 µl des Master-Mix-Ansatzes wurden in einen *8-strip cup* pipettiert, welcher durch eine vorgekühlte Metall-Rack gehalten wurde.

Zu diesem Ansatz wurden jeweils 5 µl des cDNA-Mixes hinzugegeben. Dieser cDNA-Mix bestand aus 3 µl destilliertem Wasser und aus 2 µl cDNA, welche im Versuch 2.2.15 und 2.2.16 vorbereitet wurde.

Nach kurzem Vermengen durch Zentrifugieren wurden die Proben in den PCR-Cycler gestellt. Hierzu wurde das PCR-System Mx3005P verwendet. Die Temperatur des Systems betrug einmalig für 10 min 95°C, bevor 45 Zyklen à 15 sek bei 95°C und für eine Minute bei 60°C stattfanden. Anschließend folgte die Schmelzkurvenanalyse. Die Ergebnisse wurden mittels Ct-Werte dargestellt und die Genexpression mit der delta-CT-Methode berechnet, wobei die Expression des *housekeeping* Gens GAPDH als Referenz diente.

2.2.18 Statistik

Die Ergebnisse werden als Boxplots des Medians abgebildet. Die Grenzen der Boxen werden durch die Interquartilsränge bestimmt. Angaben im Text sind, wenn nicht anders angegeben, Mediane. Statistische Vergleiche wurden bei zwei Vergleichsgruppen mit dem Wilcoxon Mann Whitney-U-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Vergleichsgruppen wurde der Kruskal Wallis-Test mit multiplen Bonferroni-Holm korrigierter Conover Iman posthoc Analyse durchgeführt. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet; ein p -Wert $< 0,1$ als ein statistischer Trend.

2.2.19 Patientenkollektiv

Die Teilnahme der Patienten erfolgte freiwillig. Alle Patienten wurden über die Studieninhalte sowie die Blutabnahme für die PRF-Herstellung informiert und erteilten ihre Zustimmung. Die Genehmigungsnummer der Ethikkommission ist 329/10.

Eingeschlossen in die Gruppe der Traumapatienten, vereinfacht in der Studie als Traumagruppe bezeichnet, wurden volljährige Patienten mit einem Trauma an einer Extremität. Bis auf eine Ausnahme wurde das Blut der Patienten am 1. postoperativen Tag abgenommen, wobei die Operation als Trauma gewertet wurde und somit traumaähnliche Bedingungen geschaffen wurden. Die Kontrollgruppe, zur Vereinfachung im Weiteren Probandengruppe genannt, bestand aus volljährigen, gesunden Probanden ohne vorliegendes Trauma. Die Patientendaten wurden dem klinikinternen ORBIS System entnommen. Die Auswertung der Daten erfolgte pseudonymisiert, sodass von dieser keine Rückschlüsse auf die Patienten gezogen werden können.

3. Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Tabelle 7: Patientencharakteristika Traumagruppe: Dargestellt sind das Geschlecht (m= männlich, w= weiblich), das Alter in Jahren (a), die vergangenen Tage (d) seit dem Trauma (Unfall) und der OP und das vorliegende Trauma.

Trauma- patient	Geschlecht (m/w)	Alter (a)	post Trauma (d)	post OP (d)	Trauma
1	m	30	6	1. Präop	Radiusköpfchen- fraktur
2	w	32	9	1	distale Radiusfraktur
3	w	81	14	1	Ruptur der Sehne des Musculus extensor pollicis longus
4	m	30	3 Jahre	1	Metallentfernung (Platte und Schrauben) Tibia
5	w	42	5	1	supracondyläre Humerus- Trümmerfraktur
6	m	33	4	1	dislozierte Olecranonfraktur
7	m	59	15	1	distale Radiusfraktur

Während in der Traumagruppe 57% der Patienten männlich waren, lag der Anteil in der Probandengruppe bei 43%. Das Durchschnittsalter der Traumagruppe lag mit 44 Jahren 6 Jahre über dem Durchschnittsalter der Probandengruppe (Durchschnittsalter 38 Jahre). Ein Traumatpatient, bei dem noch keine Operation durchgeführt wurde, der aber vor kurzer Zeit (6 d) ein Trauma erlitten hatte, wurde in die Studie eingeschlossen. Bei diesem Patienten zeigte sich, im Vergleich mit dem Median der Werte der Traumagruppe, eine 80% geringere Aktivität der MSC im MTT nach 120 Stunden Inkubation mit dem PRF dieses Patienten. Des Weiteren konnten im ELISA nach 120 Stunden 62% mehr IL-6 und 35% mehr VEGF im Vergleich zur Traumagruppe nachgewiesen werden sowie nach 72 Stunden 52% mehr VEGF. Im Gegensatz dazu lagen die Werte von IDO-2 nach 120 Stunden 55% unter dem Median der anderen Traumatpatienten.

Darüber hinaus lag bei Traumatpatient 4 neben der Operation am Vortag kein weiteres Trauma vor, da sich der eigentliche Unfall 3 Jahre zuvor ereignet hatte. Es zeigte sich im ELISA eine um 54% erhöhte Konzentration an IL-6 nach 24 Stunden und eine um 44% erniedrigte IL-6-Konzentration nach 72 Stunden im Vergleich zu den anderen Traumatpatienten. Die VEGF-Konzentration lag zu allen Messzeitpunkten unter dem Median der Vergleichswerte, während IDO-2 stetig über dem Vergleich lag.

Ein weiterer Vergleich wurde bezogen auf das Alter durchgeführt. Bei der Gegenüberstellung von Traumatpatientin 3, welche mit 81 Jahren 37 Jahre über dem Durchschnittsalter ihrer Gruppe lag, fielen beim ELISA des IL-6 um 54% höhere Werte nach 72 Stunden und um 59,5% höhere Werte nach 120 Stunden im Vergleich zum Median der Traumagruppe auf. Zudem lagen die Messwerte von VEGF bei dieser Patientin stetig über denen der Vergleichsgruppe, auffallend nach 72 Stunden mit einem um 104% höheren Wert. Die IDO-2-Konzentration lag nach 72 Stunden um 55% höher als der Median der Traumagruppe.

Tabelle 8: Probandencharakteristika: Dargestellt sind das Geschlecht (m= männlich, w= weiblich) und das Alter in Jahren (a) der gesunden Probanden.

Proband	Geschlecht (m/w)	Alter (a)
1	w	32
2	w	22
3	m	23
4	w	58
5	m	52
6	w	45
7	m	34

3.2 Vorversuche

In den Vorversuchen sollte gezeigt werden, dass es sich bei den verwendeten Zellen um MSC handelt. Dafür wurden Eigenschaften wie die Granularität und das Volumen überprüft sowie die Bindungsaffinität zu CD105 und CD90 und die Differenzierungsfähigkeit.

3.2.1 Charakterisierung der MSC

Für die Charakterisierung der MSC wurde eine FACS-Analyse hinzugezogen und es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zellen die typische Granularität und Größe von MSC aufweisen (siehe Abbildung 4).

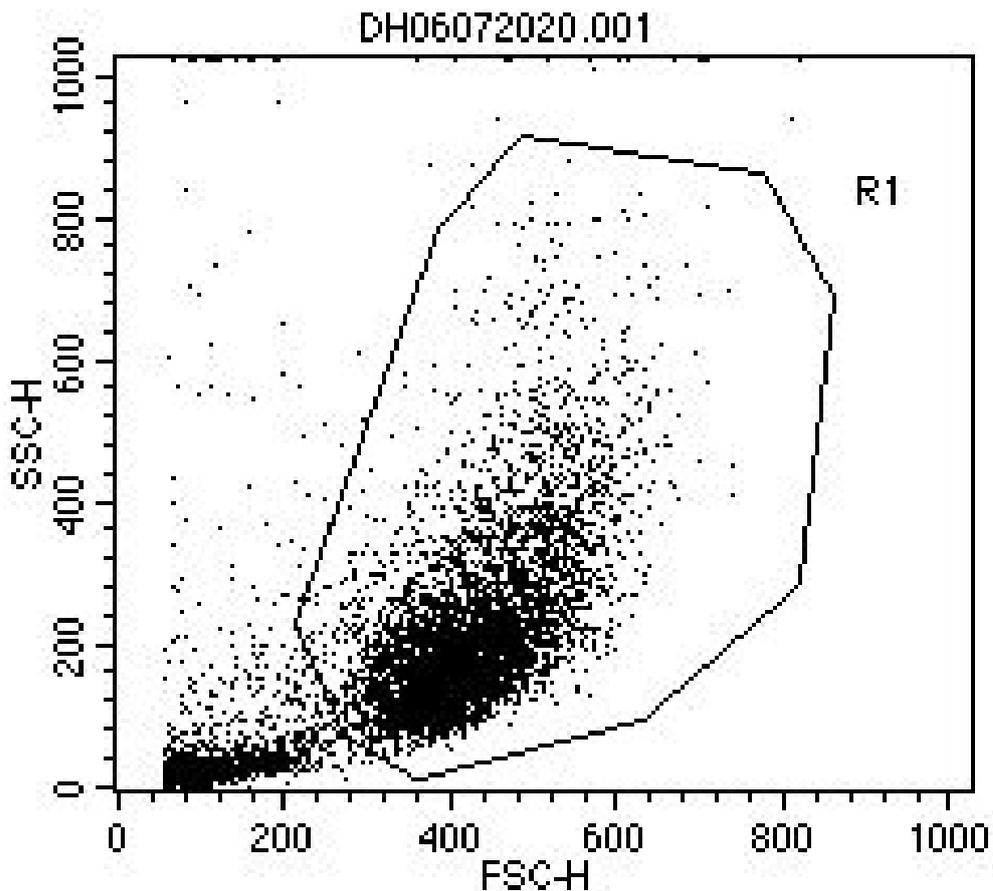


Abbildung 4: Ergebnisse der FACS-Analyse zum Nachweis von MSC.

Die Abbildung bestätigt, dass die verwendeten Zellen Eigenschaften von MSC aufweisen. Auf der Abszisse ist das Vorwärtsstreulicht (FSC) dargestellt, welches Auskunft über die Größe der Zelle gibt. Die Ordinate beschreibt das Seitwärtsstreulicht (SSC), welches abhängig von der Granularität der Zellen ist. Die Volumen- und Granularitätsanforderungen von mesenchymalen Stammzellen sind durch die schwarze Eingrenzung markiert.

Die MSC des Zellpools exprimierten die beiden MSC-assoziierten Marker CD90 und CD105 und zeigten keine relevante Expression der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 (Abbildung 5).

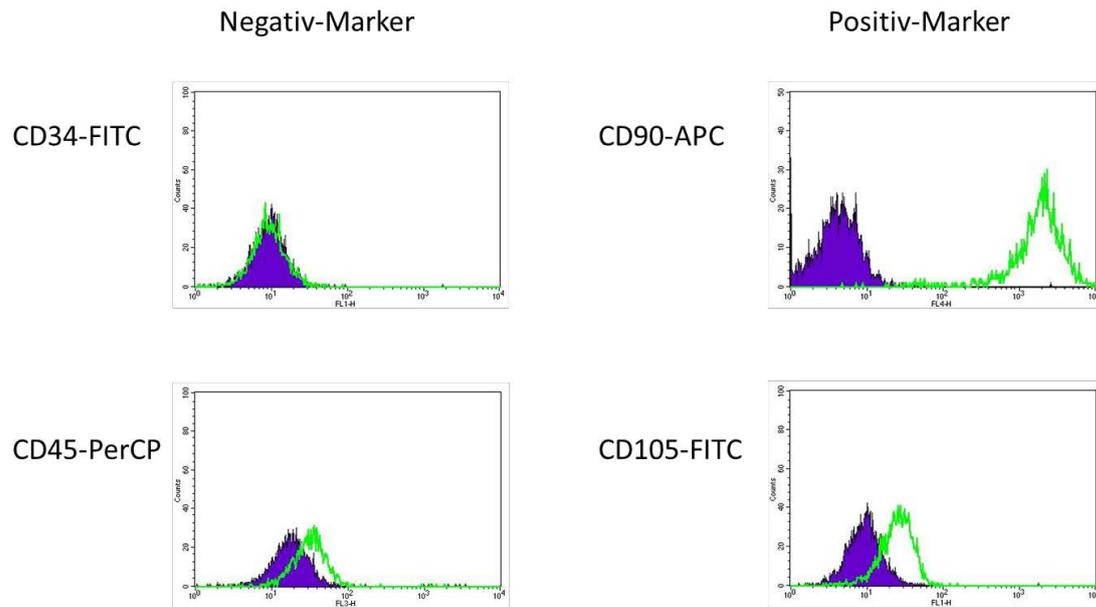


Abbildung 5: FACS Analyse zur Charakterisierung des MSC-Pools. Rezeptorexpressionen (grüne Linie) werden im Vergleich zur jeweiligen Isotypenkontrolle (violett ausgefüllt) in Histogrammdarstellung präsentiert. Die verwendeten Zellen wiesen keine bzw. nur eine sehr schwache Expression der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 auf, während eine signifikante Expression der MSC-Marker CD90 und CD105 detektiert werden konnte.

3.2.2 Differenzierbarkeit der MSC

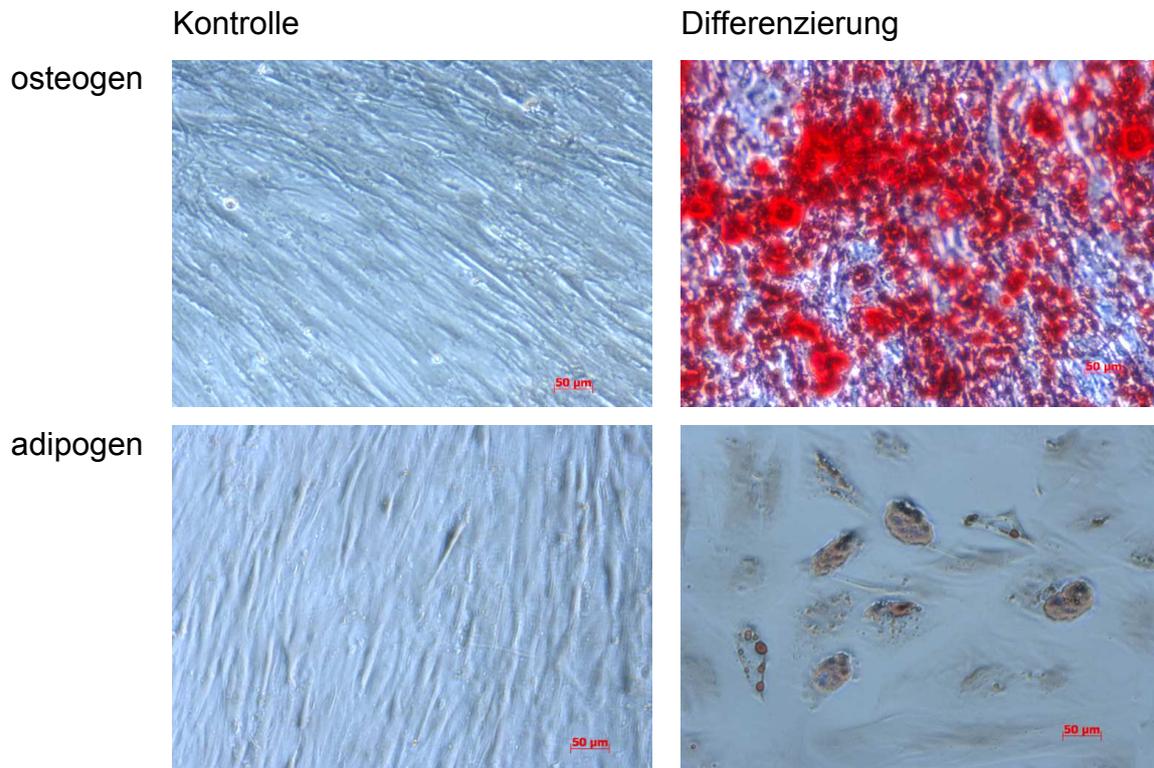


Abbildung 6: Differenzierbarkeit MSC in Osteoblasten und Adipozyten. Die Aufnahmen zeigen, dass die verwendeten MSC das Potenzial besitzen sich in osteogene und adipogene Zellen zu differenzieren. Zu sehen sind die vergrößerten Aufnahmen der differenzierten Zellen im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen bei der Kontrolltestung.

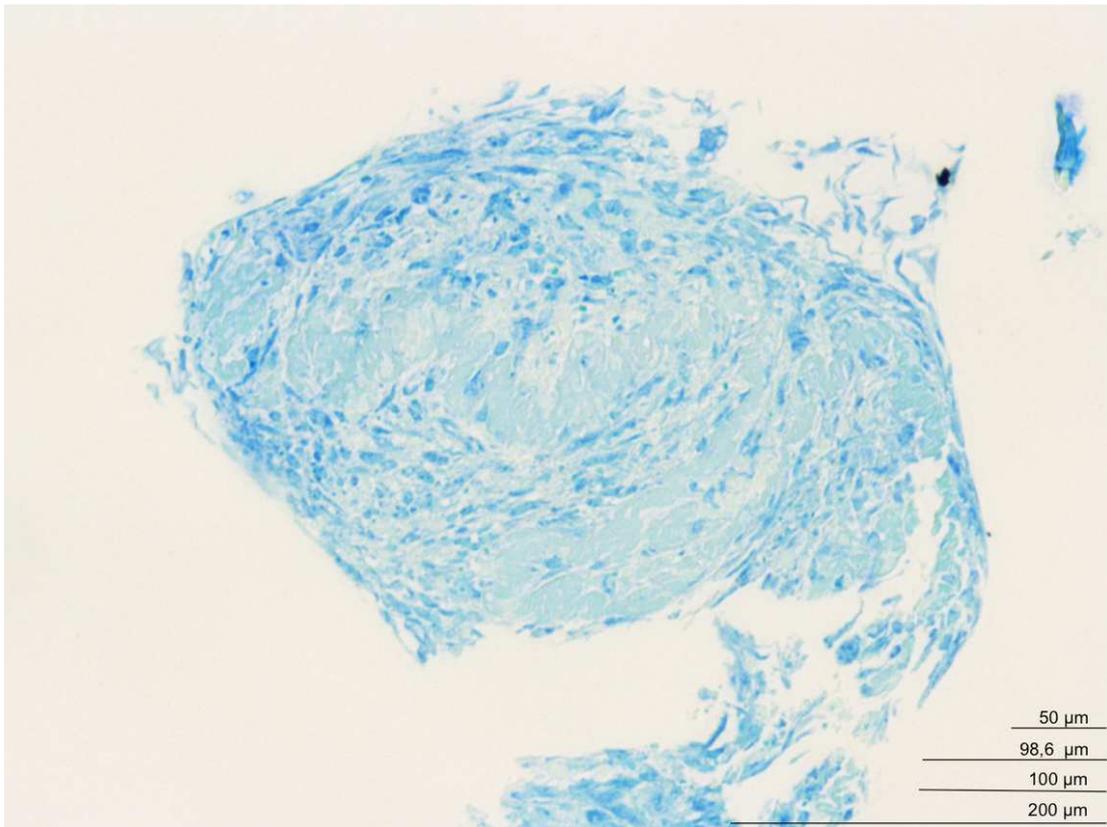


Abbildung 7: Differenzierbarkeit MSC in Chondrozyten. Dargestellt ist ein Pellet der chondrogenen Differenzierung, welches zeigt, dass die verwendeten MSC sich chondrogen differenzieren können.

Um die Differenzierungsfähigkeit der MSC zu überprüfen, wurden die MSC erst zur Differenzierung angeregt und im weiteren Schritt durch eine Färbung dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen des MSC-Pools bei Kultivierung mit osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium in die jeweilige Zellreihe differenzieren können (Abbildung 6). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die MSC die Fähigkeit besitzen sich chondrogen zu differenzieren (Abbildung 7). Demnach weisen sie die charakteristische Eigenschaft von MSC auf, sich in diese Zelltypen zu entwickeln.

3.3 Messung der Metabolischen Aktivität der MSC (MTT-Test)

Mit Hilfe der MTT-Testung wurde die metabolische Aktivität der MSC nachgewiesen. Die MSC wurden dafür jeweils für 24 oder 120 Stunden mit PRF von Traumpatienten oder von gesunden Probanden co-inkubiert und anschließend in den MTT, wie unter Punkt 2.2.13 beschrieben, eingesetzt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt mittels Boxplots, wobei die verglichenen Boxplots, welche einen signifikanten Unterschied oder statistischem Trend aufweisen jeweils mit einer Verbindungslinie über dem Boxplot gekennzeichnet sind.

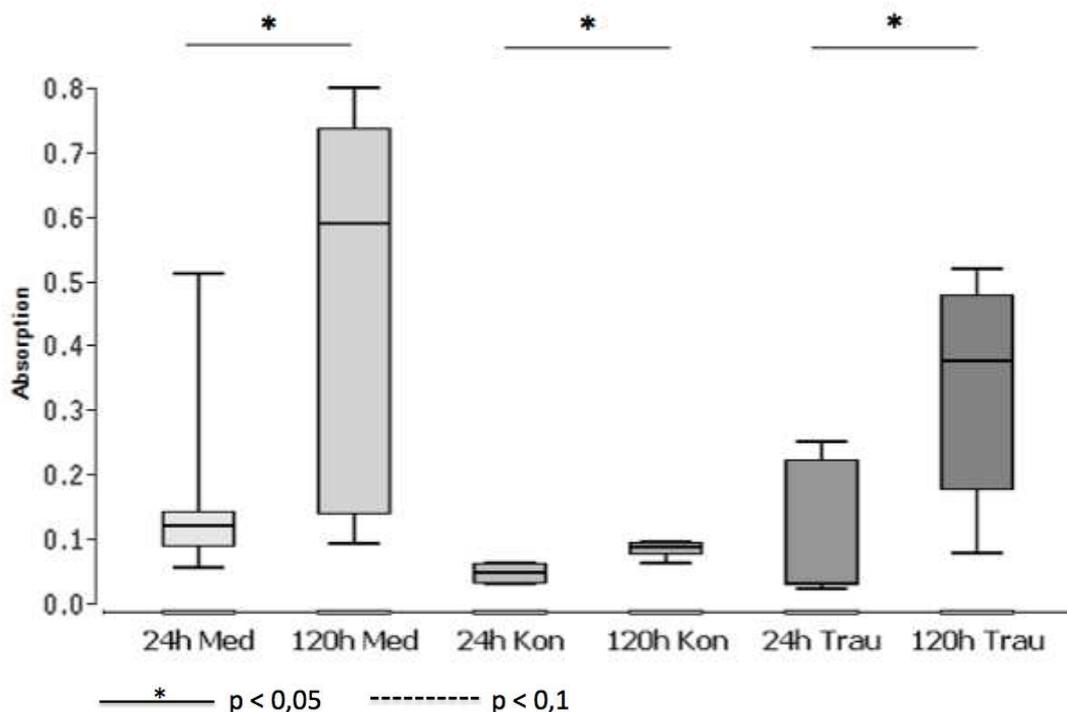


Abbildung 8: Metabolische Aktivität der MSC nach co-Inkubation mit PRF im Zeitverlauf. Gezeigt werden die Ergebnisse des MTT-Tests mittels der Absorptionen. Eine signifikant höhere Aktivität der MSC konnte in jeder Gruppe zum zweiten Messzeitpunkt verglichen mit dem ersten festgestellt werden. Die MSC wurden jeweils 24 Stunden oder 120 Stunden (= h) mit PRF co-inkubiert. Die sechs Boxplots stellen die drei verschiedenen Gruppen (Mediumkontrolle (= Med), Kontrollgruppe (= Kon, gesunde Probanden) und Traumagruppe (= Trau)) im zeitlichen Verlauf dar.

Es zeigte sich innerhalb aller Gruppen ein signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität von 24h auf 120 h.

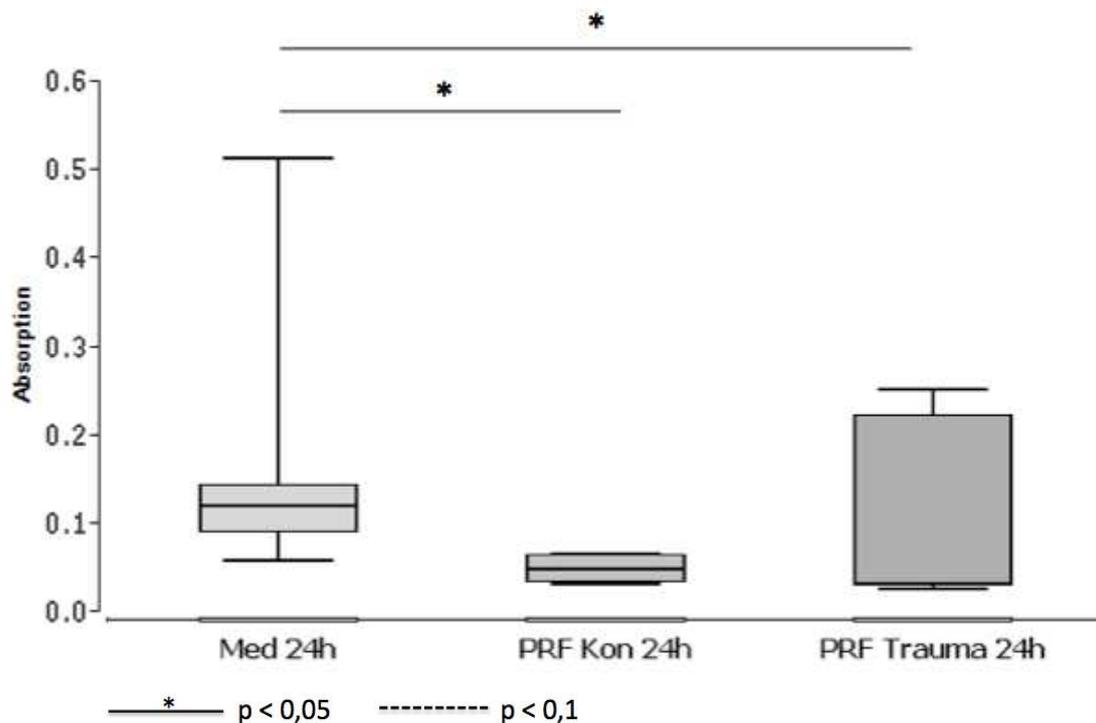


Abbildung 9: Verringerung der metabolischen Aktivität nach 24h co-Inkubation mit PRF. Gezeigt werden die Ergebnisse des MTT-Tests mittels der Absorptionswerte. Es wurden signifikant niedrigere Werte in der Kontroll- (= PRF Kon, gesunde Probanden) und in der Traumagruppe (= PRF Trauma) verglichen mit der Mediumkontrolle (= Med) gemessen.

Nach 24 Stunden co-Inkubation konnte im Vergleich zur Mediumkontrolle eine signifikant niedrigere metabolische Aktivität bei den MSC gemessen werden, welche mit PRF co-inkubiert worden sind. Dies war unabhängig davon, ob es sich um PRF von Traumapatienten oder gesunde Probanden gehandelt hat. Zwischen den gesunden Probanden und der Traumagruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität.

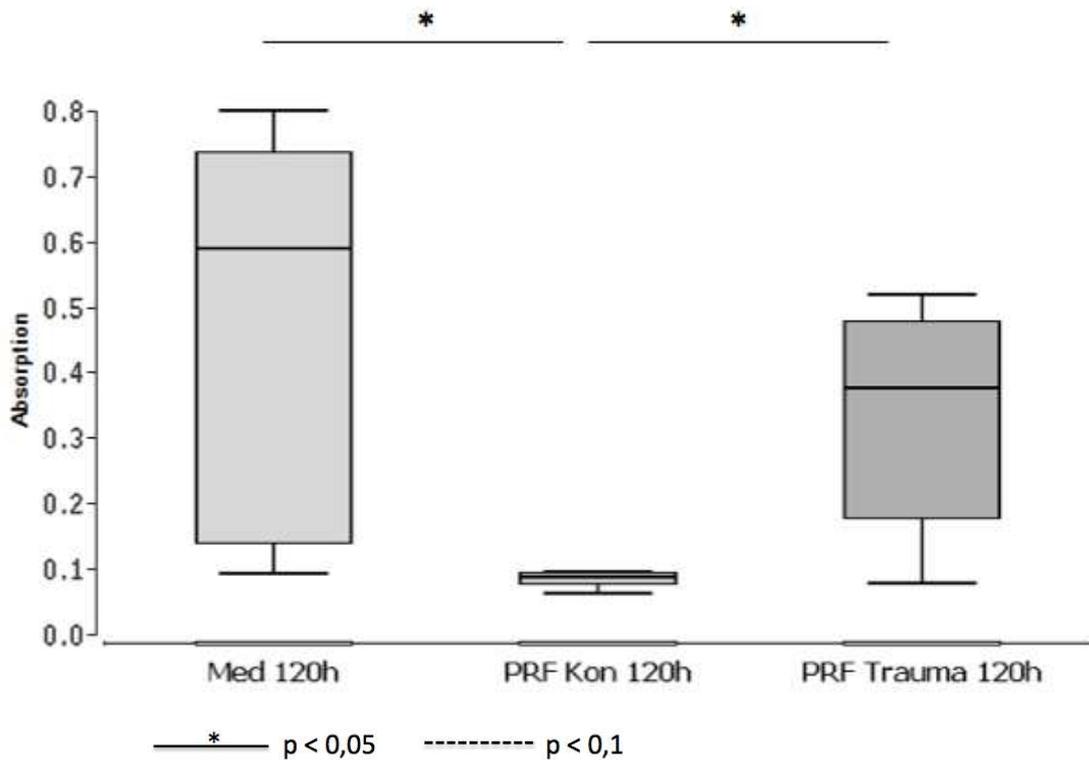


Abbildung 10: Anstieg der metabolischen Aktivität nach 120h co-Inkubation mit Trauma-PRF. Gezeigt werden die Ergebnisse des MTT-Tests mittels der Absorptionswerte. Signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Mediumkontrolle (= Med) und zur Traumagruppe (= PRF Trauma) konnten bei MSC gemessen werden, welche mit PRF von gesunden Probanden (= PRF Kon) co-inkubiert wurden.

Nach 120 Stunden konnten, verglichen mit der Mediumkontrolle, weiterhin signifikant niedrigere Werte bei MSC gemessen werden, welche mit PRF von gesunden Probanden co-inkubiert worden sind. Ebenfalls zeigte sich eine signifikant niedrigere metabolische Aktivität im Vergleich zu der Traumagruppe. Zwischen den Absorptionswerten der Mediumkontrolle und denen der Traumagruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.4 Bestimmung von Mediatoren im Überstand mittels ELISA

Das ELISA-Verfahren wurde verwendet, um ausgewählte Peptidmediatoren nachweisen zu können. Diese wurden im Überstand der MSC, welche mit PRF co-inkubiert wurden, gesammelt und ihr Vorkommen nach 24, 72 und 120 Stunden PRF-co-Inkubation gemessen. Zu den untersuchten Faktoren gehörten CXCL10, IL-6, VEGF und IDO-2. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt ebenfalls mittels Boxplots, wobei die verglichenen Boxplots, welche einen signifikanten Unterschied oder statistischem Trend aufweisen jeweils mit einer Verbindungslinie über dem Boxplot gekennzeichnet sind.

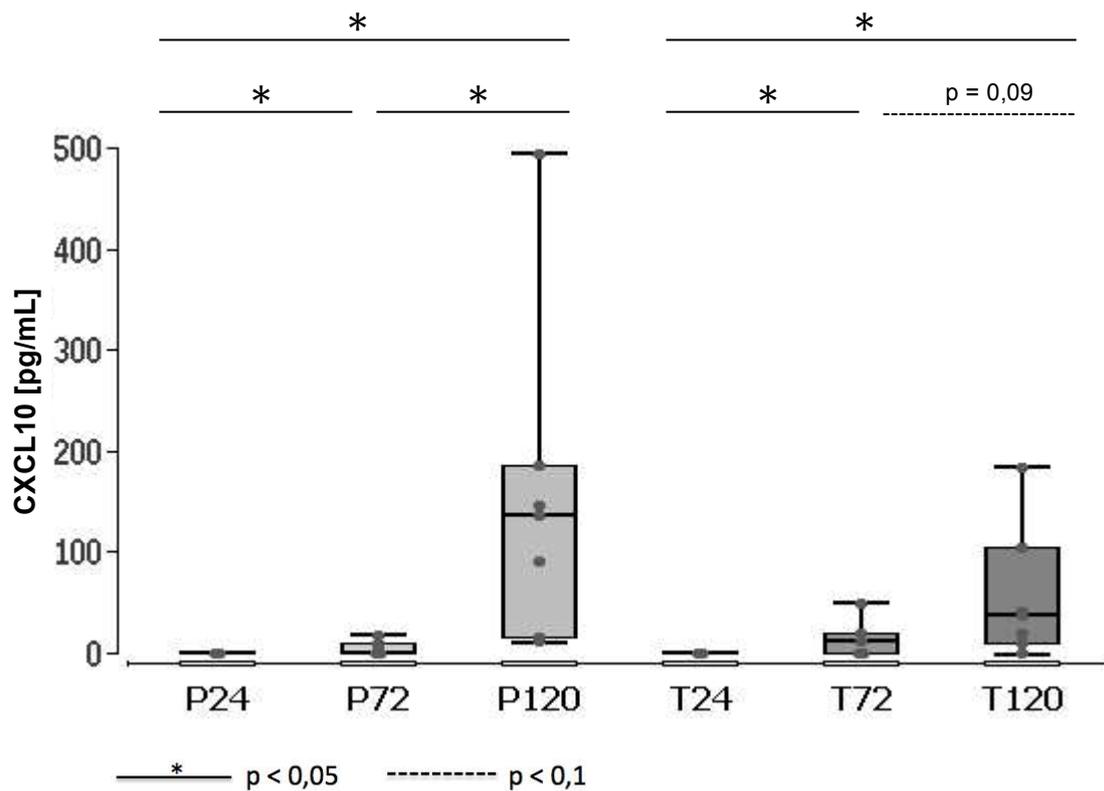


Abbildung 11: CXCL10-Konzentration im Kulturüberstand nach co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf. Es konnte ein signifikanter Anstieg von CXCL10 im zeitlichen Verlauf in beiden Gruppen nachgewiesen werden. Dargestellt ist der Nachweis von CXCL10 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Traumabelastung des Probanden. Auf der Abszisse ist der Messzeitpunkt (24, 72 oder 120 h Kultivierung), sowie der Traumagrad abgebildet (P= gesunder Proband, T= Traumagruppe). Auf der Ordinate findet sich die Menge des nachgewiesenen CXCL10 in pg/mL.

Innerhalb der Probandengruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CXCL10-Konzentration von 24 auf 72 Stunden sowie von 72 auf 120 Stunden. Ein signifikanter Unterschied stellte sich ebenfalls zwischen dem 24-Stunden- und dem 120-Stundenwert, bei höheren Werten zum letztgenannten Zeitpunkt, dar.

In der Traumagruppe konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der CXCL10-Konzentration von 24 auf 72 Stunden nachgewiesen werden. Signifikant höhere Werte konnten zudem in der Traumagruppe nach 120 Stunden verglichen mit den 24-Stundenwerten beobachtet werden. Ein statistischer Trend mit einem

Anstieg der CXCL10-Konzentration konnte in der Traumagruppe zwischen den 72-Stundenwerten und den 120-Stundenwerten beobachtet werden ($p=0,09$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 veranschaulicht.

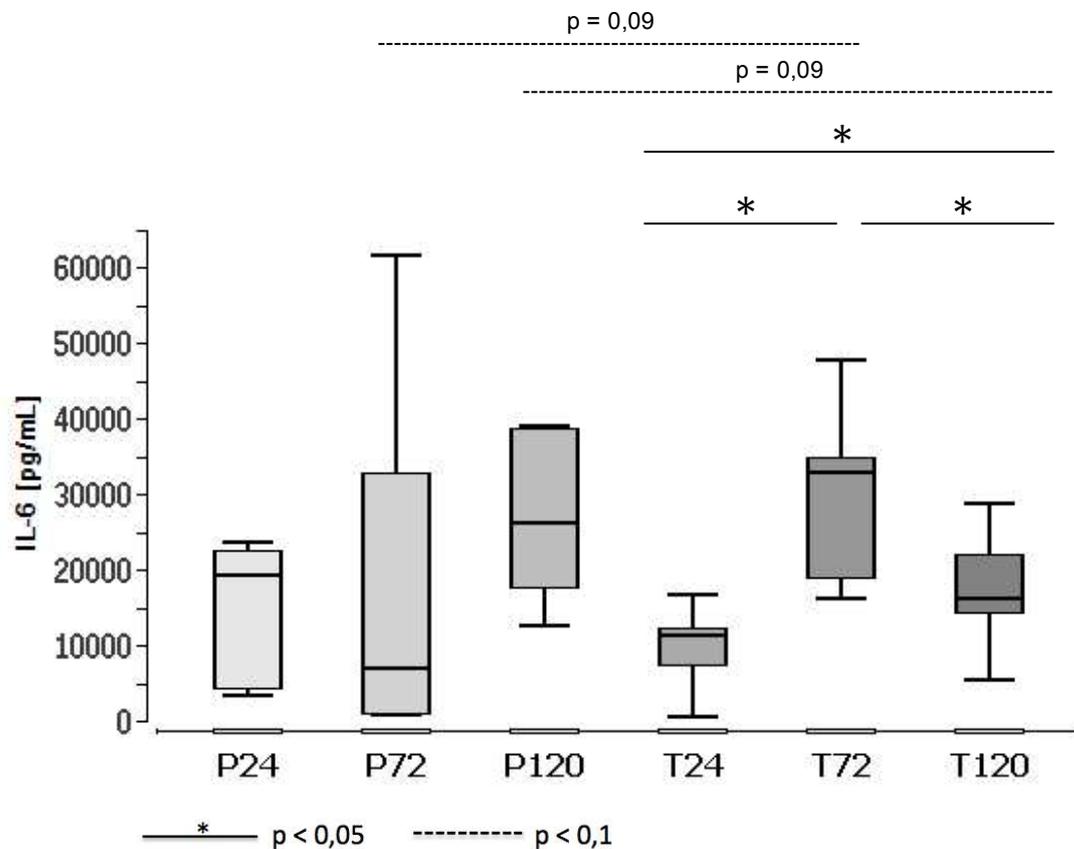


Abbildung 12: IL-6-Konzentration im Kulturüberstand nach co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf. In der Traumagruppe zeigte sich nach 72 Stunden ein signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration, welcher gefolgt wurde von einem signifikanten Abfall nach 120 Stunden. Auf der Abszisse sind die Messzeitpunkte (24, 72 oder 120 Stunden Inkubation) sowie der Traumagrad dargestellt (P= gesunder Proband, T= Traumagruppe); auf der Ordinate die IL-6-Konzentration in pg/mL.

Die IL-6-Konzentration war in der Traumagruppe nach 72 und 120 Stunden je signifikant erhöht im Vergleich zu der 24-Stundenmessung, wobei nach 72 Stunden die höchsten Konzentrationen ermittelt werden konnten. Diese waren auch gegenüber dem 120-Stundenwert signifikant erhöht.

Innerhalb der Probandengruppe konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden. Es bestanden jedoch Unterschiede zwischen den beiden

Versuchsgruppen. Nach 72 Stunden lagen die IL-6-Werte der Traumagruppe im Trend höher ($p=0,09$) und nach 120 Stunden die der gesunden Probanden ($p=0,09$). Abbildung 12 zeigt die genannten Ergebnisse.

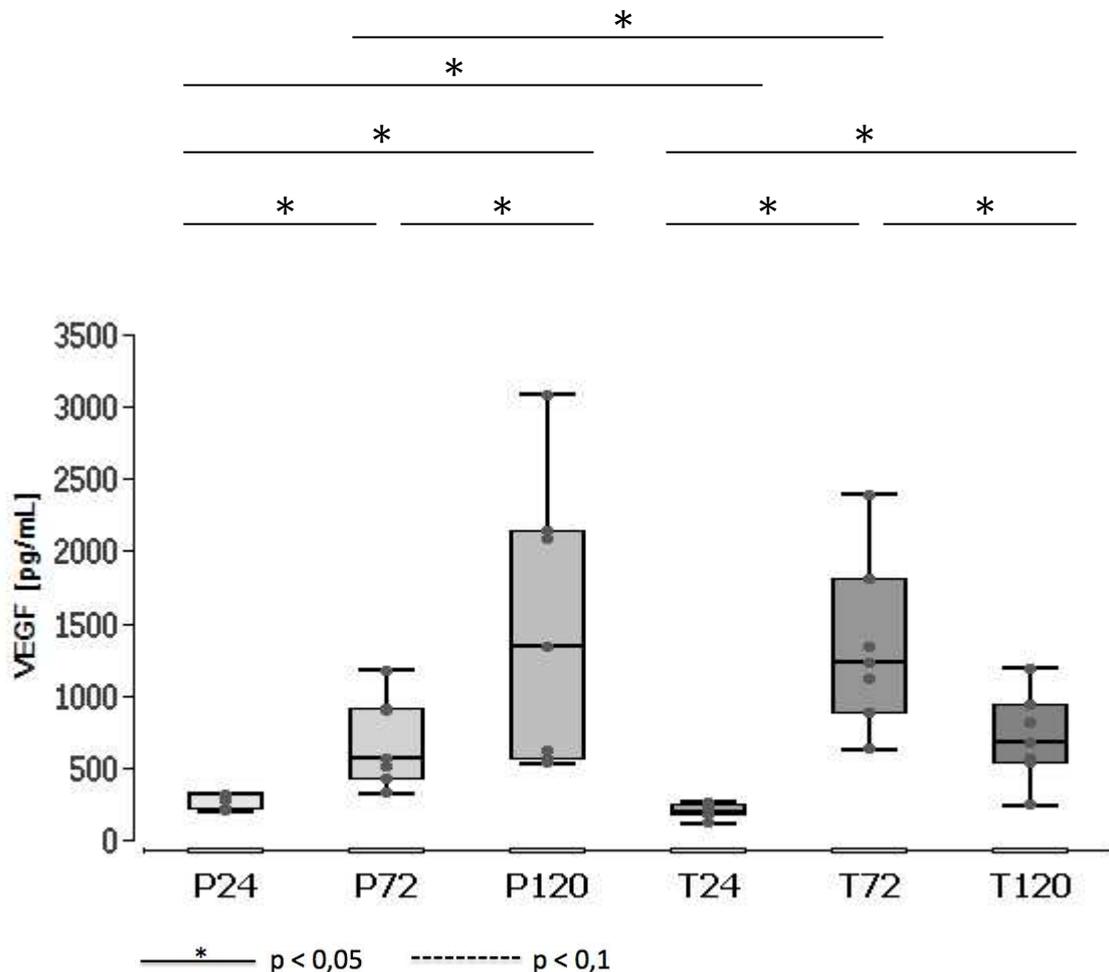


Abbildung 13: VEGF-Konzentration im Kulturüberstand nach co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf. Während es in der Gruppe der gesunden Probanden zu einem signifikanten Anstieg der VEGF-Konzentration im zeitlichen Verlauf kam, folgte in der Gruppe der Traumapatienten auf den signifikante Anstieg der Konzentration nach 72 Stunden ein signifikanter Abfall der Werte. Auf der Abszisse sind die Messzeitpunkte (24, 72 oder 120 Stunden Inkubation) sowie der Traumagrad dargestellt (P= gesunder Proband, T= Traumagruppe); auf der Ordinate die VEGF-Konzentration in pg/mL.

In der Probandengruppe zeigte sich für VEGF ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von 24 auf 72 Stunden und von 72 auf 120 Stunden mit einer

insgesamt signifikant höheren VEGF-Konzentration nach 120 als nach 24 Stunden. In der Traumagruppe konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der VEGF-Konzentration nach 72 Stunden im Vergleich zu der Messung nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich nach 72 Stunden eine signifikant höhere VEGF-Konzentration als nach 120 Stunden. Auf einen Anstieg der VEGF-Werte in der Traumagruppe folgte also ein Abfall dieser im zeitlichen Verlauf.

Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnten zu den Messzeitpunkten nach 24 und nach 72 Stunden ebenfalls signifikante Unterschiede festgestellt werden. Während die VEGF-Konzentration nach 24 Stunden bei der Probandengruppe signifikant höher lag, lagen im Vergleich die Werte nach 72 Stunden in der Traumagruppe signifikant höher. Dargestellt werden die Ergebnisse in Abbildung 13.

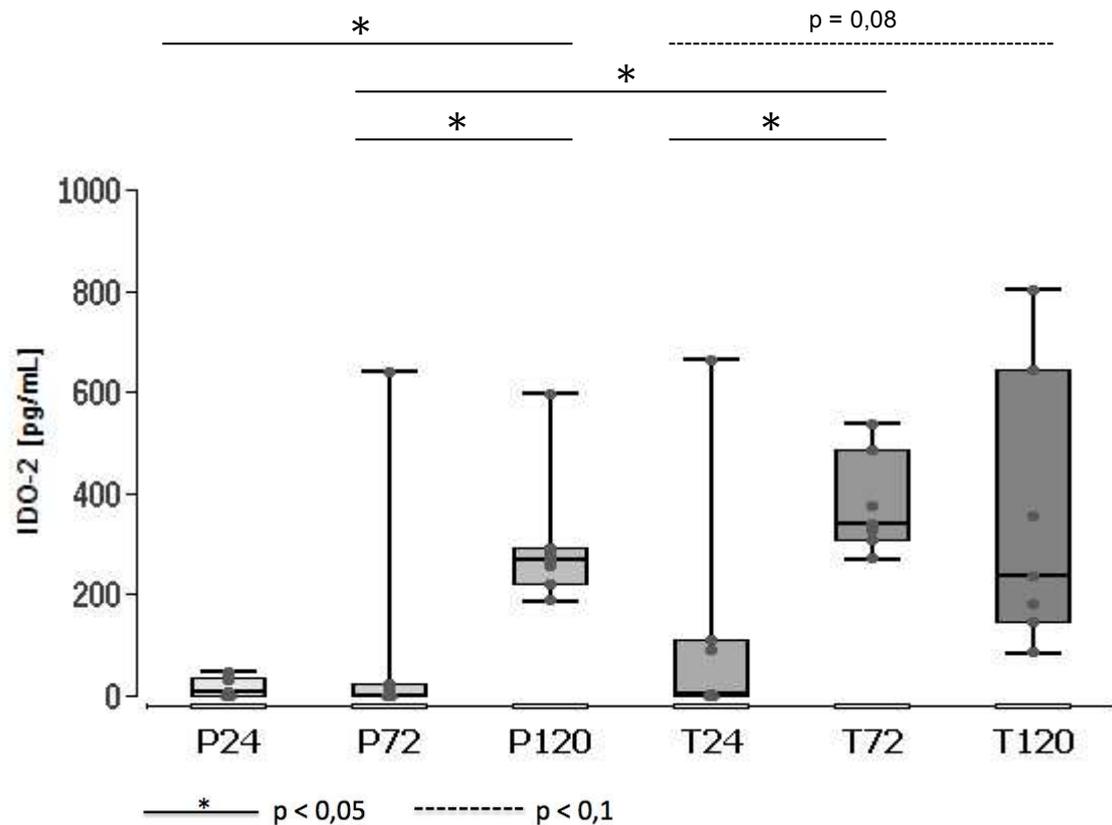


Abbildung 14: IDO-2 Konzentration im Kulturüberstand nach co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf. Ein teilweise signifikanter Anstieg der IDO-2-Konzentrationen gegenüber den 24-Stundenwerten konnte für die Probanden- und Traumagruppe beobachtet werden. Zusätzlich war der 72-Stundenwert in der Traumagruppe signifikant gegenüber der Probandengruppe erhöht. Auf der Abszisse sind die Messzeitpunkte (nach 24, 72 oder 120 Stunden Inkubation) sowie der Traumagrad dargestellt (P= gesunder Proband, T= Traumagruppe); auf der Ordinate die IDO-2-Konzentration in pg/mL.

In der Probandengruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der IDO-2-Konzentrationen nach 120 Stunden im Vergleich zu den 24-Stunden- und 72-Stundenwerten. In der Traumagruppe zeigten sich signifikant höhere Messwerte nach 72 Stunden im Vergleich zu den Messwerten nach 24 Stunden. Zudem war der 72-Stundenwert in der Traumagruppe gegenüber der Probandengruppe signifikant erhöht. Die IDO-2-Konzentration zum Zeitpunkt 120 Stunden war in der Traumagruppe im Trend ($p=0,08$) gegenüber dem 24-Stundenwert erhöht (Abbildung 14).

3.5 Modulation der Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF

Um die Expression verschiedener Gene in MSC zu analysieren, wurde das PCR-Verfahren verwendet. Es wurde die Genexpression von inflammatorischen Proteinen wie MAPK8, MAPK14, IL-6 und CXCL10, antiinflammatorischen Proteinen wie IDO-1 und TNFAIP6, dem angiogenetischen Protein VEGFA und osteogen-assoziierten Proteinen wie RUNX2 und COL1A in MSC analysiert. Die MSC wurden vorher mit Probanden-PRF bzw. Trauma-PRF für jeweils 24 oder 120 Stunden co-inkubiert und im Vergleich zu einem Kontrollansatz, der nur das Kulturmedium ohne Zusätze enthielt, betrachtet.

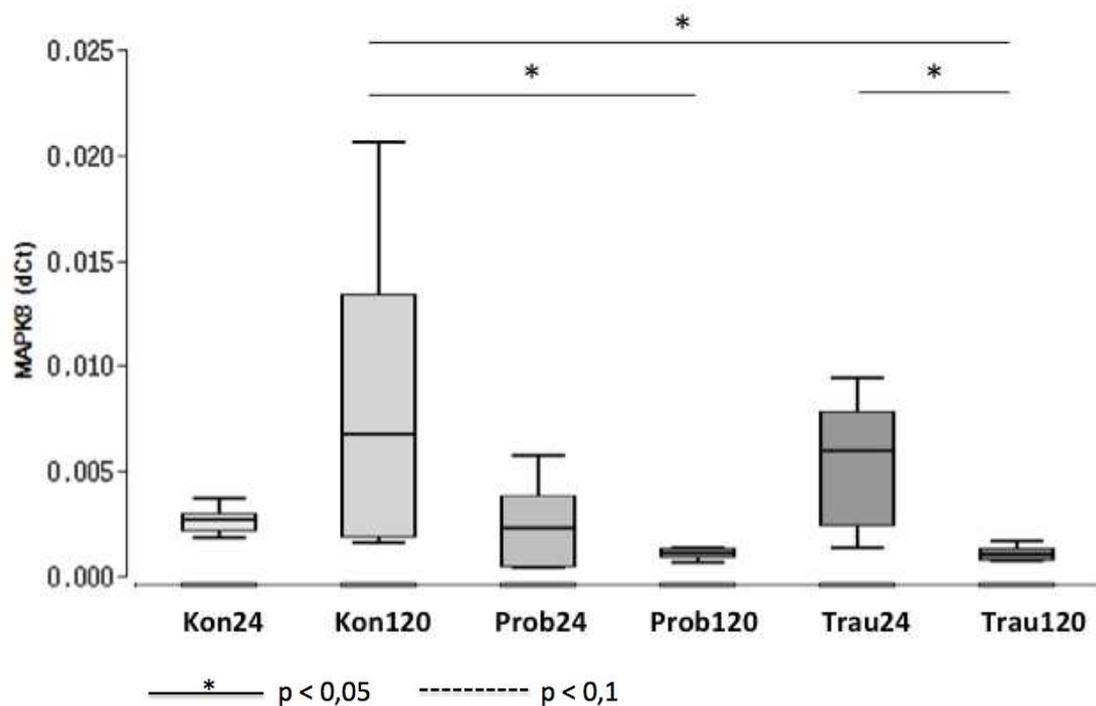


Abbildung 15: MAPK8-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Nach 120 Stunden zeigte die Kontrollmessung signifikant höhere Werte von MAPK8 als diejenigen der Probanden- und Traumagruppe. Die Abbildung zeigt MAPK8 in dCt (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Zum Zeitpunkt 120 Stunden wurde eine signifikant höhere MAPK8-Genexpression in den MSC gemessen, welche unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, im Vergleich zu MSC, welche mit Probanden-PRF bzw. Trauma-PRF co-inkubiert worden sind.

Darüber hinaus fiel die MAPK8-Genexpression in der Traumagruppe signifikant von 24 zu 120 Stunden ab (Abbildung 15).

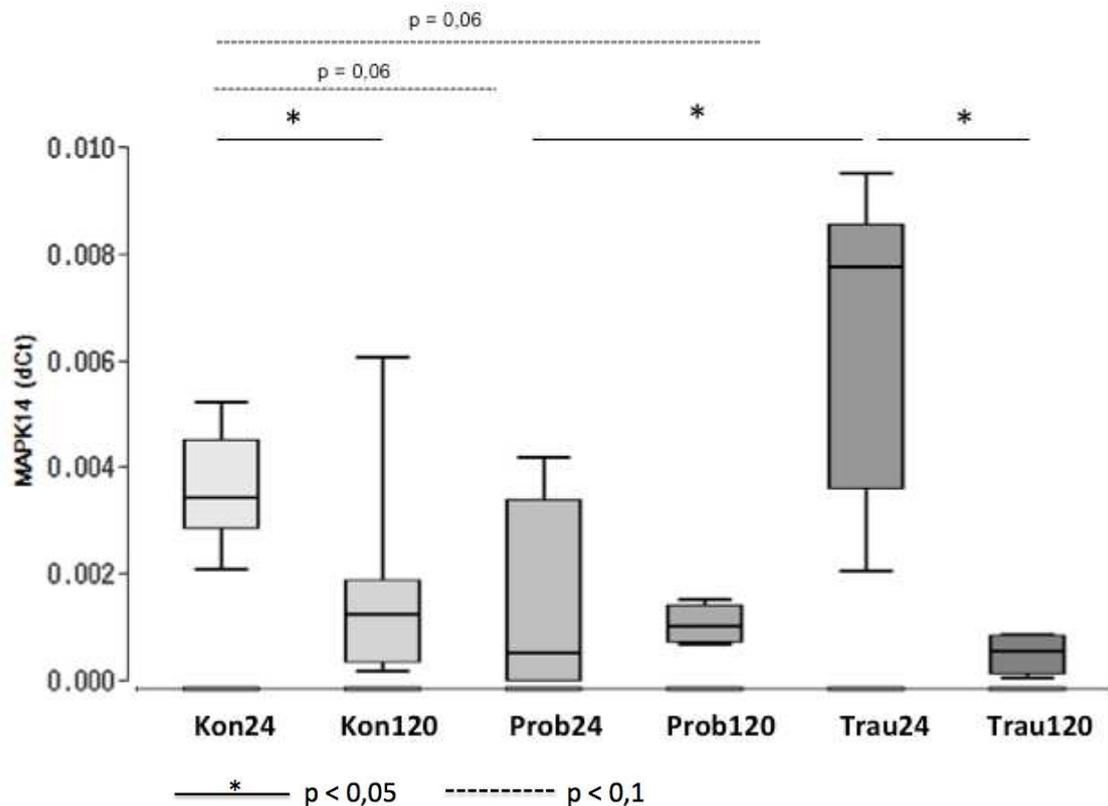


Abbildung 16: MAPK14-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Nach 24 Stunden konnten signifikant niedrigere Werte von MAPK14 in der Probandengruppe verglichen mit der Traumagruppe gemessen werden. Bei der Kontrollgruppe und bei den Traumapatienten fielen die Werte im zeitlichen Verlauf.

Die Abbildung zeigt MAPK14 in dCT (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Traumagruppe zeigten sich nach 24 Stunden jeweils signifikant höhere Werte an MAPK14 als nach 120 Stunden. Zudem konnten nach 24 Stunden verglichen mit den Werten der gesunden Probanden signifikant höhere MAPK14-Werte in der Traumagruppe gemessen werden. Ein statistischer Trend ($p=0,06$) mit höheren Werten in der Kontrollgruppe konnte nach 24 Stunden zwischen der Kontrollgruppe und der Probandengruppe beobachtet werden. Die MAPK14-Genexpression nach 24

Stunden war in der Traumagruppe im Trend ($p=0,06$) gegenüber der Kontrollmessung erhöht. Abbildung 16 stellt die genannten Ergebnisse dar.

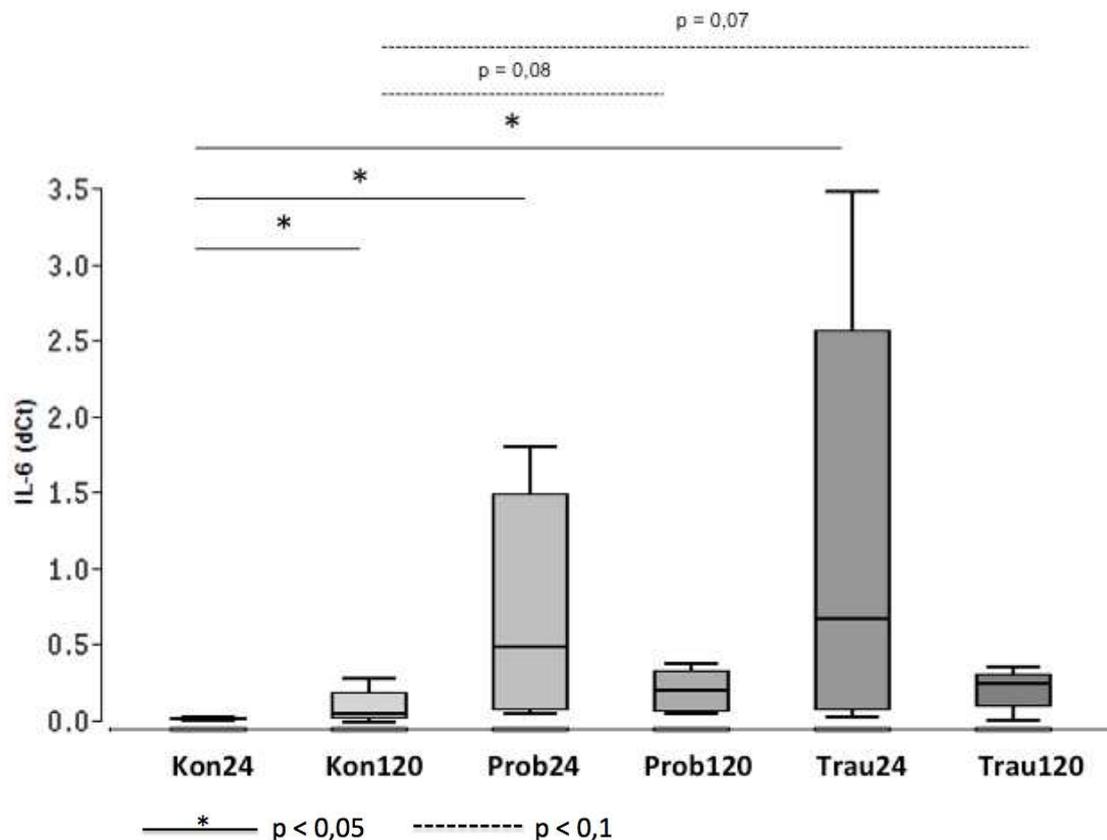


Abbildung 17: IL-6-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Nach 24 Stunden konnten verglichen mit der Kontrollmessung signifikant höhere Messwerte von IL-6 bei Traumapatienten und bei gesunden Probanden gezeigt werden.

Die Abbildung zeigt die Höhe von IL-6 in dCt (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Die Messung der Genexpression von IL-6 wies nach 24 Stunden signifikant höhere Werte in der Probanden- und Traumagruppe jeweils im Vergleich zur Kontrollmessung auf. Die Kontrollmessung ergab nach 120 Stunden signifikant

höhere Werte zu der Messung nach 24 Stunden. Nach 120 Stunden konnte im Trend eine höhere IL-6-Genexpression bei der Probandengruppe ($p=0,08$) sowie bei der Traumagruppe ($p=0,07$) je verglichen mit der Kontrollmessung gezeigt werden. Abbildung 17 zeigt die genannten Ergebnisse.

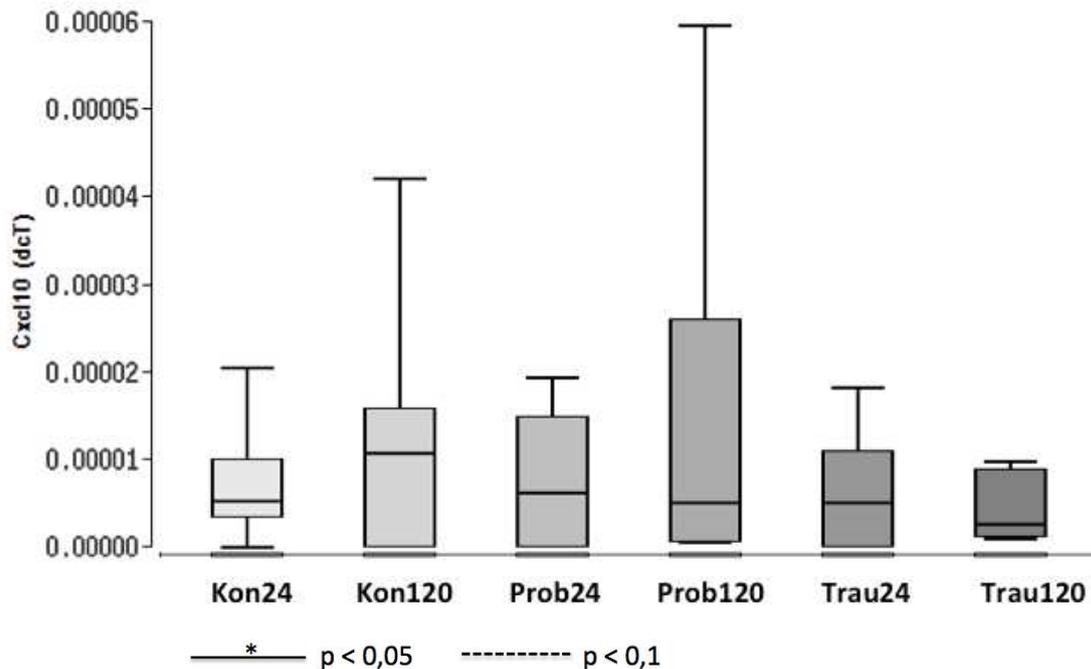


Abbildung 18: CXCL10-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in und zwischen den Gruppen zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten festgestellt werden. Die Abbildung zeigt CXCL10 in dCT (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von CXCL10 in den Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt werden (Abbildung 18).

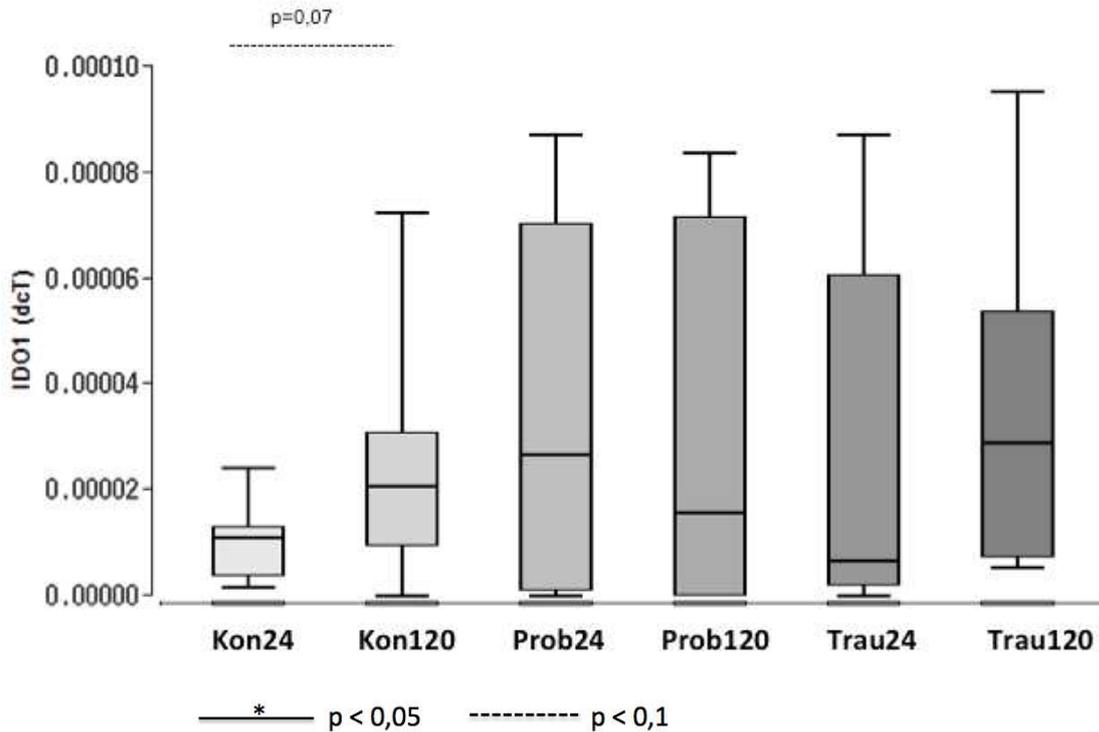


Abbildung 19: IDO-1-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Die Abbildung zeigt IDO-1 in dCT (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Auch die Messung der Genexpression von IDO-1 zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ein statistischer Trend ($p=0,07$) mit steigenden Werten konnte im zeitlichen Verlauf bei der Kontrollmessung beobachtet werden (Abbildung 19).

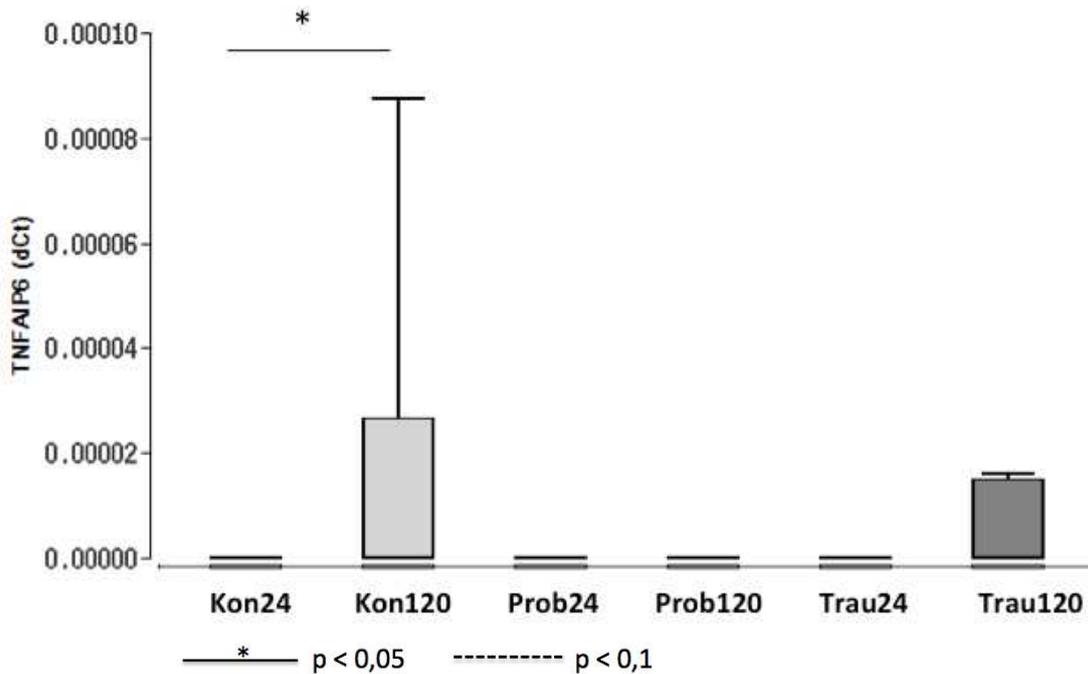


Abbildung 20: TNFAIP6-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied an TNFAIP6 im zeitlichen Verlauf der Kontrollmessung. Die Abbildung zeigt TNFAIP6 in dCt (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

In der Kontrollmessung konnte ein signifikanter Anstieg im zeitlichen Verlauf von TNFAIP6 gemessen werden.

Zwischen den Gruppen ergaben die Messungen der Genexpression von TNFAIP6 zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede (Abbildung 20).

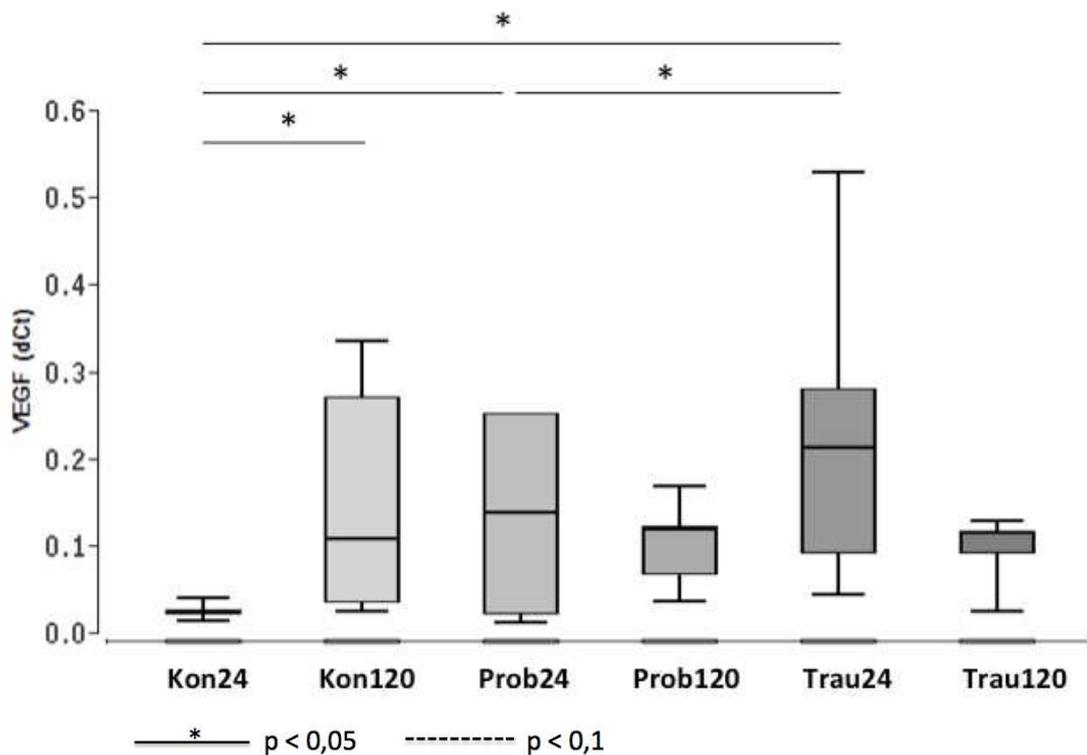


Abbildung 21: VEGFA-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Es konnten signifikant höhere Werte von VEGFA nach 24 Stunden bei gesunden Probanden und bei Traumapatienten je im Vergleich zur Kontrolle sowie signifikant höhere Werte bei Traumapatienten im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen werden.

Die Abbildung zeigt VEGFA in dCt(Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Die Analyse der Genexpression von VEGFA zeigt nach 24 Stunden signifikant höhere Werte bei der Probandengruppe und der Traumagruppe jeweils im Vergleich zur Kontrollmessung. Des Weiteren konnten zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere Messwerte bei der Traumagruppe verglichen mit der Probandengruppe nachgewiesen werden. Bei der Kontrollmessung stieg die VEGFA-Genexpression im zeitlichen Verlauf signifikant an. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen nach 120 Stunden. Abbildung 21 stellt die Ergebnisse in Form von Box-plots dar.

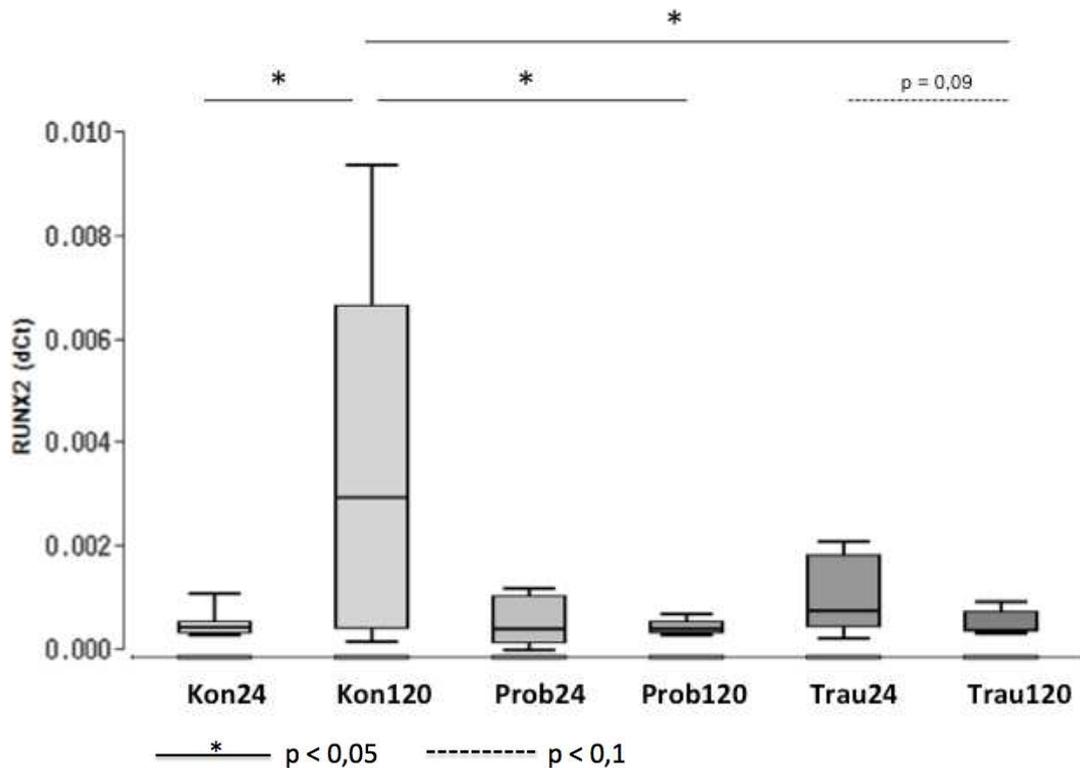


Abbildung 22: RUNX2-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf.

Ein signifikanter Anstieg der RUNX2-Genexpression konnte im zeitlichen Verlauf der Kontrollmessung nachgewiesen werden. Nach 120 Stunden konnten signifikant höhere Werte von RUNX2 bei der Kontrolle je im Vergleich zu den beiden Versuchsgruppen gezeigt werden.

Die Abbildung stellt RUNX2 in dCT (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse) dar. Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Signifikant höhere Werte in der Genexpression von RUNX2 konnten nach 120 Stunden in der Kontrollmessung verglichen mit der Probandengruppe und der Traumagruppe bei keinem signifikanten Unterschied zwischen den letztgenannten Gruppen gezeigt werden. Ein signifikanter Anstieg der RUNX2-Genexpression stellte sich bei der Kontrollmessung im zeitlichen Verlauf dar. Im Trend fielen in der Traumagruppe die Werte im zeitlichen Verlauf (p=0,09). Abbildung 22 bildet die genannten Ergebnisse ab.

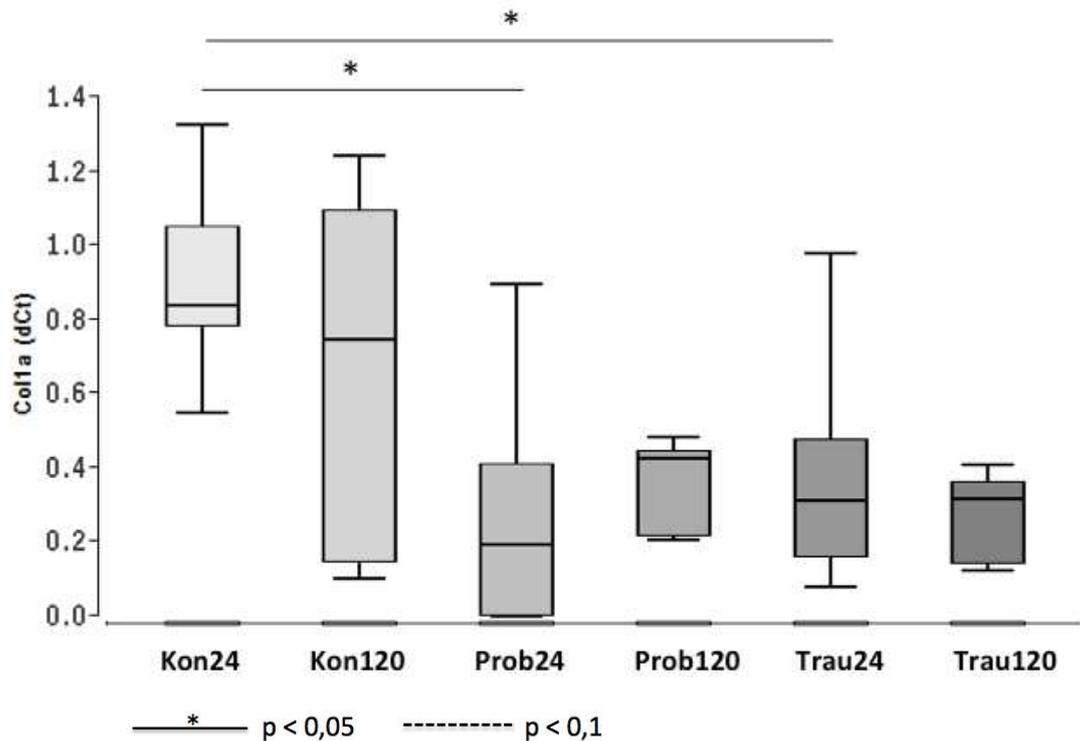


Abbildung 23: COL1A-Genexpression in MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf. Signifikant geringere Werte von COL1A wurden in der Probanden- und in der Traumagruppe nach 24 Stunden je im Vergleich zur Kontrollmessung nachgewiesen. Die Abbildung zeigt COL1A in dCt (Ordinate) abhängig von der Zeit sowie von der co-Inkubation mit PRF (Abszisse). Bei der Kontrollmessung (=Kon) wurden MSC analysiert, welche nur mit Medium inkubiert wurden, während bei der Probandengruppe (=Prob) und der Traumagruppe (=Trau) eine co-Inkubation mit PRF erfolgte.

Die Messung nach 24 Stunden wies signifikant höhere Werte bei der Kontrolle als bei einer co-Inkubation von MSC mit PRF auf, unabhängig davon, ob es sich um PRF von gesunden Probanden oder Traumapatienten gehandelt hat. Nach 120 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dargestellt sind die Ergebnisse in Abbildung 23.

4. Diskussion

4.1 Haupterkenntnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, darzustellen, inwiefern Trauma-aktiviertes PRF MSC beeinflussen kann und welche Faktoren an der Wechselwirkung zwischen MSC und PRF beteiligt sind. Das übergeordnete Ziel war es, herauszuarbeiten, ob die Kombination von Trauma-aktiviertem PRF und MSC ein erfolgsversprechender Ansatz für die Versorgung von Frakturen ist.

Dafür wurden *in vitro* MSC mit PRF von Traumapatienten und von gesunden Probanden co-inkubiert und unterschiedliche Charakteristika im Verlauf analysiert. Das PRF wurde dabei nach 24 Stunden oder 120 Stunden aus den Wells, in welchen MSC kultiviert waren, entfernt und bei der letztgenannten Gruppe nach 72 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt und das entfernte Medium ebenfalls zur Analyse verwendet. Die hier analysierten Charakteristika schlossen die Messung der Aktivität der MSC, die Messung von Wachstumsfaktoren im Überstand sowie die Analyse der Genexpression von vorher definierten Parametern ein. Zu den gemessenen Faktoren zählten osteogene (RUNX2, COL1A), inflammatorische (IL-6, CXCL-10, MAPK8, MAPK14), antiinflammatorische (IDO, TNFAIP6) und angiogene (VEGFA) Parameter. Deren Zusammenhang und Interaktionen werden in Abbildung 24 dargestellt.

Die mit Trauma-aktiviertem PRF co-inkubierten MSC zeigten nach 24 Stunden ein erhöhtes inflammatorisches Potenzial durch hohe IL-6-Sekretion und eine gesteigerte Genexpression von IL-6 und MAPK14 sowie ein erhöhtes angiogenetisches Potenzial bei hohen VEGFA-Werten. Zudem konnte bei dieser Gruppe beobachtet werden, dass die Konzentration des inflammatorischen Faktors IL-6 und des angiogenetischen Faktors VEGFA im Überstand bis 72 Stunden anstiegen, allerdings nach 120 Stunden bereits wieder signifikant abfielen. Es zeigte sich, dass die metabolische Aktivität von MSC nach 120 Stunden co-Inkubation mit Trauma-PRF signifikant höher lag als nach co-Inkubation mit PRF gesunder Probanden bei keinem signifikanten

Unterschied zur Kontrollmessung. Die Genexpression von COL1A, einem Strukturprotein des Knochens, lag verglichen mit der Kontrolle in MSC, welche mit Trauma-aktiviertem PRF co-inkubiert worden sind, nach 24 Stunden signifikant niedriger. Nach 120 Stunden wurden zudem verminderte Genexpressionswerte von RUNX2 und MAPK8 gemessen. Eine niedrige Expression dieser Faktoren, welche die Osteogenese und Inflammation beeinflussen, spricht für eine Verminderung des osteogenen Potenzials ausgehend vom Trauma-aktiviertem PRF.

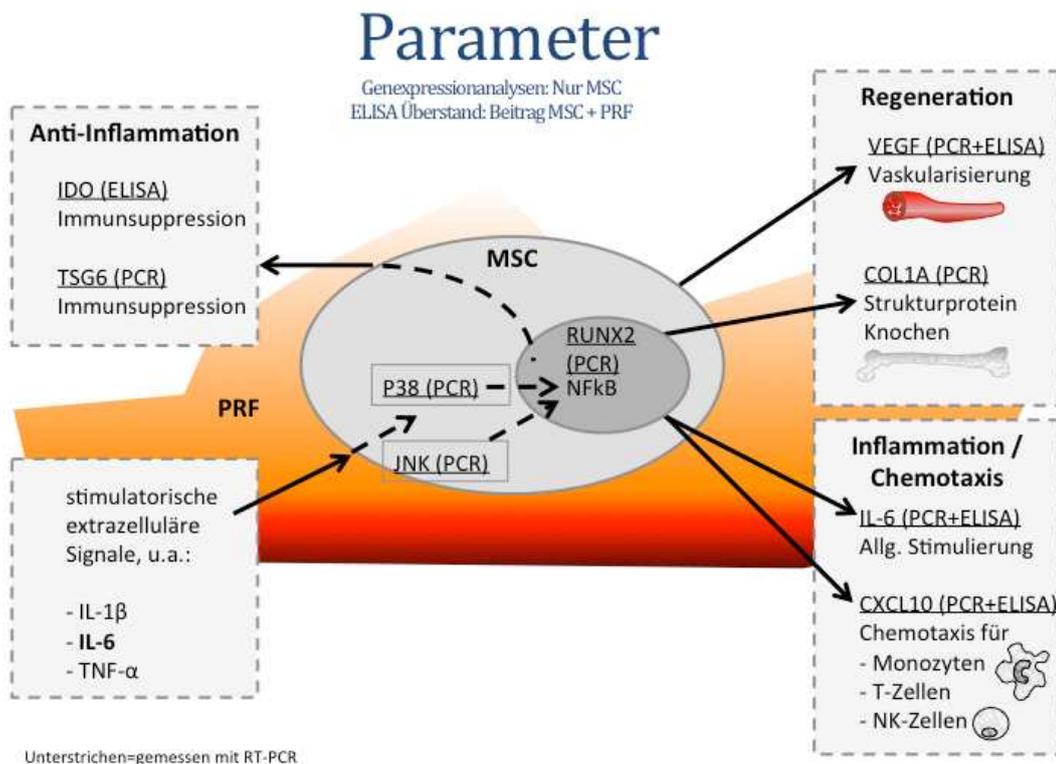


Abbildung 24: Abhängigkeiten und Zusammenhänge der gemessenen Parameter. Hier verwendete Begriffe, die sich von der bisherigen Nomenklatur unterscheiden: TSG6=TNFA, P38=MAPK14, JNK=MAPK

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Da die Datenlage zur Anwendung von PRF im unfallchirurgischen Bereich noch unzureichend ist, können kaum direkte Vergleiche zu Ergebnissen von anderen Studien gezogen werden. Allerdings wurde bereits intensive Forschung zu PRF in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie besonders im Bereich der Behandlung von Knochendefekten betrieben, so dass Bezug auf diese Ergebnisse genommen werden kann. In diesen Studien konnten positive Effekte von PRF auf die Weichteil- und Knochenheilung festgestellt werden.⁴⁸ Allerdings zeigen einzelne Studien wiederum keine entscheidenden Vorteile von PRF im Vergleich zu anderen Methoden, weshalb weitere Untersuchungen erfolgen sollten.⁸⁰

4.2.1 Diskussion des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv bestand aus zwei Gruppen, aufgeteilt in gesunde Teilnehmer und Traumapatienten. Die Patienten der letztgenannten Gruppe wurden anhand ihres Traumagrades (einfache Fraktur) sowie anhand des postoperativen Zeitraums (post OP) für diese Studie ausgewählt (1. Tag post OP). Durch den Einbezug von Traumapatienten konnte die Studie als eine der ersten den Einfluss von Trauma-aktiviertem PRF auf MSC *in vitro* überprüfen. Somit bot das Patientenkollektiv Vorteile gegenüber Studien mit ausschließlich gesunden Probanden.

Dennoch wies die Auswahl an Probanden und Traumapatienten Einschränkungen auf:

Im Patientenkollektiv lag ein Ungleichgewicht in der Geschlechterverteilung vor. In der Traumagruppe war das Verhältnis von Frauen zu Männern 1:1,33, während die Probandengruppe ein Verhältnis von 1:0,75 aufwies. Ob und inwiefern diese Variable Einfluss auf die Ergebnisse hatte, bleibt unklar.

Darüber hinaus gab es einen Unterschied im Durchschnittsalter des Patientenkollektivs. Durchschnittlich waren die Traumapatienten 44 Jahre alt,

derweil die gesunden Probanden ein Durchschnittsalter von 38 Jahren hatten. Somit lag das Alter der Traumapatienten zwar höher als das der gesunden Probanden, allerdings nur um 16%. Andeutungen, inwieweit das Alter eine Rolle spielen kann, konnten beim Vergleich der Traumapatientin 3 (Alter 81) mit dem Median der Traumagruppe gefunden werden. Nach 72 und 120 Stunden konnten höhere IL-6-Werte im Überstand gemessen werden sowie durchweg höhere VEGFA-Werte. Lord *et al.* beschreiben, dass ältere Menschen einen höheren Basiswert an inflammatorischen Faktoren besitzen und demnach eine erhöhte Entzündungsreaktion aufweisen.⁸¹ Auch Mörs *et al.* zeigen in ihrer Arbeit, dass in ihrem Fall geriatrische Patienten zu einer erhöhten inflammatorischen Reaktion nach einem Trauma neigen.⁸² Dies geht mit den Beobachtungen in Hinblick auf Traumapatientin 3 in der vorliegenden Arbeit einher. Um diese Annahme umfassend zu bestätigen, müssen allerdings weitere Studien folgen.

Zusätzlich unterschieden sich die Patienten der Traumagruppe in Bezug auf den Schweregrad ihres Traumas. Bei der Auswahl der Studienteilnehmer wurde zwar darauf geachtet, Patienten mit ähnlichem Trauma einzuschließen, jedoch war dies nicht immer möglich. Hervorzuheben ist, dass Traumapatient 1 erst einen Tag nach der Blutentnahme operiert wurde und somit mit seinem postoperativen Zeitraum von den anderen Traumapatienten abweicht. Demnach lag diese OP, welche ein einheitliches Trauma einen Tag vor Blutentnahme darstellen sollte, nach der Probenentnahme. Dadurch, dass dieser Patient allerdings sechs Tage vor Blutentnahme den Unfall, also ein Trauma, erlitten hatte, wurde er dennoch in die Studie miteingeschlossen. In der Auswertung wurden die Ergebnisse dieses Traumapatienten zusätzlich separat im Vergleich zu denen der anderen Traumapatienten betrachtet, um den Einfluss der Operation zu analysieren. Traumapatient 1 zeigte durchweg höhere VEGFA-Werte und die IL-6-Genexpression nach 120 Stunden wurde stärker stimuliert. Die metabolische Aktivität der MSC lag nach 120 Stunden unter den Werten der Traumagruppe. Die erhöhte Inflammation nach 120 Stunden sowie die geringere metabolische Aktivität können auch bei den Messungen der gesunden Probanden zu diesen Zeitpunkten gezeigt werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass das eigentliche Trauma 6 Tage vor

Probenentnahme Werte liefert, die sich den Werten der gesunden Probanden annähern.

Zuletzt ist zu erwähnen, dass in der Auswertung Vorerkrankungen der Patienten außer Acht gelassen wurden. So litten beispielsweise zwei der eingeschlossenen Traumapatienten unter einer Hypothyreose. Ob und inwiefern dies die Ergebnisse beeinflusst haben könnte, wurde nicht ausgewertet.

Generell kann festgestellt werden, dass eine homogenere Patientengruppe sowie umfassendere Stichproben die Aussagekraft der Ergebnisse weiter erhöhen könnten.

4.2.2 Diskussion PRF-Herstellung und Anwendung

Grundsätzlich müssen Studien, welche Blutanalysen beinhalten, im Vergleich zu anderen Studien durchweg mit Vorsicht begutachtet werden, da interindividuelle Unterschiede vorliegen können.⁸³

Beim Vergleich von PRF-Studien muss zusätzlich darauf geachtet werden, dass die PRF-Herstellung nicht eindeutig definiert ist und somit Unterschiede in der Fertigung bestehen, die Einfluss auf die Ergebnisse haben können.⁵²

Das in der vorliegenden Studie verwendete PRF entspricht in der Herstellung dem A-PRF (1.300 rpm, 8 min) nach Verboket et al.⁶ bzw. dem A-PRF + nach El Bagdadi *et al.*⁵⁴

Im Vergleich zu anderen PRF-Arten führt die Herstellung des A-PRF zu einer erhöhten Konzentration an Thrombozyten und einer gleichmäßigen Verteilung dieser über den PRF-Clot. Die Konzentration an Leukozyten nimmt im Vergleich zur normalen Blutprobe leicht ab.⁸⁴ Da besonders die Thrombozyten an der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und deren Effekten beteiligt sind⁶, wurde für diese Studie A-PRF als Produkt ausgewählt. Die verminderte Zentrifugalbeschleunigung führt zu einer erhöhten Wachstumsfaktorausschüttung, welche wiederum die Knochenheilung stimulieren könnte.³³

Des Weiteren wurde die genannte Einstellung verwendet, da eine langsame Polymerisation des PRF-Clots stattfindet. Dies sorgt für ein elastisches, dreidimensionales Netzwerk, welches zur bereits erwähnten Freisetzung von Zytokinen und zur zellulären Migration führt.⁴¹

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das PRF-Produkt ist die Auswahl der Zentrifuge. In der vorliegenden Studie wurde eine Duo-Zentrifuge verwendet, da diese bereits für die Herstellung von A-PRF voreingestellt ist und in einigen Studien erfolgreich angewandt wurde.^{53 80} Lourenço *et al.* zeigen, dass die Zentrifugenauswahl unterschiedliche Einflüsse auf die Charakteristika des PRFs hat. Sie stellen dar, dass beispielsweise eine horizontale Zentrifugation zu einer sehr stabilen Fibrinmembran mit hohem Zellgehalt führt.⁵⁰ Dieser Faktor muss zusätzlich beim Vergleich von PRF-Studien betrachtet werden.

Während der Herstellung des PRFs fiel auf, dass sich die PRF-Clots in ihrer Größe unterschieden. Obwohl die PRF-Röhrchen identische Größen aufwiesen und auf eine einheitliche Herstellung geachtet wurde, variierten die PRF-Clots makroskopisch um einige Millimeter. Miron, Dham, *et al.* zeigen in ihrer Arbeit, dass die Größe des PRF-Clots sowohl von dem Geschlecht und dem Hämatokrit als auch von dem Alter beeinflusst werden kann.⁸⁵ Chang, Tsai and Chang haben in ihrer Studie die Größe des PRF einheitlich gestaltet, um diesen möglichen Effekt zu umgehen.¹¹ Eine genaue Messung der Unterschiede und die Berücksichtigung dieser Variable bei der Auswertung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nicht. Um einen möglichen Einfluss dieser Variable nachzuweisen, sollten zukünftige Studien diesen Faktor berücksichtigen.

In der vorliegenden Studie wurde der PRF-Clot zudem zu einer Membran weiterverarbeitet. Dies hat den Vorteil, dass die klinische Anwendung des soliden Materials die Handhabung vereinfacht.^{40 50} Dohan Ehrenfest *et al.* zeigen, dass das Komprimieren des Clots zu einer dichteren Fibrinmatrix führt. Darüber hinaus stellen sie dar, dass Zellen, wie Leukozyten, bei dem Prozess nicht beschädigt werden.⁸³ Die vorliegende Studie hat den möglichen Einfluss des Komprimierens auf die Zellen, das Fibrinwachstum und die Wachstumsfaktoren nicht genauer untersucht.

Für die Versuche war es entscheidend, dass die Zellen im PRF vital waren. Demnach wurde das Produkt mit Vorsicht behandelt und eine starke Manipulation vermieden. Der vorsichtige Umgang ist von Bedeutung, um die Zellen im PRF aufrecht und stabil zu halten, so dass das PRF seine Aufgaben erfüllen kann.⁸³

Bei den durchgeführten Versuchen sah der Versuchsaufbau vor, dass das PRF keinen direkten Kontakt mit den MSC hatte. Hierzu wurden *Transwells* verwendet. Das Ziel der Trennung von MSC und PRF war es, nur die Faktoren identifizieren zu können, die an der Wechselwirkung beteiligt sind, ohne direkte Zell-Zell-Interaktionen mit einzubeziehen.

Vergleiche mit anderen Studien, wo eine direkte Inkubation erfolgte, beziehungsweise ein direkter Kontakt zwischen den Zellen bestand, müssen somit im Vergleich vorsichtig betrachtet werden.⁴⁹

Ergänzend sollte beachtet werden, dass die Zusammensetzung von PRF individuell variiert und sich auch situativ verändern kann. Verboket *et al.* konnten zeigen, dass sich die Morphologie und Zusammensetzung des A-PRF-*Clots* posttraumatisch verändern.⁶ Es wurde beschrieben, dass die Konzentration an inflammatorischen Zellen im Verhältnis zu den antiinflammatorischen Zellen ansteigt und sich somit das inflammatorische Potenzial erhöht. Des Weiteren sinkt die Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF. Dieser Wachstumsfaktor ist nach Miron *et al.* der potenteste Wachstumsfaktor für die Angiogenese und ist am Remodelling von Gewebe beteiligt. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von Biomaterialien die Knochenneubildung positiv von VEGF beeinflusst werden konnte.⁴ Eine verminderte Konzentration dieses Wachstumsfaktors reduziert diesen Effekt.⁷ Auch in dieser Studie wurde ein spezielles Augenmerk auf die Veränderungen des PRFs nach Trauma gelegt, um den Einfluss genauer zu untersuchen.

4.2.3 Diskussion MSC

Im Tierversuch zeigten Peterson et al., dass das regenerative Potenzial von MSC, die aus dem Fettgewebe isoliert wurden, erhöht werden kann. Durch die Verwendung eines mit *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) beladenen Adenovirus-Transporters kann die Synthese dieses osteoinduktiven Moleküls erhöht werden und die Knochenheilung zunehmend gefördert werden.³⁸ Demnach kann davon ausgegangen werden, dass MSC in ihrem regenerativen Potenzial beeinflusst werden können, weshalb in der vorliegenden Studie der Einfluss von Wachstumsfaktoren untersucht wurde.

Neben einigen genannten Eigenschaften besitzen MSC ein antiinflammatorisches Potenzial. Es wurde gezeigt, dass sie nach einer Tibiafraktur die Zytokinfreisetzung verändern können, indem sie die TGF- α und - β sowie die IL-6-Freisetzung reduzieren. Da IL-6 inflammatorische Eigenschaften hat, kann durch eine Reduktion dieses Faktors ein antiinflammatorischer Effekt erzielt werden.⁶⁴ Diese Eigenschaft sollte in der vorliegenden Studie besonders im Hinblick auf die proinflammatorische Wirkung des Trauma-aktivierten PRFs untersucht werden.

MSC werden zudem auf Grund ihrer immunmodulierenden Wirkung, die zur Hemmung von Lymphozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen führt, bei der GvHD therapeutisch und teilweise auch prophylaktisch verwendet. Besonders das Auftreten einer chronischen GvHD soll durch MSC vermindert werden. Forschungsergebnisse liefern allerdings kontroverse Ergebnisse bei der Anwendung von MSC, weshalb deren therapeutische Verwendung mit Vorsicht betrachtet werden sollte.⁸⁶ Dadurch, dass in der vorliegenden Arbeit nicht mit zellfreiem PRF gearbeitet wurde, besteht bei Zusammenführen der Komponenten die Gefahr einer GvH-Reaktion. Allerdings können die MSC durch ihre immunmodulierende Wirkung dieser Reaktion entgegenwirken.⁸⁶

Während in einigen Studien Zellen von Tieren verwendet wurden, wurden in den vorliegenden Versuchen humane Zellen aus einem vordefinierten Zellpool

genutzt. Kuçi *et al.* konnten bereits zeigen, dass MSC aus gepoolten mononukleären Zellen ein hohes allosuppressives Potenzial aufweisen.⁷³ Da diese Eigenschaft bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden konnten, wurde ein erneuter Nachweis in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Zellen ebenfalls ein allosuppressives Potenzial aufweisen. Anzumerken ist hier, dass die MSC und das PRF nicht vom gleichen Donor kamen.

In der vorliegenden Studie wurden die MSC vor der Verwendung für die Versuche über mehrere Passagen kultiviert, um die Zellanzahl zu erhöhen. Mit der Kultivierung gehen spezielle Risiken einher. Das Problem, welches bei einem Zellexpansions-Verfahren auftritt, beinhaltet einen möglichen Potenzverlust der Zellen sowie eine Modifizierung der Zellen und die Gefahr der Kontamination der Kultur.⁸⁷ Zudem führen Tolar and Nauta an, dass MSC sich bei der Kultivierung zytogenetisch verändern können und ein mögliches onkogenes Potenzial entwickeln.⁸⁸ Erforscht wurden diese Vorgänge in dem Fall an Mäuse-MSK, dennoch werden ähnliche Effekte auch bei menschlichen MSC erwartet.

Grundlegende Eigenschaften von MSC wurden während der Vorversuche in der vorliegenden Studie untersucht, allerdings keine weitergehenden Veränderungen.

Bei der Verwendung von MSC sehen Wang *et al.* es als wichtigen Ansatz, MSC in Form eines Zellrasens in Defekte zu transplantieren, da dieser eine Stabilität bietet, die darauf zurückzuführen ist, dass die Extrazellulärmembran durch die Zellen selber gebildet wurde und Zell-Zell-Kontakte aufrecht gehalten werden können.¹⁷ Auf Grund der Tatsache, dass die MSC in der vorliegenden Arbeit nicht transplantiert worden sind, haben diese Erkenntnisse für die durchgeführten Versuche keine Konsequenzen, sollten allerdings bei zukünftigen Studien, welche die Transplantation von PRF und MSC anstreben, beachtet werden.

In der Literatur wurde die Vermutung geäußert, dass der Abstand zwischen den MSC und dem PRF eine bedeutende Variable sein kann.⁴⁹ Da nicht alle Teile

des PRFs in einem Well zu den MSC den gleichen räumlichen Abstand haben, kann es sein, dass die Wechselwirkungen in einer Kultur unterschiedlich sind.

Es wird angenommen, dass MSC nicht nur über die Freisetzung von Peptidmediatoren kommunizieren, sondern auch die Möglichkeit besitzen kleine extrazelluläre Vesikel zur Interaktion auszuschütten. Es ist somit möglich, dass beobachtete Effekte auch auf diese Form der Wechselwirkung zurückzuführen sind.⁸⁹ In der vorliegenden Studie wurde das Vorkommen der extrazellulären Vesikel nicht untersucht.

Auch wenn der autologe Einsatz der MSC erfolgversprechend ist, kann nicht immer auf diesen zurückgegriffen werden. Die begrenzte Verfügbarkeit an Material und die limitierte Zeit, um entnommene Zellen auf die benötigte Anzahl für die Transplantation zu bringen, schränken den autologen Einsatz ein und führen zu der Notwendigkeit der allogenen Transplantation.⁹⁰ Es wurde gezeigt, dass die Verwendung von Spenderzellen trotz fehlendem Matching kaum immunogene Reaktionen auslöst. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die allogene Transplantation der autologen nicht stark unterlegen ist und MSC bei Traumapatienten körperfremd verwendet werden können.⁹¹

In der vorliegenden Studie wurden allogene MSC mit autologem PRF coinkubiert, da diese Kombination der beiden Produkte für die klinische Verwendung sinnvoll erscheint. Dies ist darauf zurückzuführen, dass PRF auch beim Traumapatienten aus dem Blut hergestellt werden kann, während die Verfügbarkeit von MSC auf Grund der oben genannten Limitierungen erschwert sein kann. Möglich wäre, dass durch die Kombination eines autologen mit einem allogenen Produkt die körpereigene Reaktion auf die allogene Transplantate verändert wird. Inwiefern diese Komponente eine Rolle spielt, wurde hier nicht weiter untersucht.

4.2.4 Diskussion Inflammation

Es wird angenommen, dass lösliche Faktoren eine Schlüsselrolle im Entzündungsprozess spielen. Diese werden unter anderem von den Granula der Thrombozyten und von Leukozyten ausgeschüttet und sind Initiatoren des Heilungsprozesses. Durch die Einbettung in das Fibrinnetzwerk beim PRF bleiben diese an dem vorbestimmten Ort und können lokal Einfluss auf den Defekt nehmen.³⁹

In der vorliegenden Studie zeigte sich im Überstand der MSC, welche mit PRF von gesunden Probanden co-inkubiert wurden, im zeitlichen Verlauf keine signifikante Veränderung des inflammatorischen Faktors IL-6. Verglichen mit der Traumagruppe konnte lediglich ein statistischer Trend mit niedrigeren Werten nach 72 Stunden und höheren Werten nach 120 Stunden in der Probandengruppe beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass vom PRF von gesunden Probanden beziehungsweise von dessen Einfluss auf MSC zum zweiten Messzeitpunkt (72 Stunden) ein geringeres inflammatorisches Potenzial ausgeht, welches im zeitlichen Verlauf entweder in dieser Gruppe ansteigt oder in der Traumagruppe abfällt.

In MSC, die mit PRF von gesunden Probanden co-inkubiert wurden, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle nach 24 Stunden eine signifikant höhere Genexpression von IL-6 ohne Unterschied zur Kontrolle nach 120 Stunden. Dies lässt vermuten, dass MSC durch die co-Inkubation mit PRF zu Beginn inflammatorisch wirken.

DieIDO-2-Werte waren bei der Probandengruppe im Überstand nach 120 Stunden signifikant höher als nach nur 24 oder 72 Stunden. Dies deutet auf ein steigendes antiinflammatorisches Potenzial hin. IDO kann sowohl von MSC als auch von anderen Zellen wie Lymphozyten produziert werden⁹², welche als Teil des PRFs ebenso wie MSC für die vermehrte Produktion verantwortlich sein können. Ein mögliches antiinflammatorisches Potenzial des PRFs wurde bereits von Hartlev *et al.* thematisiert und kann hier die Ursache für die ansteigenden Werte sein.⁸⁰

Weitere Erkenntnisse über das inflammatorische Potenzial von PRF konnten bei der Auswertung der Ergebnisse der Traumagruppe gewonnen werden. Verboket *et al.* zeigten bereits, dass insbesondere Trauma-aktiviertes PRF ein inflammatorisches Potenzial besitzt.⁶

Die vorliegende Studie zeigt, dass nach 24 Stunden die Genexpression von IL-6 und MAPK14, welche beide an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, in MSC, welche mit Trauma-aktiviertem PRF co-inkubiert wurden, erhöht war. Die Genexpression von MAPK14 war dabei in MSC, welche mit Trauma-aktiviertem PRF co-inkubiert wurden, signifikant höher als bei co-Inkubation mit PRF von gesunden Probanden. Nach 120 Stunden zeigten die MSC keine Unterschiede in der Genexpression von IL-6 und MAPK14. Dennoch lag in der Traumagruppe IL-6 im Überstand nach co-Inkubation zu den Messzeitpunkten 72 und 120 Stunden signifikant höher im Vergleich zum 24-Stunden-Wert. Dies führt zu der Annahme, dass dieser Faktor nach 72 und 120 Stunden besonders vom Trauma-aktiviertem PRF ausgeschüttet wird und nicht von den MSC. Die Erkenntnis, dass Trauma-aktiviertes PRF ein inflammatorisches Potenzial besitzt⁶, kann durch die vorliegenden Ergebnisse bestärkt werden.

Unterstützt wird die These, dass das PRF und nicht die MSC für die Faktorenausschüttung verantwortlich ist, ebenfalls durch die Arbeit von Verboket *et al.*⁶ Hier wurde eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 durch PRF nach Trauma beobachtet. Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass die Genexpression von IL-6 in MSC nach 24 Stunden erhöht ist und die Möglichkeit besteht, dass MSC IL-6 erst nach Stimulation durch andere Faktoren vermehrt ausschütten.⁹³ Liu *et al.* konnten zeigen, dass in MSC, welche mit proinflammatorischen Faktoren stimuliert worden sind, IL-6 hochreguliert werden kann.⁹⁴ Somit wäre es auch möglich, dass MSC an der erhöhten IL-6 Konzentration nach 72 und 120 Stunden beteiligt sind.

Auffällig ist neben den genannten Erkenntnissen, dass IL-6 im Überstand von Traumapatienten nach 72 Stunden signifikant höher liegt als nach 24 Stunden und nach 120 Stunden signifikant niedrigere Werte aufweist als nach 72 Stunden. Demnach ist anzunehmen, dass ein antiinflammatorischer Mechanismus auf die Ausschüttung von IL-6 einwirkt und die Konzentration von IL-6 und damit die Inflammation reduziert. Möglich ist, dass MSC, welchen

antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden, die Ausschüttung von IL-6 reduzieren.⁶⁴

Mitbeteiligt an diesem Mechanismus kann auch der antiinflammatorische FaktorIDO-2 sein, welcher die T-Zell-Aktivierung hemmen kann⁹² und ebenfalls nach 72 Stunden im Vergleich zu der Messung nach 24 Stunden und zur Probandengruppe nach 72 Stunden signifikant höher liegt. Dadurch, dass dieser abfallende Verlauf nur beim Trauma-aktiviertem PRF vorzufinden ist, kann vermutet werden, dass die durch das Trauma veränderten Eigenschaften des PRFs ausschlaggebend für die antiinflammatorische Kompensation sind. Der genaue Mechanismus kann durch die hier durchgeführten Versuche allerdings nicht dargestellt werden.

4.2.5 Diskussion Angiogenese

Entscheidend für die Regeneration von Weichteil- und Knochengewebe ist die Durchblutung.¹⁸ Der bisher potenteste Wachstumsfaktor für die Angiogenese und im Weiteren für die Gewebeformation ist VEGF.⁴

Die Ergebnisse dieser Studie konnten bei PRF von gesunden Probanden zeigen, dass VEGF im Überstand im Verlauf stetig vermehrt vorzufinden ist. Zudem konnte eine signifikant höhere Genexpression von VEGF nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Diese Ergebnisse gehen mit denen von Miron, Fujioka-Kobayashi *et al.* einher, da auch diese darlegen konnten, dass PRF von gesunden Probanden VEGF kontinuierlich ausschüttet und somit das Potenzial besitzt, die Angiogenese zu fördern.⁴

Bei den Traumapatienten konnten zwar im Überstand bis zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden steigende Werte beobachtet werden, allerdings fielen diese nach 120 Stunden wieder ab. Nach 24 Stunden lag die VEGF-Konzentration sogar signifikant höher als die der Probandengruppe. Es liegt dennoch die Vermutung nahe, dass die Angiogenese durch Trauma-aktiviertes PRF nicht im gleichen Maße wie bei gesunden Probanden gefördert werden kann, dadurch dass die Werte im Verlauf fallen. Signifikante Unterschiede zwischen den

Gruppen konnten nach 120 Stunden nicht gezeigt werden, dennoch wäre es interessant, die Entwicklung des VEGFs über diesen Zeitraum hinaus zu analysieren.

4.2.6 Diskussion osteogenes Differenzierungspotenzial

In einigen Studien konnte durch die Analyse der Genexpression der alkalischen Phosphatase gezeigt werden, dass PRF diese in Osteoblasten stimuliert und somit Einfluss auf die Knochenbildung nehmen kann.⁵²

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Genexpression von RUNX2 und COL1A in MSC nach 120 Stunden geringer bei co-Inkubation mit PRF sowohl von Traumatpatienten als auch von gesunden Probanden ist verglichen mit der Kontrolle. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in einem Zeitraum von 120 Stunden die co-Inkubation von PRF und MSC nicht zu einer Förderung der osteogenen Differenzierungsfähigkeit führt. Einige Studien zu PRF wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen durchgeführt⁹⁵, wohingegen der hier verwendete Messzeitraum bei 120 Stunden lag. Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse den Eindruck erwecken, dass PRF keine fördernde Wirkung auf die Differenzierung von MSC hat, wäre es dennoch möglich, dass die Differenzierung nach dem hier verwendeten Messzeitraum erst angeregt wird. Diese Hypothese gilt es allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da bei fehlender Genexpression von RUNX2 innerhalb von 120 Stunden eine osteogene Differenzierung im weiteren Verlauf eher als unwahrscheinlich gilt. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass RUNX2 vor allem in der frühen Phase der osteogenen Differenzierung eine hohe Genexpression aufweist.⁹⁶ Weitere Studien mit längeren Messzeiträumen müssen folgen, um das osteogene Differenzierungspotenzial im zeitlichen Verlauf besser darzustellen.

4.2.7 Diskussion Regeneration

Das Vorkommen und die Aktivität von MSC sind entscheidende Faktoren für die Regeneration.⁶⁹

Die vorliegenden Versuche zeigen im MTT-Test, dass die metabolische Aktivität von MSC nach co-Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf signifikant ansteigt. Zusätzlich stellte sich eine signifikant höhere Aktivität bei co-Inkubation mit Trauma-aktiviertem PRF im Vergleich zu PRF von gesunden Probanden dar, so dass vermutet werden kann, dass Trauma-aktiviertes PRF die Zellen stärker stimuliert als PRF von gesunden Probanden. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der MSC nach 120 Stunden zwischen den Traumapatienten und der Kontrollgruppe beobachtet werden, so dass nicht von einer generellen Aktivitätssteigerung durch Trauma-aktiviertes PRF gesprochen werden kann. Zu beachten ist, dass die Ergebnisse des MTT-Tests zwar Auskunft darüber liefern, wie sich die Aktivität der MSC verändert, allerdings nur schwer unterschieden werden kann, ob die Aktivitätssteigerung auf eine vermehrte Aktivität der Zellen zurückzuführen ist, oder ob es zu einer verstärkten Proliferation nach Inkubation mit Trauma-PRF gekommen ist. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich eine vielfach höhere Aktivität bei MSC, die mit Trauma-aktiviertem PRF co-inkubiert wurden, als bei denjenigen, welche mit PRF von gesunden Probanden co-inkubiert wurden. Das Ausmaß dieser Aktivitätssteigerung lässt eher vermuten, dass diese durch die Proliferation, das heißt eine Erhöhung der Zellzahl, zustande gekommen ist. Strauss *et al.* demonstrieren ebenfalls, dass PRF die Proliferation von MSC erhöhen kann und bestärken mit ihren Ergebnissen die genannten Beobachtungen.⁵²

Es wird davon ausgegangen, dass eine physiologische Konzentration an Wachstumsfaktoren die Wundheilung und Knochenregeneration verbessern kann. Eine supraphysiologische Konzentration an Wachstumsfaktoren soll sich sogar noch vorteilhafter auf das Gewebe auswirken.⁹⁷ PRF enthält eine erhöhte Menge an Wachstumsfaktoren, weshalb ihm wundheilungsfördernde Eigenschaften zugesprochen werden.⁵²

Die kontinuierliche und andauernde Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Fibrinmatrix stellt einen entscheidenden Vorteil für die Verwendung von PRF dar, da so die Konzentration an Wachstumsfaktoren in der Umgebung des PRFs aufrecht erhalten werden kann.⁸⁴ Diese Kontinuität ist darauf zurückzuführen, dass die dichte Fibrinmatrix langsamer resorbiert wird und die Freisetzung dadurch über einen längeren Zeitraum erfolgen kann.⁵⁵ Die hier beschriebenen Versuche zeigen, dass innerhalb des Messzeitraumes (120 Stunden) unterschiedlich hohe Werte von Wachstumsfaktoren beobachtet werden können. Die gemessenen Werte lagen nach 120 Stunden teilweise höher als nach 24 Stunden. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass PRF die Wachstumsfaktoren nicht unmittelbar ausschüttet, sondern eine kontinuierliche oder verzögerte Freisetzung erfolgt. Zudem sind auch Immunzellen Teil des PRFs⁴³ und können dadurch, dass sie im Fibrinnetzwerk gefangen sind, durch die Neubildung von Faktoren zu einer kontinuierlichen Freisetzung führen.

Es wurde in einer zurückliegenden Arbeit die Vermutung geäußert, dass Trauma-aktiviertes PRF durch die verminderte Freisetzung von VEGFA ein geringeres regeneratives Potenzial besitzt als PRF von gesunden Probanden.⁶ Die Regeneration, welche beispielsweise über *einen in vitro-Angiogenese Assay* spezifisch gemessen werden kann, wurde in dieser Arbeit nicht speziell untersucht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Trauma-aktiviertes PRF zu fallenden VEGFA-Werten im Überstand im Zeitraum zwischen 72 und 120 Stunden führte, im Gegensatz zu gesundem PRF, welches stetig steigende Werte aufwies. Dadurch, dass die Genexpression von RUNX2 und COL1A, welche beide Einfluss auf die Osteogenese nehmen, bei MSC nach Co-Inkubation mit Trauma-aktiviertem PRF ebenfalls niedriger lagen als bei der Kontrolle, kann die Vermutung, dass Trauma-aktiviertes PRF ein verringertes regeneratives Potenzial von Knochengewebe aufweist, bestärkt werden. Andere Einflussfaktoren wurden nicht gemessen und können daher nicht beurteilt werden.

Dohan Ehrenfest *et al.* vermuten, dass eine gleichzeitige Erhöhung der Proliferation und Stimulierung der Differenzierung von Osteoblasten durch

Plättchenkonzentrate unwahrscheinlich ist.⁴⁹ Kanno *et al.* beschreiben in ihrer Studie, dass PRP, einem dem PRF ähnlichem Produkt, erst nach der Zellteilung die Differenzierung anregt und die Genexpression von Differenzierungsmarkern erhöht.⁹⁸ Zu diesen Differenzierungsmarkern gehört auch das Cbfa1/RUNX2-Gen, welches als osteoblasten-spezifischer Transkriptionsfaktor für die Differenzierung bedeutend ist.⁹⁸

Die vorliegenden Versuche zeigten eine herabgesetzte Expression von RUNX2 und COL1A in MSC nach Co-Inkubation mit PRF. Daraus kann geschlossen werden, dass PRF innerhalb der ersten 120 Stunden nicht stimulierend auf die osteogene Differenzierung wirkt. Allerdings wurde nachgewiesen, dass vor allem Trauma-aktiviertes PRF im Gegensatz zu PRF von gesunden Probanden die metabolische Aktivität von MSC nach 120 Stunden steigert. Wenn diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen von Kanno *et al.* zu den Versuchen mit PRP in Verbindung gebracht werden und davon ausgegangen wird, dass PRF auf Grund ähnlicher Eigenschaft auch einen ähnlichen Einfluss hat, entsteht die Vermutung, dass PRF erst zu einem späteren Zeitpunkt positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung nimmt.⁹⁸ Um diese Vermutung zu bestätigen, müssen allerdings noch weitere Studien folgen.

4.2.8 Diskussion Gewebeersatz

Der bisherige Therapieansatz, autologes Material in Knochendefekte zu transplantieren, enthält Limitationen wie die Morbidität des Patienten und die Verfügbarkeit der benötigten Materialmenge.³⁶

PRF, welches vorteilhafte Effekte auf die Wundheilung hat, scheint ein vielversprechender Therapieansatz zu sein, um Knochendefekte zu versorgen. Allerdings wird PRF nach wenigen Tagen bereits resorbiert und kann den Defekt daher nicht langfristig füllen. Demnach sollten Kombinationen von PRF und anderen Materialien zur Transplantation in Erwägung gezogen werden.^{99 57}

Calori *et al.* führen an, dass ein Diamant-Konzept zur Versorgung von Knochendefekten von Vorteil sein kann.¹⁰⁰ Bei diesem Konzept werden die mechanische Umgebung, osteogene Zellen, osteoinduktive

Wachstumsfaktoren, ein osteokonduktives Gerüst und die Vaskularität berücksichtigt.¹⁰¹

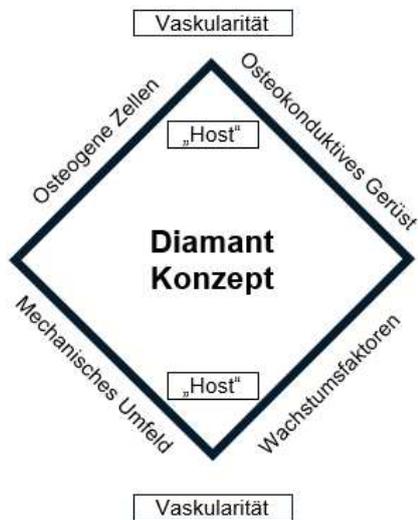


Abbildung 25: Diamant-Konzept zur Knochenheilung. Darstellung der verschiedenen Achsen, welche für die Knochenheilung relevant sind.

Die hier vorliegende Studie dient der Nachforschung, ob eine Kombination aus MSC und Trauma-aktiviertem PRF diese Eigenschaften mit sich bringen und damit eine gewinnbringende Therapiemöglichkeit darstellen kann.

Dabei scheint es förderlich zu sein, die Herstellung des PRFs und die anschließende Implantation erst nach einer gewissen Zeit nach dem Trauma vorzunehmen. Diese Schlussfolgerung beruht auf der Beobachtung, dass die Aktivität der MSC bei co-Inkubation mit Trauma-aktiviertem PRF nach 120 Stunden signifikant höher lag als nach nur 24 Stunden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von MAPK14 in MSC nach 120 Stunden signifikant geringer war als noch nach 24 Stunden. Auch die Genexpression von IL-6 stellte sich nach 120 Stunden geringer dar, allerdings ohne signifikanten Unterschied. Die beiden Faktoren MAPK14 und IL-6 besitzen ein inflammatorisches Potenzial, welches limitierend für die Wundheilung sein kann. Des Weiteren zeigte sich, dass die IL-6-Werte im Überstand bei Trauma-aktiviertem PRF von 72 bis 120 Stunden abnahmen, was als Indiz für ein

sinkendes inflammatorisches Potenzial angesehen werden kann. Diese Entwicklung würde den Einsatz von Trauma-aktiviertem PRF und MSC in Knochendefekte im zeitlichen Verlauf vielversprechend machen.

Besonders zu beachten ist, dass PRF viele zirkulierende Immunzellen enthält. Dies kann immunologische Effekte zur Folge haben. Demnach ist PRF nicht als einfaches Ersatzmaterial zu transplantieren, sondern autolog einzusetzen, um mögliche Komplikationen zu vermeiden.¹⁰²

4.3 Limitationen

Limitationen dieser Arbeit ergaben sich unter anderem durch das Patientenkollektiv. Neben einer nur geringen Anzahl an Teilnehmern (n=7) in jeder Gruppe ergaben sich Unterschiede in den Patientencharakteristika. Diese betrafen zum einen das Geschlecht mit einer unterschiedlichen Verteilung in den jeweiligen Gruppen sowie das Alter und mögliche Vorerkrankungen. Diese unterschiedlichen Verteilungen kamen dadurch zustande, dass Patienten in die Studie eingeschlossen werden sollten, die am Tag zuvor eine Operation erhalten hatten und eine bestimmte Verletzungsschwere aufwiesen. Diese Einschlusskriterien limitierten die Auswahl an Patienten.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Studie die PRF-MSC-Cokultur nur bis maximal 120 Stunden durchgeführt, was in dem nur begrenzt zur Verfügung stehenden PRF-Volumen begründet liegt. Demnach können Interpretationen der Ergebnisse nur auf diesen Zeitrahmen bezogen werden und lassen keine Aussagen über die Regulation der MSC und das Sekretom von PRF und MSC zu späteren Zeitpunkten zu.

4.4 Relevanz und Ausblick

Es konnte bereits aufgezeigt werden, dass aktuell noch kein ideales Verfahren zur Frakturbehandlung existiert.³⁶ Da Frakturen ein häufiges Krankheitsbild sind⁷⁶, benötigen sie ein gutes therapeutisches Verfahren, um die Heilung und damit die Wiedereingliederung des Patienten in den Alltag zu gewährleisten.

PRF hat bisher einige Vorteile gegenüber klassischen Verfahren gezeigt und bietet dadurch das Potenzial, in der Therapie routinemäßig eingesetzt zu werden.^{19 103}

Im Gegensatz zu PRP, welches durch den Einsatz von Antikoagulantien kritisch betrachtet wird, kann PRF ohne biochemische Manipulation hergestellt werden.

^{84 46} Im Vergleich fällt zudem auf, dass cPRP (*concentrated* PRP), welches durch zweifache Zentrifugation entsteht, einen nur kurzfristigen, wenn auch starken Effekt auf Zellen hat, während PRF bis zu 28 Tage Wachstumsfaktoren ausschütten kann.^{45 51}

Dadurch, dass PRF in der Regel ein autologes Produkt ist, sind Abstoßungsreaktionen nicht zu erwarten und PRF eignet sich daher als Produkt zur Defektversorgung.¹⁷

Neben den positiven Effekten auf die Heilung kann PRF auch einen positiven Einfluss auf das Empfinden der Patienten haben. In der Peridontalmedizin führte der Einsatz von PRF zu Schmerzlinderung und Reduzierung der Schwellung nach chirurgischen Eingriffen und hatte somit positive Effekte auf die Symptomentwicklung.^{104 105}

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination aus Knochenmaterial und PRF die Osteogenese bei parodontalen Defekten beeinflussen kann und die Qualität des neuen Knochenmaterials begünstigt.^{106 59} Auch liegt die Vermutung nahe, dass die Kombination von MSC und PRF einen positiven Einfluss auf die Regeneration haben kann.¹⁷ Da PRF allerdings als autologes Material eingesetzt werden soll, ist es sinnvoll das PRF von Traumapatienten genauer zu begutachten.

Diese Studie zeigt als eine der ersten den Einfluss von Trauma-aktiviertem PRF auf MSC *in vitro*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Trauma-aktiviertes

PRF die Proliferation von MSC mehr fördert als das PRF von gesunden Probanden.

Weitere Erkenntnisse konnten im Hinblick auf die Inflammation gewonnen werden. Im Überstand von MSC, die mit PRF von gesunden Probanden coinkubiert wurden, konnte eine ansteigende Konzentration des antiinflammatorischenIDO-2 im zeitlichen Verlauf sowie bei Traumapatienten eine Steigerung der Konzentration von 24 auf 72 Stunden festgestellt werden. Besonders in der letztgenannten Gruppe ist dies interessant, da bei steigender IDO-2-Konzentration nach 72 Stunden eine abfallende IL-6-Konzentration nach 120 Stunden beobachtet werden konnte. Demnach ist es möglich, dass Trauma-aktiviertes PRF die Inflammation hemmt und Einfluss auf den Heilungsverlauf nehmen kann.

Unklar bleibt allerdings noch der Einfluss von PRF auf die Differenzierung von MSC. Ein fördernder Effekt auf die osteogene Differenzierung konnte in der vorliegenden Studie nicht dargestellt werden; eine andere Untersuchung konnte jedoch eine stimulierende Wirkung auf diese feststellen.⁵² Inwiefern das Trauma-aktivierte PRF längerfristig auf diese einwirkt, konnte auf Grund des limitierten Probenvolumens nicht über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Die Kenntnis darüber, ob es einen längerfristigen Einfluss gibt, wäre von Bedeutung, um PRF in Kombination mit MSC als Transplantat bei Knochendefekten einsetzen zu können. Eine beschleunigte Differenzierung der MSC zu Osteoblasten kann förderlich sein, um eine Knochenheilung frühzeitig zu erzielen. Weitere Studien, die ein genaueres Augenmerk auf die osteogene Differenzierung legen und diese über einen längeren Zeitraum untersuchen, sollten folgen.

Des Weiteren wäre es wissenschaftlich bedeutsam, die *in vitro* Beobachtungen *in vivo* zu überprüfen. Die hier vorliegende Studie legt nahe, dass ein Einsatz des PRFs nicht unmittelbar nach dem Trauma erfolgen sollte, um die initial inflammatorische Komponente möglichst nicht auf den Patienten zu übertragen und das vermutete proliferative Potenzial zu einem späteren Zeitpunkt ausnutzen zu können. *In vivo* Studien könnten die Transplantation von PRF, zum Beispiel in Kombination mit MSC, in Knochendefekte weiter untersuchen.

Bei der Analyse der Wechselwirkung zwischen MSC und PRF kann in zukünftigen Studien auch das Vorkommen von durch Witwer *et al.*

beschriebenen extrazellulären Vesikeln genauer untersucht werden.⁸⁹ Es bleibt in dieser Studie offen, ob diese möglicherweise einen Einfluss auf die Ergebnisse hatten.

Abschließend kann festgehalten werden, dass PRF großes Potenzial besitzt, die Wundheilung von Knochendefekten zu verbessern, da es reich an Wachstumsfaktoren ist. Auch das Trauma-aktivierte PRF zeigt durch seine aktivitätsanstoßende Eigenschaft vielversprechenden Nutzen. Es ist Aufgabe der Forschung, dieses Material weiter zu analysieren, um die Therapie von Knochendefekten zu optimieren.

5. Zusammenfassung

Nach einer Fraktur leitet der Körper üblicherweise über verschiedene Prozesse die Wundheilung ein.⁴ Auf Grund unterschiedlicher Ursachen kann es dazu kommen, dass die körpereigenen Mechanismen nicht zu einer ausreichenden Defektheilung führen. Um die Funktionsfähigkeit des frakturierten Knochens trotzdem wiederherzustellen, kann auf unterschiedliche Materialien zur Defektversorgung zurückgegriffen werden. Der aktuelle Goldstandard beinhaltet die Transplantation von autologem Knochenmaterial in den Defekt. Dieses Verfahren hat allerdings den Nachteil, dass die Risiken der Gewebentnahme bestehen sowie die Gefahr, nicht immer genügend Material zur Verfügung zu haben.³³

Ein Forschungsansatz für ein alternatives Transplantationsmaterial ist es, mesenchymale Stammzellen (MSC) zu verwenden. Diese können sich in verschiedene Zellarten differenzieren und dadurch die Regeneration fördern.⁶⁶

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Frakturversorgung ist die therapeutische Verwendung von platelet-rich fibrin (PRF). Das Produkt kann durch einfaches Zentrifugieren hergestellt werden und ist reich an Thrombozyten und Leukozyten. Zudem kann es kontinuierlich Wachstumsfaktoren ausschütten, die von Thrombozyten stammen und im Fibrinnetzwerk eingebettet sind. Diese Eigenschaften führen dazu, dass PRF ein wundheilungsförderndes Potenzial zugesprochen wird.⁵²

Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung zwischen MSC und PRF von Traumapatienten herauszuarbeiten und zu überprüfen, ob ein therapeutischer Einsatz der Kombination von MSC und Trauma-aktiviertem PRF in Frakturen sinnvoll erscheint.

Hierfür wurden MSC mit PRF über einen Zeitraum von 24 oder 120 Stunden coinkubiert und die metabolische Aktivität, definierte Faktoren im Überstand und die Genexpression ausgewählter Faktoren in bis zu drei Messzeitpunkten überprüft. Die Versuche erfolgten vergleichend mit Traumapatienten und gesunden Probanden.

Es konnte gezeigt werden, dass Trauma-aktiviertes PRF verglichen mit PRF von gesunden Probanden die metabolische Aktivität von MSC nach 120

Stunden erhöhen kann. Zudem stellten sich erhöhte Werte des inflammatorischen Faktors IL-6 im Überstand bei Traumapatienten nach 24 und 72 Stunden dar, welche bis zum dritten Messzeitpunkt nach 120 Stunden wieder abfielen. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich bei den Messwerten von VEGFA, einem Faktor, welcher eine große Rolle bei der Angiogenese spielt. Über alle Messzeitpunkte hinweg konnten niedrigere Werte in der Genexpression von COL1A und RUNX2 im Vergleich zu den Kontrollmessungen erfasst werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu PRF gesunder Probanden Trauma-aktiviertes PRF die Möglichkeit besitzt, die Proliferation von MSC zu stimulieren. Außerdem wurde beobachtet, dass Trauma-aktiviertes PRF ein inflammatorisches und angiogenetisches Potenzial nach 72 Stunden besitzt, welches nach 120 Stunden allerdings wieder abfällt. Möglicherweise kann durch den Einfluss von MSC der Inflammation entgegengewirkt werden. Ein signifikantes osteogenes Potenzial des Trauma-aktivierten PRFs konnte zu keinem Messzeitpunkt nachgewiesen werden.

Inwiefern der Einsatz von MSC in Kombination mit Trauma-aktiviertem PRF die Frakturheilung verbessern kann, konnte in der vorliegenden Studie nicht eindeutig geklärt werden. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die Implantation von Trauma-aktiviertem PRF und MSC in den Defekt erst nach Verstreichen einer bestimmten Zeitperiode nach dem Trauma durchgeführt werden sollte. Die Gründe für diese Annahme sind das erhöhte proliferative und verringerte inflammatorische Potenzial im Verlauf. Eine Ursache für das Fehlen der osteogenen Differenzierung der MSC kann der kurze Messzeitraum sein. Weitere Studien sollten folgen, um das Potenzial der Kombination von MSC und Trauma-aktiviertem PRF als therapeutisches Verfahren zu überprüfen.

6. Summary

Following a fracture, the body usually initiates wound healing via various processes.⁴ Due to a variety of reasons, the body's own mechanisms may not lead to sufficient healing of the occurred defect. In order to fully restore the functionality of the fractured bone, different materials can be used for defect reconstruction. Currently considered gold standard is the transplantation of autologous bone material into the defect. However, this procedure brings the disadvantage of associated risks that arise from tissue harvesting, as well as the scarcity of available material.³³

One research approach for an alternative transplant material uses mesenchymal stem cells (MSCs). These can differentiate into distinct cell types to promote regeneration.⁶⁶

Another approach to improve fracture care is the therapeutic use of platelet-rich fibrin (PRF). PRF can be created by simple centrifugation and is rich in platelets and leukocytes. In addition, it can continuously secrete platelet-derived growth factors embedded in the fibrin network. These characteristics are the reason that PRF is considered to have viable wound healing potential.⁵²

The aim of the research presented here is to elaborate the interaction between MSC and PRF of trauma patients and to verify whether therapeutic use of the combination of MSC and trauma-activated PRF can be viable for the treatment of fractures.

For this purpose, MSC were co-incubated with PRF over a period of 24 or 120 hours and their metabolic activity, as well as defined factors in the supernatant and gene expression of selected factors were examined in up to three defined measurement points. The experiments were performed comparatively with trauma patients and a control group of healthy volunteers.

It was shown that trauma-activated PRF compared with PRF from healthy patients could actually increase the metabolic activity of MSC after 120 hours. In addition, increased levels of the inflammatory factor IL-6 were found in the supernatant of trauma patients at 24 and 72 hours, which decreased by the third measurement point at 120 hours. A similar trend was seen in the measurements of VEGFA, a factor that plays a major role in the angiogenesis.

Lower levels of COL1A and RUNX2 gene expression were detected across all measurement points compared to control measurements.

The results indicate that, compared with PRF from healthy subjects, trauma-activated PRF has the ability to stimulate MSC proliferation. Moreover, it was observed that trauma-activated PRF has inflammatory and angiogenic potential at 72 hours, but this potential decreases after 120 hours. It is possible that the influence of MSC may counteract inflammation. A significant osteogenic potential of trauma-activated PRF could not be detected at any measurement time point.

The extent to which the use of MSC in combination with trauma-activated PRF can improve fracture healing could not be clearly clarified in the present study. However, it can be assumed that implantation of trauma-activated PRF and MSC into the defect should be performed only after a certain minimum time period post trauma. The reasons for this assumption are the increased proliferative and decreased inflammatory potential over time. One reason for the lack of osteogenic differentiation of MSC may be the short measurement period.

Further studies should follow to verify the potential of the combination of MSC and trauma-activated PRF as a therapeutic procedure.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A-PRF	advanced PRF
AK	Anitkörper
BMP-2	bone morphogenic protein-2
ca.	circa
Cbfa1	core binding factor- α 1 gene
CD	cluster of differentiation
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cPRP	concentrated PRP
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GvHD	Graft-versus-host-Disease
h	Stunde
HLA-DR	human leukocyte antigen DR-Isotyp
I-PRF	injizierbares PRF
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
IDO2	Indoleamine 2,3-dioxygenase 2
IGF 1	insuline-like Wachstumsfaktor 1
IL	Interleukin
MAPK14	mitogen-aktivierte Proteinkinase 14
MAPK8	mitogen-aktivierte Proteinkinase 8
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloprotease

MSC	Mesenchymale Stammzellen
nm	Nanometer
OP	Operation
PBS w/o	Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride
PDGF	platelet-derived growth factor
post OP	postoperativ
PRF	Platelet-rich fibrin
PRP	Platelet-rich plasma
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RCF	relative centrifugal force, Zentrifugalbeschleunigung
rhBMP-2	recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute, Umdrehung pro Minute
RUNX2	runt-related transcription factor
sICAM	soluble intercellular adhesion molecule
SSC	Seitwärtsstreulicht
TGF - β 1	transformierender Wachstumsfaktor β 1
VEGFA	vaskulär, endothelialer Wachstumsfaktor A
μ l	Mikroliter

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Übersicht Studiendesign
Abbildung 2	Herstellung PRF
Abbildung 3	Versuchsaufbau PRF
Abbildung 4	Ergebnisse der FACS-Analyse zum Nachweis von MSC
Abbildung 5	FACS Analyse zur Charakterisierung des MSC-Pools
Abbildung 6	Differenzierbarkeit MSC in Osteoblasten und Adipozyten
Abbildung 7	Differenzierbarkeit MSC in Chondrozyten
Abbildung 8	Metabolische Aktivität der MSC nach Inkubation mit PRF im Zeitverlauf
Abbildung 9	Verringerung der metabolischen Aktivität nach 24 h Co-Inkubation mit PRF
Abbildung 10	Anstieg der metabolischen Aktivität nach 120h Co-Inkubation mit Trauma-PRF
Abbildung 11	CXCL10-Konzentration im Kulturüberstand nach Co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf
Abbildung 12	IL-6-Konzentration im Kulturüberstand nach Co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf
Abbildung 13	VEGF-Konzentration im Kulturüberstand nach Co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf
Abbildung 14	IDO-2 Konzentration im Kulturüberstand nach Co-Inkubation von MSC mit PRF im Zeitverlauf
Abbildung 15	MAPK8-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 16	MAPK14-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 17	IL-6-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 18	CXCL10-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf.

Abbildung 19	IDO-1-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 20	TNFAIP6-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf.
Abbildung 21	VEGFA-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 22	RUNX2-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 23	COL1A-Genexpression in MSC nach Inkubation mit PRF im zeitlichen Verlauf
Abbildung 24	Abhängigkeiten und Zusammenhänge der gemessenen Parameter
Abbildung 25	Diamant-Konzept zur Knochenheilung

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 2	Apparaturen
Tabelle 3	Medien, Puffer und Lösungen
Tabelle 4	FACS Antikörper
Tabelle 5	ELISA
Tabelle 6	RNA-Isolierung und PCR
Tabelle 7	Patientencharakteristika Traumagruppe
Tabelle 8	Probandencharakteristika

10. Literaturverzeichnis

1. Shin RLY, Lee CW, Shen OYJ, Xu H, Lee OKS. The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells Int.* 2021;2021:8835156. doi:10.1155/2021/8835156
2. Schiebler TH, Korf H-W. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, Makroskopische Und Mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflag. Heidelberg: Steinkorff Verlag; 2007.
3. Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S, et al. Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review. *ISRN Orthop.* 2012;2012:689012. doi:10.5402/2012/689012
4. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2017;23(1):83-99. doi:10.1089/ten.teb.2016.0233
5. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3-9.
6. Verboket R, Anbar B, Söhling N, et al. Changes in platelet-rich fibrin composition after trauma and surgical intervention. *Platelets.* 2020;31(8):1069-1079. doi:10.1080/09537104.2020.1714575
7. Jiao H, Xiao E, Graves D. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Reports.* 2015;13(5):327–335. doi:10.1007/s11914-015-0286-8.
8. Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature.* 2016;529(7586):307-315. doi:10.1038/nature17039
9. Al-Hamed FS, Mahri M, Al-Waeli H, Torres J, Badran Z, Tamimi F. Regenerative Effect of Platelet Concentrates in Oral and Craniofacial Regeneration. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:126. doi:10.3389/fcvm.2019.00126

10. Gómez-Puerto MC, Verhagen LP, Braat AK, Lam EWF, Coffe PJ, Lorenowicz MJ. Activation of autophagy by FOXO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation. *Autophagy*. 2016;12(10):1804-1816. doi:10.1080/15548627.2016.1203484
11. Chang IC, Tsai CH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2010;95(1):327-332. doi:10.1002/jbm.a.32839
12. D'souza N, Rossignoli F, Golinelli G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Med*. 2015;13(1). doi:10.1186/s12916-015-0426-0
13. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi:10.1155/2015/421746
14. Castillo-Cardiel G, López-Echaury AC, Saucedo-Ortiz JA, et al. Bone regeneration in mandibular fractures after the application of autologous mesenchymal stem cells, a randomized clinical trial. *Dent Traumatol*. 2017;33(1):38-44. doi:10.1111/edt.12303
15. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenlehrbuch Histologie*. Hrsg. 6.,. Stuttgart: Thieme; 2019.
16. Ortiz A d. ., Fideles SOM, Pomini KT, et al. Effects of Therapy with Fibrin Glue combined with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) on Bone Regeneration: A Systematic Review. *Cells*. 2021;10(9):2323. doi:10.3390/cells10092323
17. Wang Z, Hu H, Li Z, et al. Sheet of osteoblastic cells combined with platelet-rich fibrin improves the formation of bone in critical-size calvarial defects in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016;54(3):316-321. doi:10.1016/j.bjoms.2015.12.015
18. 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
19. Miron RJ, Moraschini V, Fujioka-Kobayashi M, et al. Use of platelet-rich

- fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2021;25(5):2461-2478. doi:10.1007/s00784-021-03825-8
20. Müller-Mai CM, Ekkernkamp A. *Frakturen: Klassifikation Und Behandlungsoptionen.* 1 st ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010.
 21. Nahles S, Nack C, Gratecap K, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Bone physiology in human grafted and non-grafted extraction sockets - an immunohistochemical study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(7):812-819. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02462.x
 22. González-Serrano J, Vallina C, González-Serrano C, et al. Effect of platelet concentrates on marginal bone loss of immediate implant procedures: A systematic review and meta-analysis. *Materials (Basel).* 2021;14(16):4582. doi:10.3390/ma14164582
 23. Turner JR. "Putting the squeeze" on the tight junction: Understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11(4):301-308. doi:10.1006/scdb.2000.0180
 24. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2009;8(5):379-383. doi:10.1016/j.autrev.2008.12.002
 25. Massalska M, Ciechomska M, Kuca-Warnawin E, et al. Effectiveness of Soluble CTLA-4-Fc in the Inhibition of Bone Marrow T-Cell Activation in Context of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) and CD4+Foxp3+ Treg Induction. *J Inflamm Res.* 2022;15:6813-6829. doi:10.2147/JIR.S359775
 26. Fatokun AA, Hunt NH, Ball HJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: Characteristics and potential roles in health and disease. *Amino Acids.* 2013;45(6):1319-1329. doi:10.1007/s00726-013-1602-1
 27. Grecu AF, Reclaru L, Ardelean LC, Nica O, Ciucă EM, Ciurea ME. Platelet-rich fibrin and its emerging therapeutic benefits for musculoskeletal injury treatment. *Med.* 2019;55(5). doi:10.3390/medicina55050141
 28. Compston J. Type 2 diabetes mellitus and bone. *J Intern Med.* 2018;283(2):140-153. doi:10.1111/joim.12725
 29. Ball AN, Donahue SW, Wojda SJ, et al. The challenges of promoting

- osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. *J Orthop Res.* 2018;36(6):1559-1572. doi:10.1002/jor.23845
30. Lundquist R, Holmstrøm K, Clausen C, Jørgensen B, Karlsmark T. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. *Wound Repair Regen.* 2013;21(1):66-76. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00870.x
 31. Everding J, Stolberg-Stolberg J, Raschke MJ, Stange R. Stimulation of fracture healing by growth factors and cell-based technologies. *Unfallchirurgie.* 2019;122(7):534-543. doi:10.1007/s00113-019-0686-9
 32. Herrera-Vizcaíno C, Dohle E, Al-Maawi S, et al. Platelet-rich fibrin secretome induces three dimensional angiogenic activation in vitro. *Eur Cell Mater.* 2019;37:250-264. doi:10.22203/eCM.v037a15
 33. Verboket R, Herrera-Vizcaíno C, Thorwart K, et al. Influence of concentration and preparation of platelet rich fibrin on human bone marrow mononuclear cells (in vitro). *Platelets.* 2019;30(7):861-870. doi:10.1080/09537104.2018.1530346
 34. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Açil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):543-549. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01900.x
 35. Coury AJ. Expediting the transition from replacement medicine to tissue engineering. *Regen Biomater.* 2016;3(2):111-113. doi:10.1093/RB/RBW014
 36. Gassling V, Hedderich J, Açil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(3):320-328. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02333.x
 37. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials.* 2003;24(18):3095-3100. doi:10.1016/S0142-9612(03)00114-5
 38. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):120-129. doi:10.1089/ten.2005.11.120

39. 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):e45-50. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.009
40. Abdel-Rahman FH, Salem AS, El-Shinnawi UM, Hammouda NI, El-Kenawy MH, Maria OM. Efficacy of Autogenous Platelet-Rich Fibrin Vs Slowly Resorbable Collagen Membrane With Immediate Implants in the Esthetic Zone. *J Oral Implantol*. 2021;47(4):342-351. doi:10.1563/aid-joi-D-20-00124
41. 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):e37-44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
42. 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
43. 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/aid-joi-D-14-00138
44. Kotsovilis S, Markou N, Pepelassi E, Nikolidakis D. The adjunctive use of platelet-rich plasma in the therapy of periodontal intraosseous defects: A systematic review. *J Periodontal Res*. 2010;45(3):428-443. doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01236.x
45. Kang YH, Jeon SH, Park JY, et al. Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng - Part A*. 2011;17(3-4):349-359. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0327
46. Oneto P, Zubiry PR, Schattner M, Etulain J. Anticoagulants Interfere With the Angiogenic and Regenerative Responses Mediated by Platelets. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:223. doi:10.3389/fbioe.2020.00223
47. Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM. Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A Radiologic and Histologic Study at 6 Months. *J Periodontol*.

- 2009;80(12):2056-2064. doi:10.1902/jop.2009.090252
48. Patel GK, Gaekwad SS, Gujjari SK, S.C. VK. Platelet-Rich Fibrin in Regeneration of Intraony Defects: A Randomized Controlled Trial. *J Periodontol*. 2017;88(11):1192-1199. doi:10.1902/jop.2017.130710
 49. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;108(3):341-352. doi:10.1016/j.tripleo.2009.04.020
 50. Lourenço ES, Mourão CF de AB, Leite PEC, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD, Alves GG. The in vitro release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2018;106(5):1373-1380. doi:10.1002/jbm.a.36346
 51. Muñoz F, Jiménez C, Espinoza D, Vervelle A, Beugnet J, Haidar Z. Use of leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) in periodontally accelerated osteogenic orthodontics (PAOO): Clinical effects on edema and pain. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(2):e119-e124. doi:10.4317/jced.52760
 52. Strauss FJ, Nasirzade J, Kargarpoor Z, Stähli A, Gruber R. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies. *Clin Oral Investig*. 2020;24(2):569-584. doi:10.1007/s00784-019-03156-9
 53. Wend S, Kubesch A, Orłowska A, et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28(12):188. doi:10.1007/s10856-017-5992-6
 54. 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*. 2019;45(3):467-479. doi:10.1007/s00068-017-0785-7
 55. Lekovic V, Milinkovic I, Aleksic Z, et al. Platelet-rich fibrin and bovine

- porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontal Res.* 2012;47(4):409-417. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01446.x
56. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen.* 2008;16(3):356-363. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00344.x
 57. Francisco I, Fernandes MH, Vale F. Platelet-rich fibrin in bone regenerative strategies in orthodontics: A systematic review. *Materials (Basel).* 2020;13(8). doi:10.3390/ma13081866
 58. Clark D, Rajendran Y, Paydar S, et al. Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2018;89(4):379-387. doi:10.1002/JPER.17-0466.
 59. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2017;21(6):1913-1927. doi:10.1007/s00784-017-2133-z
 60. Liu R, Yan M, Chen S, Huang W, Wu D, Chen J. Effectiveness of Platelet-Rich Fibrin as an Adjunctive Material to Bone Graft in Maxillary Sinus Augmentation: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trails. *Biomed Res Int.* 2019;2019:7267062. doi:10.1155/2019/7267062
 61. Sharma A, Pradeep AR. Autologous Platelet-Rich Fibrin in the Treatment of Mandibular Degree II Furcation Defects: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol.* 2011;82(10):1396-1403. doi:10.1902/jop.2011.100731
 62. Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: A pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med.* 2004;25(8):588-593. doi:10.1055/s-2004-821304
 63. Trybek G, Rydlińska J, Aniko-Włodarczyk M, Jaroń A. Effect of platelet-rich fibrin application on non-infectious complications after surgical extraction of impacted mandibular third molars. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(16). doi:10.3390/ijerph18168249
 64. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: A review. *Int Orthop.* 2013;37(12):2491-2498. doi:10.1007/s00264-013-2059-2

65. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204. doi:10.1186/ar2116
66. Liu H, Li D, Zhang Y, Li M. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):393-404. doi:10.1007/s00418-018-1643-3
67. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(17):3323-3348. doi:10.1007/s00018-019-03125-1
68. Gruhn B, Brodt G, Ernst J. Extended Treatment with Mesenchymal Stromal Cells-Frankfurt am Main in a Pediatric Patient with Steroid-refractory Acute Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease: Case Report and Review of the Literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2021;43(3):e419-e425. doi:10.1097/MPH.0000000000001758
69. Elgaz S, Kuçi Z, Kuçi S, Bönig H, Bader P. Clinical Use of Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. *Transfus Med Hemotherapy.* 2019;46(1):27-34. doi:10.1159/000496809
70. Beitzel K, McCarthy MB, Cote MP, et al. Properties of biologic scaffolds and their response to mesenchymal stem cells. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2014;30(3):289-298. doi:10.1016/j.arthro.2013.11.020
71. Apatzidou DA, Bakopoulou AA, Kouzi-Koliakou K, Karagiannis V, Konstantinidis A. A tissue-engineered biocomplex for periodontal reconstruction. A proof-of-principle randomized clinical study. *J Clin Periodontol.* 2021;48(8):1111-1125. doi:10.1111/jcpe.13474
72. Gómez-Barrena E, Rosset P, Gebhard F, et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials.* 2019;196:100-108. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.03.033
73. Kuçi Z, Bönig H, Kreyenberg H, et al. Mesenchymal stromal cells from pooled mononuclear cells of multiple bone marrow donors as rescue therapy in pediatric severe steroid-refractory graft-versus-host disease: A

- multicenter survey. *Haematologica*. 2016;101(8):985-994. doi:10.3324/haematol.2015.140368
74. Bader P, Kuçi Z, Bakhtiar S, et al. Effective treatment of steroid and therapy-refractory acute graft-versus-host disease with a novel mesenchymal stromal cell product (MSC-FFM). *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(7):852-862. doi:10.1038/s41409-018-0102-z
 75. Habibovic P. Strategic directions in osteoinduction and biomimetics. *Tissue Eng - Part A*. 2017;23(23-24):1295-1296. doi:10.1089/ten.tea.2017.0430
 76. Singh R, Rohilla R, Gawande J, Kumar Sehgal P. To evaluate the role of platelet-rich plasma in healing of acute diaphyseal fractures of the femur. *Chinese J Traumatol - English Ed*. 2017;20(1):39-44. doi:10.1016/j.cjtee.2016.03.007
 77. Hisatome T, Yasunaga Y, Yanada S, Tabata Y, Ikada Y, Ochi M. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. *Biomaterials*. 2005;26(22):4550-4556. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.032
 78. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int*. 2007;80(4):294-300. doi:10.1007/s00223-007-9020-6
 79. 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;2015:762407. doi:10.1155/2015/762407
 80. Hartlev J, Nørholt SE, Spin-Neto R, Kraft D, Schou S, Isidor F. Histology of augmented autogenous bone covered by a platelet-rich fibrin membrane or deproteinized bovine bone mineral and a collagen membrane: A pilot randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res*. 2020;31(8):694-704. doi:10.1111/clr.13605
 81. Lord JM, Midwinter MJ, Chen Y-F, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet*. 2014;384(9952):1455-1465. doi:10.1016/S0140-6736(14)60687-5
 82. Mörs K, Wagner N, Sturm R, et al. Enhanced pro-inflammatory response

- and higher mortality rates in geriatric trauma patients. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2021;47(4):1065-1072. doi:10.1007/s00068-019-01284-1
83. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol*. 2010;81(4):546-555. doi:10.1902/jop.2009.090531
84. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2019;107(10):2257-2271. doi:10.1002/jbm.a.36734
85. Miron RJ, Dham A, Dham U, Zhang Y, Pikos MA, Sculean A. The effect of age, gender, and time between blood draw and start of centrifugation on the size outcomes of platelet-rich fibrin (PRF) membranes. *Clin Oral Investig*. 2019;23(5):2179-2185. doi:10.1007/s00784-018-2673-x
86. Zhao L, Chen S, Yang P, Cao H, Li L. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: Prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):182. doi:10.1186/s13287-019-1287-9
87. Liebergall M, Schroeder J, Mosheiff R, et al. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: A randomized and prospective preliminary study. *Mol Ther*. 2013;21(8):1631-1638. doi:10.1038/mt.2013.109
88. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2007;25(2):371-379. doi:10.1634/stemcells.2005-0620
89. Witwer KW, Van Balkom BWM, Bruno S, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1). doi:10.1080/20013078.2019.1609206
90. Chen JM, Huang QY, Zhao YX, Chen WH, Lin S, Shi QY. The Latest Developments in Immunomodulation of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Intrauterine Adhesions, Both Allogeneic and Autologous. *Front Immunol*. 2021;12:785717. doi:10.3389/fimmu.2021.785717
91. Fisher SA, Cutler A, Doree C, et al. Mesenchymal stromal cells as

- treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1(1). doi:10.1002/14651858.CD009768.pub2
92. Nouël A, Pochard P, Simon Q, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun.* 2015;59:53-60. doi:10.1016/j.jaut.2015.02.004
 93. Noronha NDC, Mizukami A, Calíari-Oliveira C, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):1-21. doi:10.1186/s13287-019-1259-0
 94. Liu C, Xu Y, Lu Y, et al. Mesenchymal stromal cells pretreated with proinflammatory cytokines enhance skin wound healing via IL-6-dependent M2 polarization. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):1-17. doi:10.1186/s13287-022-02934-9
 95. Knapen M, Gheldof D, Drion P, Layrolle P, Rompen E, Lambert F. Effect of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) on bone regeneration: A study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(S1):e143-e152. doi:10.1111/cid.12146
 96. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and role of transcription factors in osteogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):1-21. doi:10.3390/ijms22115445
 97. Strauss FJ, Stähli A, Gruber R. The use of platelet-rich fibrin to enhance the outcomes of implant therapy: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(Suppl 18):6-19. doi:10.1111/clr.13275
 98. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(3):362-369. doi:10.1016/j.joms.2004.07.016
 99. Najeeb S, Khurshid Z, Agwan MAS, Ansari SA, Zafar MS, Matinlinna JP. Regenerative Potential of Platelet Rich Fibrin (PRF) for Curing Intrabony Periodontal Defects: A Systematic Review of Clinical Studies. *Tissue Eng Regen Med.* 2017;14(6):735-742. doi:10.1007/s13770-017-0079-5
 100. Calori GM, Colombo M, Ripamonti C, et al. Polytherapy in bone regeneration: clinical applications and preliminary considerations. *Int J*

- Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(1 Suppl 2):85-90.
doi:10.1177/03946320110241s216
101. Miska M, Schmidmaier G. Diamond concept for treatment of nonunions and bone defects. *Unfallchirurg.* 2020;123(9):679-686.
doi:10.1007/s00113-020-00843-1
 102. 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 Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101(3):e56-60. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.011
 103. Chatterjee A, Pradeep AR, Garg V, Yajamanya S, Ali MM, Priya VS. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous platelet-rich fibrin and titanium platelet-rich fibrin: a randomized, clinical, comparative study. *J Investig Clin Dent.* 2017;8(3). doi:10.1111/jicd.12231
 104. Shah M, Deshpande N, Bharwani A, Nadig P, Doshi V, Dave D. Effectiveness of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony defects: A systematic review and meta-analysis. *J Indian Soc Periodontol.* 2014;18(6):698-704. doi:10.4103/0972-124X.147400
 105. Gangwar S, Pal US, Singh S, Singh RK, Singh V, Kumar L. Immediately placed dental implants in smokers with plasma rich in growth factor versus without plasma rich in growth factor: A comparison. *Natl J Maxillofac Surg.* 2018;9(1):39-47. doi:10.4103/njms.NJMS_74_17
 106. Agarwal A, Gupta ND, Jain A. Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split mouth clinical trail. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(1):36-43. doi:10.3109/00016357.2015.1035672

11. Lebenslauf

12. Danksagung

13. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Der Einfluss von Trauma-aktiviertem platelet-rich fibrin auf mesenchymale Stammzellen in vitro

am Zentrum der Chirurgie, in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. René D. Verboket ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)