

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische
Immunologie/Labor für Tissue Engineering
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

"Untersuchung der bioaktiven Eigenschaften von plättchenreichem
Plasma für die Anwendung in der in situ Knorpelregeneration"

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Philipp Krüger

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	Seite 1
Abstract	Seite 2
Einleitung	Seite 3
Methoden	Seite 5
Ergebnisse	Seite 10
Diskussion	Seite 14
Literaturverzeichnis	Seite 17
Eidesstattliche Versicherung	Seite 21
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	Seite 22
Publikation 1:	Seite 23
"Human Platelet-Rich Plasma Stimulates Migration and Chondrogenic Differentiation of Human Subchondral Progenitor Cells"	
Publikation 2:	Seite 31
"Human Platelet-Rich Plasma Induces Chondrogenic Differentiation of Subchondral Progenitor Cells in Polyglycolic Acid-Hyaluronan Scaffolds"	
Publikation 3:	Seite 43
"Bioactive Factors in Platelet-Rich Plasma Obtained by Apheresis"	
Lebenslauf	Seite 52
"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."	
Publikationsliste	Seite 54
Danksagung	Seite 57

Zusammenfassung

Heutzutage wird plättchenreiches Plasma (PRP) in der regenerativen Medizin immer häufiger zur Unterstützung der körpereigenen Heilungsprozesse angewandt. So konnte anhand einer gut dokumentierten Fallserie belegt werden, dass PRP in Kombination mit Polyglykolsäure-Hyaluronsäure (PGA-HA)-Implantaten und der Mikrofrakturierung bei Patienten mit einem fokalen chondralen Defekt zu einer signifikanten Verbesserung der Konstitution und zu einer Bildung von hyalinem Ersatzgewebe im Defekt führte. Jedoch ist der biologische Effekt von PRP auf die Migration und Knorpelregeneration von mesenchymal Stamm- und Vorläuferzellen, wie sie bei der Mikrofrakturierung stimuliert werden, unklar. Daher sollte geklärt werden, welchen Einfluss humanes PRP sowohl auf die Migration als auch auf die Chondrogenese von humanen mesenchymalen Vorläuferzellen (CSP, cortico-spongious progenitor cells) in Hochdichte-Pelletkulturen hat. Um näher an der klinischen Anwendung zu sein, wird zusätzlich die Wirkungsweise von PRP auf CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten untersucht. Außerdem wurden zur Bestimmung der Zusammensetzung möglicher enthaltender chondrogener Wachstumsfaktoren im PRP membranbasierte Antikörpertests durchgeführt und ausgewählte Wachstumsfaktoren mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Gehalt an 0,1 % bis 100 % PRP die Zahl an migrierten Zellen gegenüber der Negativkontrolle signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht. Dabei zeigte sich die höchste Anzahl an migrierten Zellen bei einem PRP Gehalt von 5 %. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PRP die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen und CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene stimuliert. In den Pellet- und Implantatenkulturen induzierte 5 % PRP signifikant ($p \leq 0,05$) die Expression der typischen chondrogenen Markergene Kollagen Typ II, COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) und Aggrekan. Auch die Bildung von Proteoglykan- und Kollagen Typ II-reicher Matrix war in Pelletkulturen und PGA-HA-Implantaten zu beobachten. Die Quantifizierung der ausgewählten Wachstumsfaktoren mittels ELISA in PRP ergab eine durchschnittliche Konzentration von 0,31 ng/ml für BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2), 0,50 ng/ml für CTGF (Connective Tissue Growth Factor), 0,76 ng/ml für FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und 0,59 ng/ml TGF- β 3 (Transforming Growth Factor- β 3).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass PRP sowohl die Migration von CSP-Zellen als auch die Chondrogenese von CSP-Zellen sowohl in Hochdichte-Pelletkulturen als auch in PGA-HA-Implantaten stimuliert. Somit könnte PRP ein wirkungsvolles Mittel für die lokale Applikation von chondrogenen Wachstumsfaktoren sein, welche dann im Defekt die Knorpelheilung durch Stimulation der Zellmigration und -differenzierung unterstützt.

Abstract

Today, platelet-rich plasma (PRP) is more and more common in regenerative medicine to support the natural healing process. In a recent case series, 52 patients with focal chondral defects received polyglycolic acid-hyaluronan (PGA-HA) scaffolds augmented with PRP after microfracture. This procedure resulted in a significant improvement of the patients' situation and in the formation of hyaline-like cartilage. However, information about the underlining biological mechanism and about cell migration and cartilage regeneration of mesenchymal stem and progenitor cells are unclear. Therefore, the influence of human PRP on cell migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitors (CSP, cortico-spongious progenitor cells) in high-density pellet cultures has to be evaluated. In order to be closer to the clinical application the influence of PRP on CSP-cells seeded in PGA-HA scaffolds was determined. For identification of possible chondrogenic growth factor composition Protein Antibody Membrane Arrays were performed. Selected growth factors involved in chondrogenic differentiation were quantified by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

It was shown that a PRP content about 0.1 % up to 100 % increased the number of migrated cells significantly ($p \leq 0.05$) compared to the negative control. The highest number of migrated cells was observed at 5 % PRP. Human subchondral progenitors cultivated in high-density pellet cultures or in PGA-HA scaffolds in presence of 5 % PRP showed chondrogenic induction on gene expression and protein level. Gene expression analysis of typical chondrocyte marker genes collagen type II, cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and aggrecan demonstrated that these genes were significantly ($p \leq 0.05$) increased in high-density pellet cultures and CSP-cell seeded PGA-HA implants. Also the formation of proteoglycan and collagen type II rich matrix was observed in high-density pellet cultures as well as CSP-cell seeded PGA-HA scaffolds.

Quantification of selected chondrogenic growth factors in PRP by ELISA showed an average concentration of 0.31 ng/ml bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 0.50 ng/ml connective tissue growth factor (CTGF), 0.76 ng/ml fibroblast growth factor-2 (FGF-2), and 0.59 ng/ml transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3).

In conclusion, PRP stimulating the migration and chondrogenic differentiation of CSP-cells in high-density pellet cultures as well as in PGA-HA scaffolds. Therefore, it seemed that PRP is a powerful tool for the local application of chondrogenic growth factors to the site of injury and may support cartilage repair by stimulating cell migration and differentiation.

Einleitung

Knorpelschäden und die sich daraus ergebenden Folgeerkrankungen des Kniegelenkes gehören zu den weitverbreitetsten Erkrankungen weltweit. Neben degenerativen Gelenkerkrankungen sind traumatische Verletzungen des Knorpels, durch Sport oder alltägliche körperliche Belastung, die am häufigsten auftretenden Knorpelschäden, welche primär eine Reduktion der Lebensqualität durch zunehmende funktionelle Beeinträchtigung der Bewegungsfreiheit zur Folge haben und durch starke Schmerzen gekennzeichnet sind [1]. Neben den konservativen Therapien bieten neue Technologien auf dem Gebiet der regenerativen Medizin alternative Behandlungsmethoden, die bessere medizinische Erfolge erzielen könnten als bisher. Ein Therapieansatz besteht darin, durch Rekrutierung mesenchymaler Stamm- und Vorläuferzellen zum Gelenkdefekt und anschließender Differenzierung der Zellen eine Reparatur des Knorpelschadens mit qualitativ hochwertigem Knorpelersatzgewebe zu erreichen.

Einen Ansatz hierfür bietet die Mikrofrakturierung [2]. Bei dieser Technik werden kleine Löcher in den subchondralen Knochen gebohrt, durch die es zur Einblutung kommt. Dabei entsteht ein Blutgerinnsel, welches den Defektort verschließt und fibröses Reparaturgewebe ausbildet. Jedoch zeigen vorliegende klinische Ergebnisse, dass es unvorhersehbar ist, welche Qualität das entstehende Reparaturgewebe hat [3]. Zur Verbesserung dieser Technik eignen sich zellfreie 3D-Trägermaterialien, die direkt nach der Mikrofrakturierung zur Defektabdeckung eingebracht werden. Diese Technik erlaubt Stamm- bzw. Vorläuferzellen in den Defektort migrieren zu lassen und diese zur Ausbildung von neuem Knorpelgewebe anzuregen. Eines dieser zellfreien Trägermaterialien ist aus resorbierbarer Polyglykolsäure-Hyaluronsäure (PGA-HA) gefertigt und wird in Kombination mit autologem Serum verwendet. Diese PGA-HA-Implantate besitzen eine zugfeste textile Struktur mit einem Einzelfaserdurchmesser von etwa 17 μm [4], die über einen Zeitraum von etwa 5 Wochen (*in vivo*) resorbiert [5]. Die Hyaluronsäure, welche ein Molekulargewicht von ungefähr $1,2 \times 10^6$ Da besitzt, wird mittels Gefriertrocknung in das PGA-Implantat integriert. Im Großtiermodell wurde bereits gezeigt, dass die Implantation dieses zellfreien Trägermaterials in Kombination mit autologem Serum im Anschluss an die Mikrofrakturierung Vorläuferzellen einwandern lässt und sich ein hyalines, knorpelähnliches Ersatzgewebe ausbildet. Dies wurde 6 Monate nach Implantation durch histologische Untersuchungen bestätigt. Hierbei zeigte sich, dass im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die nur eine Mikrofrakturierung erhielt, ein hochwertigeres knorpelähnliches Ersatzgewebe ausgebildet wurde [6]. Diese Methode kommt bereits auch in der Klinik zum Einsatz, dabei zeigen die ersten klinischen Daten nach ein bis zwei Jahren gute Resultate bei der Defektfüllung und der

Ausbildung von Knorpelersatzgewebe [7]. Die bei der Mikrofrakturierung stimulierten Zellen sind mesenchymale Vorläuferzellen, die ihren Ursprung im subchondralen Knochen haben. Als *in vitro* Zellmodell dienen hierzu mesenchymale Vorläuferzellen die aus dem kortikalem Spongiosa des Femurkopfes gewonnen werden (CSP, cortico-spongious progenitor cells). Diese CSP-Zellen besitzen ein hohes Proliferationspotential und haben die Fähigkeit zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen zu differenzieren. Außerdem zeigen CSP-Zellen die typischen, von mesenchymalen Stammzellen bekannten, Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105 und CD166 [8]. Die Migration und Rekrutierung der Vorläuferzellen bei der Mikrofrakturierung kann durch Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche in verschiedenen Konzentrationen im humanen Serum vorkommen, angeregt werden [9]. Eine Alternative zum Serum hinsichtlich der migratorischen Eigenschaften könnte plättchenreiches Plasma (PRP) darstellen. Es wurde bereits gezeigt, dass PRP verschiedene Wachstumsfaktoren enthält, die durch Aphärese oder Zentrifugation aufkonzentriert werden können [10]. Heutzutage wird PRP unter anderem in der Dentalchirurgie, bei Wirbelsäulenoperationen und in der Orthopädie zur Unterstützung der Wundheilung und Schmerzlinderung eingesetzt [11]. Außerdem konnte anhand einer gut dokumentierten Fallserie von 52 Patienten belegt werden, dass PRP in Kombination mit PGA-HA-Implantaten und Pridie-Bohrung, einer Mikrofrakturierungstechnik, bei Patienten mit einem fokalen chondralen Defekt zu einer signifikanten Verbesserung der Konstitution, und zu einer Bildung von hyalinem Ersatzgewebe im Defekt führt [12]. Im Gegensatz dazu führt der Einsatz von knochenmarkstimulierenden Techniken, wie zum Beispiel der Mikrofrakturierung allein oft zur Bildung eines qualitativ schlechteren Ersatzgewebes, bestehend aus fibrösen Reparaturgewebe [13]. Möglicherweise kommt die Bildung des fibrösem Ersatzgewebes durch eine unzureichende Stimulation zustande, welche notwendig wäre, um ein hochwertiges hyalines Ersatzgewebe im Defekt zu bilden. Diese Stimulation könnte durch verschiedene Bestandteile im PRP angeregt werden.

PRP ist definiert als eine Plasmafraktion des Blutes mit einer bestimmten Plättchenkonzentration von $0,6-1,8 \times 10^{10}/\text{ml}$ [14]. Durch Lyse der enthaltenden Zellen werden zahlreiche Proteine freigesetzt [15]. Zusätzlich zu Chemokinen, wie zum Beispiel CCL3, CCL5, CCL7 oder CXCL1 und CXCL12, welche CSP-Zellen zur Migration anregen [16], Zytokinen und anderen Proteinen, werden auch Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDAF (Platelet-Derived Angiogenesis Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und TGF- β (Transforming Growth Factor- β) freigesetzt [17]. Von TGF- β , FGF-2 und IGF ist bekannt, dass sie sowohl die Proteoglykansynthese als auch die Bildung der extrazellulären

Matrix bei mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen induzieren [18-20]. Diese Vielfalt an Wachstumsfaktoren und Chemokinen des PRP könnte für die Ausbildung eines Knorpelersatzgewebes bei der Mikrofrakturierung in der Kombination mit einem 3D-Trägermaterial verantwortlich sein, in dem es die Migration und die chondrogene Differenzierung von Zellen stimuliert. Bisher ist der biologische Effekt von PRP hinsichtlich der Migration und Knorpelregeneration auf mesenchymal Stamm- und Vorläuferzellen, wie sie bei der Mikrofrakturierung stimuliert werden, nicht untersucht worden.

Daher soll diese Studie dazu beitragen zu klären, welchen Einfluss PRP auf die Migration und auf die TGF- β 3 vermittelte Chondrogenese von mesenchymalen Vorläuferzellen in Hochdichte-Pelletkulturen hat. Um den Bezug zur klinischen Anwendung herzustellen, soll die Wirkungsweise von PRP in Kombination mit mesenchymalen Vorläuferzellen in klinisch relevanten PGA-HA Implantaten untersucht werden. Außerdem soll geklärt werden, welche im PRP enthaltenen bioaktiven Wachstumsfaktoren möglicherweise mit der Redifferenzierung von Chondrozyten oder der Chondrogenese von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen assoziierten und im PRP enthalten sind.

Methoden

Gewinnung und Aktivierung von humanem plättchenreichen Plasma (PRP)

PRP (n=6) wurde von gesunden Blutspendern (18-68 Jahre) mittels Apherese gewonnen. Die Plättchenkonzentrationen betragen 0,6-1,3 x 10¹⁰/ml und die Leukozytenanzahl war kleiner als 0,3 x 10⁴/ml. Das PRP wurde nach Weibrich *et al.* [21] aktiviert und dann bis zur endgültigen Verwendung bei -20 °C eingefroren. Für die jeweiligen Versuche wurde das PRP bei 4 °C aufgetaut und anschließend bei 4 °C und 1 600 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um noch vorhandenes Fibrinogen abzutrennen. Danach wurde der Gesamtproteingehalt gemäß Herstellerangabe von jedem PRP-Spender mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Reaktion bestimmt.

Isolation und Kultivierung von humanen kortikospongiösen Vorläuferzellen

Sowohl für den Migrationsversuch als auch für die Differenzierungsversuche wurden humane CSP-Zellen (je n=3) aus dem Spongiosa des Femurkopfes isoliert. Dafür wurde die Spongiosa in kleine Stücke zerteilt und mittels Kollagenase XI für 4 Stunden bei 37 °C verdaut. Nach dem Verdau wurden die Knochenfragmente in eine Primaria® Zellkulturflasche überführt und mit DME-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium), welches 10 % Humanserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Gentamycin, 0,1 µg/ml Amphotericin B, 2 mM

N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin und 2 ng/ml humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 enthält, kultiviert. Als die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % aufwiesen, wurden sie mittels Trypsin abgelöst und mit einer Zelldichte von 8 000 Zellen/cm² neu ausgesät. Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Charakterisierung der Oberflächenantigene von CSP-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der typischen, von mesenchymalen Vorläuferzellen bekannten, Oberflächenantigene, wurden CSP-Zellen der Passage 3 (15 000 Zellen/Messung) mit Phycoerytherin (PE) oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten, anti-humanen Antikörpern gegen CD45, CD73, CD90, CD105 oder CD166 markiert, am FACS-Calibur gemessen und mittels Herstellersoftware analysiert. Ungefärbte Zellen dienten als Negativkontrolle und zur Einstellung des Forward- und Sideward-Scatters sowie des Detektionsgrenzwertes (Treshold). Tote Zellen wurden durch Propidiumiodidfärbung aus der Analyse ausgeschlossen und CD34-PE/FITC gefärbte Zellen dienten als Isotypenkontrolle.

Untersuchung der stimulierenden Wirkung von PRP auf die Zellmigration von CSP-Zellen

Zur Bestimmung des migratorischen Effektes von PRP auf CSP-Zellen (Passage 3) wurde ein 96 Multi-Well Migrations-Assay verwendet. Dabei wurde PRP (0,1 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 % PRP in DME-Medium mit 0,1 % Humanserum und 100 % PRP) in die untere Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und mit einer Polycarbonatmembran überdeckt. Als Positivkontrolle wurde DME-Medium mit 10 % Humanserum und als Negativkontrolle DME-Medium mit 0,1 % Humanserum verwendet. Anschließend wurden 30 000 CSP-Zellen in DME-Medium mit 0,1 % Humanserum auf die Membran gegeben und nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37 °C wurden nicht migrierte Zellen von der Oberseite der Membran entfernt. Migrierte Zellen wurden mittels eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) fixiert und durch Hemacolor® angefärbt. Abschließend wurden die migrierten Zellen (4 repräsentative Fotos/Well) ausgezählt und die Anzahl migrierter Zellen pro Vertiefung berechnet.

Einfluss von PRP auf die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen

Die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen der Passage 3 wurde unter serumfreien Bedingungen in Hochdichte-Pelletkulturen durchgeführt (CSP-Pool aus 3 Spendern, 250 000 Zellen/Pellet). Die Chondrogenese wurde induziert durch die Zugabe von 10 ng/ml TGF-β₃ zum (Grundmedium) DME-Medium, welches 1 % ITS+1, 1 mM Natriumpyruvat,

0,35 mM L-Prolin, 0,17 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat und 0,1 μ M Dexamethason enthält. Um den möglichen Effekt von PRP auf die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen zu beobachten, wurden die Pelletkulturen nur mit 5 % PRP oder in Kombination von 5 % PRP und 10 ng/ml TGF- β 3 in Grundmedium inkubiert. Pelletkulturen, die ausschließlich in Grundmedium kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage bis zum 28. Tag. An den Tagen 7, 14, 21 und 28 erfolgten jeweils Probennahmen für histologische und immunhistochemische Untersuchungen, und an den Tagen 7 und 14 für die Genexpressionsanalysen (je Gruppe 52 Pellets).

Einfluss von PRP auf die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten

Als 3D-Trägermaterial für die Implantatenkultur wurden Polyglycolsäure (PGA)-Implantate verwendet, die zuvor in 10 mm x 10 mm x 1,1 mm große Stücke geschnitten, mit 110 μ l Hyaluronsäure (HA) durchtränkt und für 16 Stunden gefriergetrocknet wurden. Anschließend wurden CSP-Zellen der Passage 3 mit einer Dichte von 2,2 Millionen Zellen pro PGA-HA-Implantat in Fibrinogen resuspendiert, in das Material eingebracht und durch Zugabe von Thrombin mit folgender Polymerisationsreaktion zwischen den Fasern des Materials eingeschlossen. Anschließend wurden die PGA-HA-Implantate in DME-Medium, welches 1 % ITS+1, 1 mM Natriumpyruvat, 0,35 mM L-Prolin, 0,17 mM L-Ascorbinsäure-2-phosphat und 0,1 μ M Dexamethason enthält, kultiviert. Die Chondrogenese wurde durch Zugabe von 10 ng/ml TGF- β 3 oder von 5 % PRP stimuliert, PGA-HA-Implantate ohne Zugabe von TGF- β 3 oder PRP dienten als Kontrolle. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage und bei jedem Mediumwechsel wurden die Implantate gewendet. An den Tagen 14 und 21 erfolgten jeweils Probennahmen für histologische und immunhistochemische Untersuchungen, und an den Tagen 1, 7 und 14 Probennahmen für die Genexpressionsanalysen. Weiterhin erfolgte an den Tagen 7 und 21 jeweils eine Probennahme für die Propidiumiodid/Fluoreszeindiacetat-Färbung (je Gruppe 6 Implantate).

Propidiumiodid/Fluoreszeindiacetat (PI/FDA)-Färbung

Die PI/FDA-Färbung wurde für die PGA-HA-Implantate an den Tagen 7 und 21 für jede Gruppe durchgeführt. Dafür wurden die PGA-HA-Implantate im Dunklen für 15 Minuten bei 37 °C in FDA und anschließend, ebenfalls im Dunklen, für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit PI inkubiert. Abschließend wurden die PI/FDA gefärbten Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotodokumentiert.

Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Von den Proben der CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen und den PGA-HA-Implantaten wurden zu jedem Probenahmezeitpunkt Kryoschnitte hergestellt und proteoglykanreiche Matrix mit Alcianblau 8GX (pH 2,5) Färbelösung mit anschließender Kernechtrot Gegenfärbung angefärbt. Ergänzend wurden gebildete Proteoglykane mit 0,7 % Safranin O und 0,2 % Fast-Green Lösung angefärbt. Der Nachweis von Kollagen Typ II-reicher Matrix erfolgte anhand einer immunhistochemischen Färbung. Dafür wurden die Kryoschnitte mit einem primären anti-human Kollagen Typ II-Antikörper aus Kaninchen inkubiert und anschließend durch Anfärben mittels 3-Amino-9-ethylcabazol sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxylin. Bei den Hochdichte-Pelletkulturen wurde zusätzlich eine Quantifizierung der Alcianblau- und Kollagen Type II-Färbung vorgenommen [22].

Um eine osteogene oder adipogene Differenzierung auszuschließen, wurden die Proben einerseits mit der von Kossa Färbung auf Mineralisation, und andererseits durch die Oil Red O-Färbung auf Lipidvakuolen hin untersucht.

Genexpressionsanalysen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Proben der Hochdichte-Pelletkulturen und der PGA-HA-Implantate in TriReagent lysiert und mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte gemäß Herstellerangaben, mittels des Qiagen-RNeasy-Mini-Kits. Anschließend wurden jeweils 1 µg der gewonnenen RNA mittels iScript-cDNA-Synthese-Kits in cDNA umgeschrieben. Die relative Expression des Haushaltsgenes Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde zur Normalisierung der Proben verwendet. Die PCR wurde jeweils mit 1 µl cDNA pro Probe im i-Cycler PCR System unter Verwendung des SYBR Green PCR-Core-Kit durchgeführt. Die Messung der Zielgene erfolgte in Triplikaten. Abschließend erfolgte die relative Quantifizierung der Genexpressionslevel in Bezug auf das Haushaltsgen GAPDH.

Analyse der Proteinzusammensetzung von PRP mittels membranbasierten Antikörpertest

Die Untersuchung der Proteinzusammensetzung von PRP erfolgte mit einem membranbasierten Protein-Antikörper-Array, welcher gemäß Herstellerangaben durchgeführt wurde. Dafür wurde als erstes der Gesamtproteingehalt der verschiedenen PRP-Proben auf 650 µg eingestellt und äquivalent zu einem Pool vereinigt. Die primären Amine der Proteine wurden dann biotinyliert und auf die Array-Membran gegeben. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte durch Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase, wobei die Signalstärke durch

Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm qualitativ sichtbar gemacht wurde. Die Anwesenheit eines jeden Proteins wurde somit durch einen schwarzen Spot auf dem Röntgenfilm angezeigt und makroskopisch durch zwei voneinander unabhängige Personen bestimmt. Es wurden nur Spots als präsent betrachtet, die durch beide Personen erkannt wurden.

Analyse der Wachstumsfaktoren im PRP mittels membranbasierten Antikörpertests

Der Gehalt an Wachstumsfaktoren und Rezeptoren wurde von jedem PRP-Spender individuell mit einem membranbasierten humanen Wachstumsfaktor-Antikörper-Array durchgeführt. Dafür wurden als erstes 650 µg Totalprotein eines jeden PRP-Spenders auf jeweils eine Array-Membran gegeben, welche anschließend mit Biotin-konjugierten Antikörpern gegen die jeweiligen Wachstumsfaktoren inkubiert wurde. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte durch Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase, wobei die Signalstärke durch Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde. Die Auswertung erfolgte auf Grundlage der densitometrischen Spot-Intensität [22].

Enzymatisches Immunsorptions-Nachweisverfahren (ELISA) zur Quantifizierung ausgewählter Wachstumsfaktoren im PRP

Zur Quantifizierung der Konzentrationen von BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), CTGF (Connective Tissue Growth Factor) und TGF-β3 (Transforming Growth Factor-β3) wurde für jede PRP-Spenderprobe gemäß Herstellerangaben ein Sandwich ELISA durchgeführt. Die Bestimmung der einzelnen Proben erfolgte in Triplikaten und die Proteinkonzentration wurde anhand eines mitgeführten Standards berechnet.

Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur Bestimmung der signifikanten Unterschiede wurden die Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test analysiert. Anschließend folgte entweder ein parametrischer t-Test oder ein nichtparametrischer Mann-Whitney U-Test. Ein signifikanter Unterschied wurde als erwiesen betrachtet bei einem p-Wert von $\leq 0,05$.

Ergebnisse

Charakterisierung der Oberflächenantigene von CSP-Zellen

Die CSP-Zellen zeigten sich einheitlich positiv für die Oberflächenantigene CD73 (99,9-100 %), CD90 (99,8-99,9 %), CD105 (94,1-99,6 %) und CD166 (98,6-99,8 %). Im Gegensatz dazu wurden die Oberflächenantigene CD34 (0,0-0,1 %) und CD45 (0,0-0,1 %) nicht detektiert.

Chemotaktische Aktivität von PRP auf CSP-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl an migrierten Zellen in der Positivkontrolle signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht ist gegenüber der Zellzahl in der Negativkontrolle. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein PRP Gehalt von 0,1 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 % und 100 % die Zahl an migrierten Zellen sowohl gegenüber der Positivkontrolle als auch der Negativkontrolle signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhen. Die höchste Zahl gewanderter Zellen zeigte sich bei einem PRP Gehalt von 5 %.

Nachweis der chondrogenen Differenzierung von CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen anhand einer Proteoglykan- und Kollagen Typ II Färbung

Zur Darstellung der gebildeten Proteoglykane und Kollagen Typ II wurden Kryoschnitte von Hochdichte-Pelletkulturen mittels Alcianblau Färbung und Kollagen Typ II-Färbung angefärbt. Dabei zeigte sich, dass Pelletkulturen, welche mit PRP, TGF- β 3 oder in Kombination von PRP und TGF- β 3 kultiviert wurden, über den Kultivierungszeitraum ein Zellpellet entwickelten, welches sowohl reich an Zellen als auch an Proteoglykanen und Kollagen Typ II war. Pelletkulturen, die weder mit PRP noch TGF- β 3 kultiviert wurden, entwickelten hingegen ein kleines, fibröses Zellpellet in dem kein Kollagen Typ II nachweisbar war. Allerdings konnte eine schwache Anfärbung von Proteoglykanen in den nicht induzierten Pelletkulturen beobachtet werden.

Die Quantifizierung der Alcianblau- und Kollagen Typ II-Färbung ergab, dass CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen, welche mit PRP, TGF- β 3 oder in Kombination von PRP und TGF- β 3 kultiviert wurden, eine signifikante ($p \leq 0,05$) Zunahme an Proteoglykanen und Kollagen Typ II gegenüber den nicht stimulierten Pelletkulturen an den jeweiligen Tagen 7, 14 und 28 zeigten.

Genexpressionsanalyse von ausgewählten chondrogenen Markergenen in CSP-Zellen kultiviert in Hochdichte-Pelletkulturen

Die Genexpressionsanalyse zeigte an Tag 14 gegenüber Tag 7 bei CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen, welche ausschließlich mit PRP kultiviert wurden, eine Induktion der chondrogenen Markergene Aggrekan (8 % relative Expression im Verhältnis zu GAPDH an Tag 7 zu 65 % relative Expression im Verhältnis zu GAPDH an Tag 14), Kollagen Typ II (1 % an Tag 7 zu 835 % an Tag 14) und COMP (Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein) (4 % an Tag 7 zu 14 % an Tag 14). In Pelletkulturen, welche mit TGF- β 3 oder mit PRP und TGF- β 3 kultiviert wurden, konnte ebenfalls eine Induktion von Aggrekan (8 % an Tag 7 zu 138 % an Tag 14), Kollagen Typ II (1 % an Tag 7 zu 915 % an Tag 14) und COMP (4 % an Tag 7 zu 90 % an Tag 14) beobachtet werden. Das Expressionsniveau von Kollagen Typ X lag an Tag 14 in Pelletkulturen, welche mit TGF- β 3 stimuliert wurden bei 13 371 % (5 435 % an Tag 7 zu 13 371 % an Tag 14). Hingegen lag das Expressionsniveau an Tag 14 bei Pelletkulturen, die mit TGF- β 3 und PRP stimuliert wurden nur bei 4 103 % (3 328 % an Tag 7 zu 4 103 % an Tag 14) und bei Kulturen, die ausschließlich mit PRP stimuliert wurden, nur noch bei 853 % (3 147 % an Tag 7 zu 853 % an Tag 14). Nicht stimulierte Hochdichte-Pelletkulturen hatten ein Expressionsniveau von 80 % (226 % an Tag 7 zu 80 % an Tag 14) für Kollagen Typ X an Tag 14.

Ausschluss einer osteogenen oder adipogenen Differenzierung von CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen

An Tag 28 zeigten CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen, die mit TGF- β 3, PRP oder der Kombination aus PRP und TGF- β 3 kultiviert wurden, in der von Kossa Färbung keine kalzifizierte Matrix. Auch die Genexpression von Osteocalcin war schwach in den drei Gruppen, verglichen mit nicht stimulierten Pelletkulturen. Ebenfalls konnten keine Lipidvakuolen in den verschiedenen Hochdichte-Pelletkulturen von CSP-Zellen durch die Oil Red O-Färbung nachgewiesen werden. Die Genexpression von FABP-4 (Fatty Acid Binding Protein-4) zeigte eine schwächere Expression in Pelletkulturen, die mit TGF- β 3, PRP oder PRP und TGF- β 3 kultiviert worden waren, gegenüber den nicht stimulierten CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen.

Bestimmung der Vitalität von CSP-Zellen im PGA-HA-Implantaten

Sowohl in den nicht stimulierten PGA-HA-Implantatenkulturen als auch in den PGA-HA-Implantatenkulturen, die mit TGF- β 3 oder PRP stimuliert wurden, konnten über den gesamten

Kultivierungszeitraum von 21 Tagen vitale Zellen beobachtet werden, die homogen im Trägermaterial verteilt waren. Tote Zellen konnten nicht detektiert werden.

Nachweis der chondrogenen Differenzierung von CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten anhand einer Proteoglykan- und Kollagen Typ II Färbung

Zur Beurteilung der gebildeten Proteoglykane wurden die PGA-HA-Implantate sowohl mit Alcianblau als auch mit Safranin O/Fast-Green angefärbt. Dabei zeigte sich nach beiden Färbungen, dass in nicht stimulierten CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten an den Tagen 14 und 21 keine Proteoglykane nachzuweisen waren. Dementgegen konnte eine Proteoglykan-Synthese bei CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten, die mit PRP oder TGF- β 3 kultiviert wurden, nachgewiesen werden. Diese war jedoch in CSP-Zellen, die mit TGF- β 3 stimuliert wurden, stärker. In der Kollagen Typ II-Färbung konnte in nicht stimulierten CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten kein Kollagen Typ II sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 angefärbt werden. Hingegen konnte Kollagen Typ II bei CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten die mit PRP oder TGF- β 3 kultiviert wurden, an Tag 14 und 21 nachgewiesen werden.

Genexpressionsanalyse von ausgewählten chondrogenen Markergenen in CSP-Zellen kultiviert in PGA-HA-Implantaten

CSP-Zellen, die in PGA-HA-Implantaten unter Zugabe von PRP stimuliert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte ($p \leq 0,05$) Expression der chondrogenen Markergene Aggrekan, COMP und Kollagen Typ II gegenüber den nicht induzierten PGA-HA-Implantaten an Tag 7 und 14. Dabei wurde Aggrekan während der gesamten Zeit stabil (1,1 % relative Expression im Verhältnis zu GAPDH) exprimiert. Hingegen konnte bei den Genen COMP (2,7 % an Tag 0 zu 5,4 % an Tag 14) und Kollagen Typ II (0,03 % an Tag 0 zu 7,1 % an Tag 14) eine Induktion beobachtet werden. Bei CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten, die mit TGF- β 3 kultiviert wurden, konnte eine signifikant erhöhte Genexpression der chondrogenen Markergene Aggrekan, COMP und Kollagen Typ II gegenüber den nicht stimulierten und PRP stimulierten CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten an Tag 7 und 14 nachgewiesen werden. Dabei war eine Zunahme der Expression bei den Genen Aggrekan (0,8 % an Tag 0 zu 13,7 % an Tag 14), COMP (2,7 % an Tag 0 zu 44,5 % an Tag 14) und Kollagen Typ II (0,03 % an Tag 0 zu 192 % an Tag 14) von Tag 0 zu Tag 14 erkennbar. Das Expressionsniveau von Kollagen Typ X nahm bei CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten, welche mit PRP stimuliert wurden, von Tag 0 (0,3 %) zu Tag 7 (8,8 %) zu und dann zu Tag 14 (2,4 %) wieder ab. Bei CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten, die mit

TGF- β 3 kultiviert wurden, nahm hingegen das Expressionsniveau von Kollagen Typ X von Tag 0 (0,4 %) zu Tag 7 (100 %) und zu Tag 14 (287 %) stetig zu.

Ausschluss einer osteogenen oder adipogenen Differenzierung von CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten

An Tag 21 zeigten CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten, die mit TGF- β 3 oder PRP kultiviert worden waren, in der von Kossa Färbung keine kalzifizierte Matrix, auch die Genexpression von Osteocalcin war schwach. Ebenfalls konnten keine Lipidvakuolen in der Oil Red O-Färbung, sowohl bei TGF- β 3 oder PRP stimulierten CSP-Zellen, in PGA-HA-Implantaten identifiziert werden. Die Genexpression von FABP-4 zeigte eine schwächere Expression bei CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten, welche mit TGF- β 3 oder PRP kultiviert worden waren, gegenüber nicht stimulierten CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten.

Charakterisierung der Proteinzusammensetzung im PRP mittels membranbasiertem Antikörper-Test

Von 507 detektierbaren Proteinen wurden 417 im PRP-Pool nachgewiesen. Diese ließen sich in 35 Intrazellulärproteine, 44 Transmembranproteine, 108 Rezeptorproteine, 69 Extrazellulärproteine, 36 Interleukine, 16 Metalloproteasen und deren Inhibitoren (TIMP), 33 Chemokine sowie 76 Wachstumsfaktoren aufteilen. Es wurden dabei die Wachstumsfaktoren BMP-2, BMP-4, BMP-7, CTGF, FGF-2, FGF-18, GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5), TGF- β 2 und TGF- β 3 identifiziert, welche durch die Literatur mit der Redifferenzierung von Chondrozyten oder der Chondrogenese von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen assoziiert sind.

Analyse von Wachstumsfaktoren im PRP mittels membranbasierte Antikörper-Tests

Zur Analyse von konstant enthaltenen Wachstumsfaktoren in PRP wurde PRP von sechs Einzel-PRP-Spendern mittels eines Antikörper-Membran-Tests untersucht. Dabei wurden die höchsten Spot-Intensitäten für die Wachstumsfaktoren EGF (119,2-152,7 % relative Spot-Intensität im Verhältnis zur Positivkontrolle), PDGF-AA (52,9-72,8 %), PDGF-AB (92,3-140,4 %) und PDGF-BB (97,0-142,4 %) bestimmt. Unterschiede in der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren zwischen den einzelnen PRP-Spendern wurde bei HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) (in 2 von 6 Spendern, 0,0-5,4 %), NT-3 (Neurotrophin-3) (in 4 von 6 Spendern, 0,0-4,2 %), NT-4 (in 4 von 6 Spendern, 0,0-5,7 %), TGF- α (in 1 von 6 Spendern, 0,0-13,8 %), TGF- β 1 (in 3 von 6 Spendern, 0,0-3,8 %) und TGF- β 2 (in 5 von 6 Spendern, 0,0-4,3 %) entdeckt. In allen sechs Einzel-PRP-Spenderproben

wurden die Chondrogenese assoziierten Wachstumsfaktoren FGF-2 (1,8-22,0 %), IGF-I (1,8-9,2 %) und TGF- β 3 (1,9-6,5 %) nachgewiesen.

Quantifizierung von Wachstumsfaktoren mittels ELISA

Die Quantifizierung der Wachstumsfaktoren BMP-2, CTGF, FGF-2 und TGF- β 3 erfolgte mittels Sandwich-ELISA, dabei wurde BMP-2 in einer Konzentration von 0,00 bis 0,65 ng/ml, CTGF in einer Konzentration von 0,00 bis 0,83 ng/ml, FGF-2 in einer Konzentration von 0,40 bis 0,81 ng/ml und TGF- β 3 in einer Konzentration von 0,39 bis 0,76 ng/ml in den sechs Einzel-PRP-Spenderproben detektiert.

Diskussion

Die Effektivität von plättchenreichen Plasma (PRP) in der klinischen Anwendungen, im besonderen bei orthopädischen Therapiemethoden wie der Knorpelregeneration, wird derzeit sehr kontrovers diskutiert. Einerseits konnte in einer gut dokumentierten Fallserie an Patienten gezeigt werden, dass PRP in Kombination mit einem Polyglykolsäure-Hyaluronsäure (PGA-HA)-Implantat und einer Knochenmarks-Stimulationstechnik (wie zum Beispiel der Mikrofrakturierung) bei 52 Patienten mit einem fokalen chondralen Defekt zu einer signifikanten Verbesserung der Konstitution und zur Bildung eines hyalinen Ersatzgewebe im Defekt führt [12]. Andererseits zeigte eine Pilotstudie, dass PRP in Gelform, kombiniert mit einer Kollagen Typ I/Typ III Membran und einer Mikrofrakturierung, bei 5 Patienten mit einem patellaren fokalen chondralen Defekt zu einer unvollständigen Defektfüllung führte und sogar bei 3 Patienten eine Osteophytenbildung zu beobachten war [23]. Prinzipiell fehlen jedoch aussagekräftige Daten bezüglich der Effektivität und dem unterliegenden biologischen Mechanismus von PRP. Aufgrund der hohen Variabilität in der Zusammensetzung, Aktivierung, Applikation und Präparation von PRP und der damit einhergehenden An- und Abwesenheit spezifischer Wachstumsfaktoren, kann die Effektivität sehr unterschiedlich ausfallen [24]. Ein wesentlicher biologischer Faktor für diese Variabilität ist sicherlich das Geschlecht des Spenders und die Plättchenkonzentration [21], jedoch hat auch die Art der Aufarbeitung einen Einfluss auf die Zusammensetzung und den Gehalt der verschiedenen Wachstumsfaktoren im PRP. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Anzahl der Zentrifugationsschritte, die Zentrifugationsgeschwindigkeit und die Zentrifugationszeit einen maßgeblichen Einfluss auf die Zusammensetzung des PRP haben [24]. So wurde in PRP, welches durch Zentrifugation gewonnen und mittels Kalzium aktiviert wurde, neben anti- und proinflammatorischen

Zytokinen, auch die Wachstumsfaktoren, PDGF, IGF-1, FGF-2, TGF- β 1 und TGF- β 2 in verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen. Diese Resultate konnten in dieser Studie bestätigt werden. Jedoch konnte weder TGF- β 3 noch VEGF im PRP, welches durch Zentrifugation hergestellt wurde, detektiert werden [25]. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TGF- β 3 und VEGF in PRP, welches mittels Aphärese gewonnen und durch Einfrieren und Auftauen aktiviert wurde, enthalten ist. Dies sind nur einige Beispiele dafür, dass es schwierig ist, Aussagen bezüglich der Wirkungsweise von PRP auf die Knorpelregeneration zu treffen. Der Fokus in vorliegender Studie lag darauf, zu klären, welchen Einfluss PRP sowohl auf die Migration von humanen kortikospongiösen Vorläuferzellen (CSP-Zellen), als auch auf die TGF- β 3 vermittelte Chondrogenese von CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen hat. Außerdem sollte der Einfluss von PRP auf CSP-Zellen in PGA-HA-Implantaten untersucht werden. Zusätzlich sollte bestimmt werden, welche freigesetzten bioaktiven Wachstumsfaktoren im PRP möglicherweise mit der Chondrogenese von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen assoziiert sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass PRP die Migration von CSP-Zellen stimuliert. Ursächlich hierfür könnte neben vielen anderen Faktoren sein, dass im PRP die Wachstumsfaktoren PDGF-BB, IGF-1 und IGF-2, welche in allen untersuchten Einzel-PRP-Spenderproben enthalten waren, diese Migration ausgelöst haben. Es ist bekannt, dass PDGF-BB, IGF-1 und IGF-2 humane mesenchymale Vorläuferzellen, die aus Knochenmark gewonnen wurden, zur Migration anregen [9, 26]. Jedoch wäre es genauso denkbar, dass andere Wachstumsfaktoren und/oder Chemokine sowohl voneinander unabhängige als auch synergistische Effekte auf das Migrationsverhalten von CSP-Zellen haben. Weiterhin konnte ein stimulierender Effekt von PRP auf die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen und in PGA-HA-Implantaten sowohl auf Genexpressions- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. In beiden Kultursystemen induzierte 5 % PRP die Expression der typischen chondrogenen Markergene. Auch die Bildung von Proteoglykan- und Kollagen Typ II-reicher Matrix war in beiden Kultursystemen, die mit PRP stimuliert wurden, zu beobachten. Interessanterweise konnte sowohl bei CSP-Zellen in Hochdichte-Pelletkulturen als auch bei PGA-HA-Implantaten, die ausschließlich mit 5 % PRP stimuliert wurden, eine schwächere Expression des hypertrophen Markergenes Kollagen Typ X gegenüber CSP-Zellen, die mit 10 ng/ml TGF- β 3 stimuliert wurden, beobachtet werden. Es ist bekannt, dass BMP-2, BMP-4 und BMP-6 in Kombination mit TGF- β 3 die Expression von Kollagen Typ X in humanen mesenchymalen Vorläuferzellen inhibiert [27]. Möglicherweise ist diese Kombination im PRP, welches nachweislich BMP-2, BMP-4 und BMP-6 enthält, für diesen Effekt verantwortlich.

Nimmt man diesen chondrogenen stimulierenden Effekt von PRP auf CSP-Zellen in Bezug auf die im membranbasierten Antikörper-Array gefundenen verschiedenen Wachstumsfaktoren, scheint es fast unmöglich, dass TGF- β 3 allein dafür verantwortlich ist. Vielmehr ist zu vermuten, dass verschiedene bioaktive Faktoren im PRP sowohl synergetische als auch antagonistische Effekte in Verbindung mit der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen haben. Vorhergehende Untersuchungen zum Einfluss von einzelnen Wachstumsfaktoren auf die chondrogene Entwicklung von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen *in vivo* oder *in vitro* zeigten, dass auch BMP-2, BMP-4, BMP-7, CTGF, FGF-2, GDF-5, IGF-1 und TGF- β 2 in der Lage sind, diese in die chondrogene Richtung zu stimulieren [28-34]. Hingegen wurden nur einige wenige Wachstumsfaktoren, die im membranbasierten Antikörper-Array im PRP gefunden wurden, je in Kombinationen auf die chondrogene Induktion von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen getestet. Darunter fällt zum Beispiel IGF-1, welches in Kombination mit TGF- β 1 oder BMP-2 oder BMP-7 zu einer verstärkt chondrogenen Matrixbildung von mesenchymalen Stammzellen führt [35]. Ebenso induziert eine Kombination von BMP-2, BMP-4, BMP-7 oder FGF-2 mit TGF- β 1 eine chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* [36]. Jedoch wird der Einfluss von PRP auf mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen sehr kontrovers diskutiert. So induziert PRP zum einen die Proliferation von mesenchymalen Vorläuferzellen, aber induziert nicht die chondrogene Differenzierung dieser Zellen [37]. Zum anderen konnte hier gezeigt werden, dass PRP die chondrogene, aber nicht die adipogene oder osteogene Differenzierung von CSP-Zellen, sowohl in Hochdichte-Pelletkulturen als auch in PGA-HA-Implantaten induziert. Diese widersprüchlichen Aussagen sind wahrscheinlich dadurch begründet, dass es sehr viele verschiedene Techniken zur Gewinnung und Aktivierung von PRP gibt, welches wiederum zu sehr unterschiedlicher Zusammensetzung und Gehalt an bioaktiven Faktoren führt [38]. Aufgrund dieser Problematik sollten in weiterführenden Versuchen der Einfluss von verschiedenen PRP-Präparationen, zum Beispiel hergestellt durch Zentrifugation oder durch unterschiedliche PRP-Isolations-Kits, auf die chondrogene Differenzierung von CSP-Zellen untersucht werden. Außerdem sind weitere kontrollierte klinische Studien zur Anwendung von PRP in Kombination mit der Mikrofrakturierung und 3D-Trägermaterialien notwendig, um eine gesicherte Aussage bezüglich der Effektivität von PRP auf die Knorpelheilung treffen zu können.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass PRP sowohl die Migration von CSP-Zellen als auch die Chondrogenese von CSP-Zellen sowohl in Hochdichte-Pelletkulturen als auch in PGA-HA-Implantaten stimuliert. Somit könnte PRP ein wirkungsvolles Mittel für die lokale Applikation von chondrogenen Wachstumsfaktoren sein, welche dann im Defekt die

Knorpelheilung durch Stimulation der Zellmigration und -differenzierung und damit die Bildung von neuer Knorpelmatrix unterstützt.

Literaturverzeichnis

1. Tuan, R.S., Chen, A.F., and Klatt, B.A., Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*, 2013. 21(5): p. 303-11.
2. Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Briggs, K.K., and Rodrigo, J.J., [the microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade*, 1999. 28(1): p. 26-32.
3. Steadman, J.R., Briggs, K.K., Rodrigo, J.J., Kocher, M.S., Gill, T.J., and Rodkey, W.G., Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, 2003. 19(5): p. 477-84.
4. Endres, M., Neumann, K., Zhou, B., Freymann, U., Pretzel, D., Stoffel, M., Kinne, R.W., and Kaps, C., An ovine in vitro model for chondrocyte-based scaffold-assisted cartilage grafts. *J Orthop Surg Res*, 2012. 7: p. 37.
5. Pillai, C.K. and Sharma, C.P., Review paper: Absorbable polymeric surgical sutures: Chemistry, production, properties, biodegradability, and performance. *J Biomater Appl*, 2010. 25(4): p. 291-366.
6. Erggelet, C., Endres, M., Neumann, K., Morawietz, L., Ringe, J., Haberstroh, K., Sittinger, M., and Kaps, C., Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res.*, 2009. 27(10): p. 1353-1360.
7. Patrascu, J.M., Freymann, U., Kaps, C., and Poenaru, D.V., Repair of a post-traumatic cartilage defect with a cell-free polymer-based cartilage implant: A follow-up at two years by mri and histological review. *J Bone Joint Surg Br*, 2010. 92(8): p. 1160-3.
8. Krüger, J.P., Endres, M., Neumann, K., Haupl, T., Erggelet, C., and Kaps, C., Chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells is impaired by rheumatoid arthritis synovial fluid. *J Orthop Res*, 2010. 28(6): p. 819-27.
9. Fiedler, J., Brill, C., Blum, W.F., and Brenner, R.E., Igf-i and igf-ii stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 345(3): p. 1177-83.
10. van der Meer, P.F., Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis? *Transfus Apher Sci*, 2013. 48(2): p. 129-31.

11. Redler, L.H., Thompson, S.A., Hsu, S.H., Ahmad, C.S., and Levine, W.N., Platelet-rich plasma therapy: A systematic literature review and evidence for clinical use. *Phys Sportsmed*, 2011. 39(1): p. 42-51.
12. Siclari, A., Mascaro, G., Gentili, C., Kaps, C., Cancedda, R., and Boux, E., Cartilage repair in the knee with subchondral drilling augmented with a platelet-rich plasma-immersed polymer-based implant. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2013.
13. Gudas, R., Kalesinskas, R.J., Kimtys, V., Stankevicius, E., Toliusis, V., Bernotavicius, G., and Smailys, A., A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy*, 2005. 21(9): p. 1066-75.
14. Marx, R.E., Platelet-rich plasma (prp): What is prp and what is not prp? *Implant Dent*, 2001. 10(4): p. 225-8.
15. Nikolidakis, D. and Jansen, J.A., The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: Literature review. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008. 14(3): p. 249-58.
16. Langer, H.F. and Gawaz, M., Platelets in regenerative medicine. *Basic Research in Cardiology*, 2008. 103(4): p. 299-307.
17. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., and Nurden, A.T., Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 2004. 91(1): p. 4-15.
18. Stewart, A.A., Byron, C.R., Pondenis, H., and Stewart, M.C., Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis. *Am J Vet Res*, 2007. 68(9): p. 941-5.
19. Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., and Murphy, J.M., Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*, 2001. 268(2): p. 189-200.
20. Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton, W.A., Moses, H.L., and Spagnoli, A., Effect of igf-i in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of tgf-beta signaling. *J Bone Miner Res*, 2006. 21(4): p. 626-36.
21. Weibrich, G., Kleis, W.K., Hafner, G., and Hitzler, W.E., Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*, 2002. 30(2): p. 97-102.

22. Kaps, C., Bramlage, C., Smolian, H., Haisch, A., Ungethum, U., Burmester, G.R., Sittinger, M., Gross, G., and Haupl, T., Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(1): p. 149-62.
23. Dhollander, A.A., De Neve, F., Almqvist, K.F., Verdonk, R., Lambrecht, S., Elewaut, D., Verbruggen, G., and Verdonk, P.C., Autologous matrix-induced chondrogenesis combined with platelet-rich plasma gel: Technical description and a five pilot patients report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011. 19(4): p. 536-42.
24. Kon, E., Filardo, G., Matteo, B.D., and Marcacci, M., Prp for the treatment of cartilage pathology. *Open Orthop J*, 2013. 7: p. 120-8.
25. Amable, P.R., Carias, R.B., Teixeira, M.V., da Cruz Pacheco, I., Correa do Amaral, R.J., Granjeiro, J.M., and Borojevic, R., Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*, 2013. 4(3): p. 67.
26. Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K.P., and Brenner, R.E., Bmp-2, bmp-4, and pdgf-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*, 2002. 87(3): p. 305-12.
27. Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L., and Prockop, D.J., Comparison of effect of bmp-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res*, 2005. 320(2): p. 269-76.
28. Schmitt, B., Ringe, J., Haupl, T., Notter, M., Manz, R., Burmester, G.R., Sittinger, M., and Kaps, C., Bmp2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation*, 2003. 71(9-10): p. 567-77.
29. Steinert, A., Weber, M., Dimmler, A., Julius, C., Schutze, N., Noth, U., Cramer, H., Eulert, J., Zimmermann, U., and Hendrich, C., Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res*, 2003. 21(6): p. 1090-7.
30. Shen, B., Wei, A., Whittaker, S., Williams, L.A., Tao, H., Ma, D.D., and Diwan, A.D., The role of bmp-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *J Cell Biochem*, 2010. 109(2): p. 406-16.
31. Arnott, J.A., Lambi, A.G., Mundy, C., Hendsi, H., Pixley, R.A., Owen, T.A., Safadi, F.F., and Popoff, S.N., The role of connective tissue growth factor (ctgf/ccn2) in skeletogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2011. 21(1): p. 43-69.

32. Ellman, M.B., An, H.S., Muddasani, P., and Im, H.J., Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis. *Gene*, 2008. 420(1): p. 82-9.
33. Zhang, B., Yang, S., Sun, Z., Zhang, Y., Xia, T., Xu, W., and Ye, S., Human mesenchymal stem cells induced by growth differentiation factor 5: An improved self-assembly tissue engineering method for cartilage repair. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011. 17(12): p. 1189-99.
34. Van Osch, G.J., Van Der Veen, S.W., Burger, E.H., and Verwoerd-Verhoef, H.L., Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium. *Tissue Eng*, 2000. 6(4): p. 321-30.
35. Danisovic, L., Varga, I., and Polak, S., Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*, 2012. 44(2): p. 69-73.
36. Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E., and Richter, W., Impact of growth factors and pthrp on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*, 2010. 223(1): p. 84-93.
37. Drengk, A., Zapf, A., Sturmer, E.K., Sturmer, K.M., and Frosch, K.H., Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 2009. 189(5): p. 317-26. Epub 2008 Aug 11.
38. Alsousou, J., Thompson, M., Hulley, P., Noble, A., and Willett, K., The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: A review of the literature. *J Bone Joint Surg Br*, 2009. 91(8): p. 987-96.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Philipp Krüger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung der bioaktiven Eigenschaften von plättchenreichem Plasma für die Anwendung in der in situ Knorpelregeneration selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

11. März 2014

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Jan Philipp Krüger hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: JP Krüger, S Hondke, M Endres, A Pruss, A Siclari, C Kaps,
Human Platelet-Rich Plasma Stimulates Migration and Chondrogenic
Differentiation of Human Subchondral Progenitor Cells,
Journal of Orthopaedic Research, 2012

Beitrag im Einzelnen: Erhebung, Auswertung und Interpretation der Daten, sowie
Anfertigung des Artikels.

Publikation 2: JP Krüger, AK Ketzmar, M Endres, A Pruss, A Siclari, C Kaps,
Human Platelet-Rich Plasma Induces Chondrogenic Differentiation of
Subchondral Progenitor Cells in Polyglycolic Acid-Hyaluronan Scaffolds,
Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, 2013

Beitrag im Einzelnen: Erhebung, Auswertung und Interpretation der Daten, sowie
Anfertigung des Artikels.

Publikation 3: JP Krüger, U Freymann, S Vetterlein, K Neumann, M Endres, C Kaps,
Bioactive Factors in Platelet-Rich Plasma Obtained by Apheresis,
Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2013

Beitrag im Einzelnen: Erhebung, Auswertung und Interpretation der Daten, sowie
Anfertigung des Artikels.

Unterschrift des Doktoranden

Publikation 1

"Human Platelet-Rich Plasma Stimulates Migration and Chondrogenic Differentiation of Human Subchondral Progenitor Cells"

JP Krüger, S Hondke, M Endres, A Pruss, A Siclari, C Kaps

Journal of Orthopaedic Research, Volume 30, Issue 6, Pages 845-852, June 2012

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.22005/abstract>

Publikation 2

"Human Platelet-Rich Plasma Induces Chondrogenic Differentiation of Subchondral Progenitor Cells in Polyglycolic Acid-Hyaluronan Scaffolds"

JP Krüger, AK Ketzmar, M Endres, A Pruss, A Siclari, C Kaps

Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, Volume 4, Issue 4, Pages 681-692, May 2013

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.33047/abstract>

Publikation 3

"Bioactive Factors in Platelet-Rich Plasma Obtained by Apheresis"

JP Krüger, U Freymann, S Vetterlein, K Neumann, M Endres, C Kaps

Transfusion Medicine and Hemotherapy, Volume 40, Pages 432-440, October 2013

<http://www.karger.com/Article/FullText/356329>

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Publikationsliste

Erstautorenschaft

JP Krüger, M Endres, K Neumann, T Häupl, C Erggelet, C Kaps

"Chondrogenic Differentiation of Human Subchondral Progenitor Cells is Impaired by Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid"

Journal of Orthopaedic Research, **2010**

JP Krüger, M Endres, K Neumann, B Stuhlmüller, L Morawietz, T Häupl, C Kaps

"Chondrogenic Differentiation of Human Subchondral Progenitor Cells is affected by Synovial Fluid from Donors with Osteoarthritis or Rheumatoid Arthritis"

Journal of Orthopaedic Surgery and Research, **2012**

JP Krüger, S Hondke, M Endres, A Pruß, A Siclari, C Kaps

"Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells"

Journal of Orthopaedic Research, **2012**

J Patrascu*, JP Krüger*, H Böss, AK Ketzmar, U Freymann, M Sittinger, M Notter, M Endres, C Kaps (*contributed equally to this work)

"Polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells show chondrogenic differentiation in vitro and cartilage repair in the rabbit model"

Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, **2013**

JP Krüger, AK Ketzmar, M Endres, A Pruss, A Siclari, C Kaps

"Human Platelet-Rich Plasma Induces Chondrogenic differentiation of Subchondral Progenitor Cells in Polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds"

Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, **2013**

JP Krüger, U Freymann, S Vetterlein, K Neumann, M Endres, C Kaps

"Bioactive Factors in Platelet-Rich Plasma Obtained by Apheresis"

Transfusions Medicine and Hemotherapy, **2013**

Koautorenschaft

M Trimmborn, M Endres, C Bommer, U Janke, JP Krüger, L Morawietz, P Kreutz, C Kaps

"Karyotyping of human chondrocytes in scaffold-assisted cartilage tissue engineering"

Acta Biomaterialia, **2012**

C Woiciechowsky, A Abbushi, M Zenclussen, P Casalis, U Freymann, JP Krüger, M Endres, C Kaps

"Regeneration of nucleus pulposus tissue in an ovine intervertebral disc degeneration model by cell-free polymer scaffolds"

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, **2012**

T Dehne, R Zehbe, JP Krüger, M Sittinger, H Schubert, J Ringe

"A method to screen and evaluate tissue adhesives for joint repair applications."

BMC Musculoskeletal Disorders, **2012**

R Kulawig, JP Krüger, O Klein, Z Konthur, H Schütte, J Klose, C Kaps, M Endres

"Identification of Fibronectin as a Major Factor in Human Serum to Recruit Subchondral Mesenchymal Progenitor Cells"

The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, **2013**

P Kreuz, C Gentili, B Samans, D Martinelli, JP Krüger, W Mittelmeier, M Endres, R Cancedda, C Kaps

"Scaffold Assisted Cartilage Tissue Engineering using Infant Chondrocytes from Human Hip Cartilage"

Osteoarthritis and Cartilage, **2013**

M Endres, M Zenclussen, P Casalis, U Freymann, S Garcia, JP Krüger, U Thomale, C Woiciechowsky, C Kaps

"Augmentation and Repair Tissue Formation of the Nucleus Pulposus in the Lumbar Spine after Partial Nucleotomy in a Rabbit Model"

Connective Tissue Research (**submitted, under revision**)

T Dehne, X Adam, EM Materne, M Reimann, JP Krüger, S van Linthout, C Tschöpe,
M Haag, M Sittinger, J Ringe

"A P19 and P19CL6 Cell-Based Complementary Approach to Determine Paracrine
Effects in Cardiac Tissue"

Cells Tissues Organs, **(submitted)**

A Hegewald, J Cluzel, JP Krüger, M Endres, C Kaps, C Thomé

"Effects of Initial Boost with TGF- β 1 and Grade of Intervertebral Disc Degeneration on
3D Culture of Human Annulus Fibrosus Cells"

BMC Musculoskeletal Disorders, **(submitted)**

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Sittinger möchte ich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. Christian Kaps danke ich besonders für die Möglichkeit mein Promotionsvorhaben bei der Firma TransTissue Technologies GmbH durchführen zu können. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens diverser Veröffentlichungen und meiner Doktorarbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen beiden Kollegen Dr. Michaela Endres und Dipl. Ing. Tilo Dehne für Ihre unermüdlige Diskussionsbereitschaft und Ihren unermesslichen Beistand bedanken, Sie haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Firma TransTissue Technologies GmbH und der Arbeitsgruppe Tissue Engineering der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne Ihre Hilfe nicht möglich gewesen.

Mein Dank geht ebenso an die Gutachter der Doktorarbeit, sowie den Mitgliedern der Verwaltung des Fachbereichs.

Allen meinen lieben Familienangehörigen und Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und vor allem Geduld, die sie mir stets entgegenbrachten.