

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Mund- Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Schubert)

und
dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Neumann)

Die Eigenblutfüllung von Knochenhöhlräumen nach SCHULTE - neue Erkenntnisse

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christine Linß

geboren am 01.08.1969 in Ilmenau

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. P. Presek

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. P. Presek
Univ.-Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau
Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Hoffmeister

Verteidigungsdatum: 31.01.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011415

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011415>]

Meiner Familie

Referat und bibliographische Beschreibung

Das „Schulte-Koagulum“, die in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eingeführte Eigenblutfüllung enoraler Knochenhöhlräume, hat sich bis heute in der klinischen Anwendung bewährt. Im Lichte neuerer Erkenntnisse besonders zur Knochenregeneration und zur Thrombinwirkung auf Blutplättchen soll dieses Verfahren eine wissenschaftliche Reevaluierung erfahren, um es den gegenwärtigen Knochenersatzverfahren als einfache, nebenwirkungsarme und nicht zuletzt kostengünstige, biologisch optimale Alternative gegenüberzustellen.

Anhand eines Zellkulturmodells mit osteoblastenartigen Mäusezellen (MC3T3-E1) wurden der Einfluss der einzelnen im „Schulte-Koagulum“ enthaltenen Bestandteile auf die Zellproliferation und deren Zusammenwirken untersucht. Das Eigenblutkoagulum beinhaltet unter anderem Thrombin, das als einer der stärksten physiologischen Thrombozytenstimulatoren bekannt ist. Um den mitogenen Einfluss aktivierter Thrombozyten im Zellkulturmodell untersuchen zu können, wurden menschliche Blutplättchen durch zwei verschiedene Präparationstechniken isoliert.

Die Untersuchungen erbrachten, dass Thrombin die Proliferation von MC3T3-E1-Zellen konzentrationsabhängig mit einer maximalen Steigerung auf das Dreifache der Kontrolle bei 10 U/ml stimuliert. Penizillin G als dem „Schulte-Koagulum“ zugesetzte antimikrobielle Substanz hemmt allein bei Konzentrationen von 10.000 E/ml und mehr die Proliferation; dieser Effekt ist teilweise durch Thrombin kompensierbar. Der denaturierte Gelatineschwamm hat keinen Einfluss; mit Vollblutgerinnsel erhöht er die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen nach 30 Minuten. Das thrombinstimulierte Koagulum im Schwamm bewirkt zeitabhängig eine Proliferationssteigerung auf das Dreifache. Die isolierten Thrombozyten und deren Überstände bewirken mit und ohne Thrombinstimulation eine stark erhöhte Proliferationsrate bis zum Vierfachen im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte liegen damit weit über dem Thrombinniveau.

Die guten Heilungsergebnisse, die nach Auffüllung über kirschgroßer, enoraler Knochenhöhlräume mit dem „Schulte-Koagulum“ erreicht werden, sind nach heutigen Erkenntnissen auch auf die Wirkung des Thrombins und der stimulierten Thrombozyten zurückzuführen.

Linß, Christine: Die Eigenblutfüllung von Knochenhöhlräumen nach SCHULTE- neue Erkenntnisse.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|--|--------------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Literaturübersicht | 3 |
| 3. Ziel der Arbeit | 8 |
| 4. Materialien und Methoden | 9 |
| 4.1 Material | 9 |
| 4.2 Methoden | 11 |
| 4.2.1 Zellkultur | 11 |
| 4.2.2 Proliferationsbestimmung der MC3T3-E1-Zellen mittels Einbau von radioaktiv markiertem [³ H]Thymidin | 12 |
| 4.2.3 Gewinnung von Überständen aus „Schulte-Koagula“ | 12 |
| 4.2.4 Stimulation von MC3T3- E1 mit Thrombozytenüberstand | 13 |
| 4.2.5 Stimulation von MC3T3- E1 mit verschiedenen Thrombozyteninhaltsstoffen | 14 |
| 4.2.6 Modifizierte Thrombozytenpräparation nach Greinacher | 14 |
| 4.2.7 Thrombozytenisolation durch Gelfiltration | 16 |
| 4.2.8 Thrombozytenzählung | 16 |
| 4.2.9 Messung der Thrombozytenaggregation | 17 |
| 4.2.10 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung | 17 |
| 5 Ergebnisse | 18 |
| 5.1 Einfluss der definierten Bestandteile des „Schulte-Koagulums“ auf die Proliferation von MC3T3-E1 | 18 |
| 5.1.1 Zeitliche Bedingungen für die Proliferationsbestimmung von MC3T3-E1 | 18 |
| 5.1.2 Abhängigkeit der Proliferation von der Thrombinkonzentration | 20 |
| 5.1.3 Einfluss von Penizillin auf die Thrombinwirkung bei MC3T3-E1 | 21 |
| 5.1.4 Einfluss löslicher Bestandteile variierter „Schulte-Koagula“ auf die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2 | Einfluss freigesetzten Thrombozyteninhaltsstoffe auf die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen | 28 |
| 5.2.1 | Stimulation mit dem Überstand aktivierter Thrombozyten, präpariert durch Zentrifugation nach Greinacher | 28 |
| 5.2.2 | Stimulation mit dem Überstand aktivierter Thrombozyten, präpariert durch Gelfiltration | 30 |
| 5.2.3 | Einfluss definierter, aus aktivierten Thrombozyten freigesetzter Substanzen | 32 |
| 6. | Diskussion | 34 |
| 7. | Zusammenfassung | 48 |
| 8. | Literatur | 51 |
| 9. | Thesen | 59 |

1. Einleitung

Knochen unterliegt einem lebenslangen, intrinsischen, funktionellen Umbau, der ihn zur narbenfreien Ausheilung befähigt (Terheyden et al. 2001).

Bei vielen chirurgischen Eingriffen in der Mundhöhle wie z.B. Zystenausschälungen oder Entfernung retinierter Zähne bleiben im Knochen blutgefüllte Hohlräume zurück, die nach Verschluss der deckenden Weichteile primär heilen können.

Lange Zeit haben sich Kieferchirurgen gescheut, große intraorale Knochendefekte primär zu verschließen, da allgemein der putride Zerfall des Blutkoagulums bei den von der Mundhöhle aus durchgeführten Eingriffen befürchtet wurde. So hatte Partsch (1896) zunächst die Zystostomie angegeben, also die Umwandlung einer Zystenöhle zur Nebenbucht der Mundhöhle, während er die Ausschälung kleinerer Zysten mit primärem Nahtverschluss erst 14 Jahre später empfahl (Partsch 1910).

Ausgehend von den Beobachtungen, dass die Chance einer Primärheilung operativ entstandener Knochendefekte mit steigender Größe abnimmt und eine Keimfreiheit in der Mundhöhle nicht erwartet werden kann, wurde eine lokale und ggf. gleichzeitig systemische Antibiotikaprophylaxe empfohlen und durchgeführt (Fröhlich 1957, Schulte 1959, 1960 a).

Wegen seiner guten Verträglichkeit und therapeutischen Wirkung auf die Mundhöhlenkeime war und ist Penizillin G das Medikament der ersten Wahl. Es wurde auch lokal angewendet in der Hoffnung, in weniger gut durchbluteten Gebieten einen sicheren Infektionsschutz zu erreichen. Die örtliche Anwendung von Penizillin bewirkte jedoch entsprechend den Untersuchungen von Schulte (1960a) eine deutliche Verzögerung der Gerinnungszeit und führte bei Konzentrationen über 7500 E/ml zur vollständigen Hemmung der Blutgerinnung. Von anderen Autoren war die Ungerinnbarkeit für Penizillinkonzentrationen von 25.000 E/ml Blut (Flemming und Fish 1947) bis 60.000 E/ml (Matis et al. 1951) angegeben worden. Schulte (1960b) empfahl daher die Auffüllung intraoraler knöcherner Zystenohlräume mit einem Gemisch aus autologem Blut, Penizillin und einer Einheit Thrombin je 10.000 E Penizillin zum Ausgleich der Koagulationshemmung.

Reichenbach und Taege (1954) wiesen im Zusammenhang mit der Ausschälung von größeren Zysten und primärem Nahtverschluss darauf hin, dass der Hohlraum insbesondere bei Anwendung eines Lokalanästhetikums mit Vasokonstriktorzusatz nicht

ganz vollblutet und damit einer Infektion Vorschub geleistet werden kann. Um trotzdem eine vollständige Blutfüllung der Defekte zu erreichen, wurde von Schulte (1960b) die Stabilisierung des Eigenblutkoagulums durch Gelatineschwämme empfohlen. In weiteren Untersuchungen fand er heraus, dass der eingebrachte denaturierte Schwamm über den bekannten hämostyptischen Effekt hinaus auch mechanisch stabilisierend wirkt, so dass die Retraktion des Blutgerinnsels und die Serumabscheidung verhindert werden. Infolgedessen kann das Koagulum allseits wandständig bleiben und die Organisation von allen Seiten einsetzen, worin Schulte (1964) die Ursache für die hohe Primärheilungsrate sah.

Als Indikation zur Anwendung des stabilisierten Eigenblutkoagulums wurden von ihm walnuss- bis hühnereigroße Defekte nach Zystenentfernung und benignen zentralen Tumoren, große Kieferdefekte nach Osteotomien, Operationen mit Freilegung des Mandibularkanals sowie Rezidivoperationen von Zysten und Alveolarfortsatzdefekten angegeben.

In Anlehnung an die Beschreibung Schultes wird auch in der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie Halle das stabilisierte Eigenblutkoagulum seit Jahrzehnten erfolgreich angewendet (Maurer et al. 2002, 2003). Hauptindikationen hierfür sind Knochendefekte nach Zystektomien ab Kirschgröße. Nach Ausschälung des Zystenbalges und Spülung der Knochenhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung wird das intraoperativ vorbereitete „Schulte-Koagulum“ eingebracht und die Wunde primär verschlossen.

Hierfür werden 5 bis 10 ml frisches, mittels steriler Einwegspritze entnommenes Venenblut des Patienten verwendet, welches in einem sterilen Schälchen mit dem pulverförmigen Penizillin G (mindestens 10.000 E/ml Blut) und Gelatineschwammstückchen (Gelaspon®) vermischt wird. Die Zugabe von mindestens 250 IE Thrombin pro ml Blut setzt die zuvor durch Penizillin gehemmte Blutgerinnung wieder in Gang. Die vollgesaugten Schwämmchen werden nun drucklos in den Knochendefekt eingebracht, bis dieser vollständig gefüllt ist, und die Wunde wird dicht vernäht.

In einer retrospektiven Studie anhand des eigenen stationären Patientengutes aus den Jahren 1990 -1999 fanden Maurer et al. (2002) bei 85 % der mit „Schulte-Koagulum“ behandelten Zysten Hohlräume eine primäre Wundheilung. In lediglich 5,2 % der Fälle wurde wegen Wundinfektionen eine chirurgische Revision notwendig. Nach Auffassung der Autoren stellt das stabilisierte Venenblutkoagulum nach wie vor ein risikoarmes, einfach realisierbares und kostengünstiges Verfahren für die Knochenheilung dar.

2. Literaturübersicht

Der Wunsch nach Ersatz von verloren gegangener Knochensubstanz beschäftigt Kliniker und Forscher gleichermaßen.

In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts gelang Urist eine zu dieser Zeit nicht erklärliche Beobachtung: Die Implantation von allogenen demineralisierten Knochen in den Muskel bzw. ins Subkutangewebe führte zur atopischen Knochenneubildung (Urist 1965, 1967), obwohl im Transplantat keine vitalen Osteoblasten mehr vorhanden waren. Nach umfangreichen tierexperimentellen Untersuchungen stellte er die Hypothese auf, dass demineralisierter Knochen hitzeempfindliche Faktoren enthält, die durch Diffusion aus dem Knochentransplantat in der Umgebung Knochenneubildung hervorrufen können. Diese Art der Knochenneubildung wurde als Osteoinduktion bezeichnet.

Die später Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) genannten Faktoren wurden mit Ausnahme von BMP-1 der Transforming Growth Factor (TGF)- β -Superfamilie zugeordnet (Wozney 1999). BMPs sind Signalmoleküle, die an Oberflächenrezeptoren ihrer Zielzellen binden und Signalkaskaden bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen auslösen (Terheyden 2001). Diese Morphogene sind nicht auf die Präexistenz von vitalen Knochenzellen angewiesen (Wozney 1992), sondern bewirken die Differenzierung von Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) zu Osteoblasten. Unter den bisher bekannten zahlreichen BMPs sind BMP-2 und BMP-7 besonders osteoinduktiv (Terheyden und Jepsen 1999). Kübler und Urist (1991) wiesen durch Untersuchungen an Ratten mit demineralisierter Knochenmatrixgelatine bei 98 % der Fälle eine Osteoinduktion nach. Weitere Autoren (Bakamjan und Leonhard 1977, Glowacki et al. 1981, Salyer 1992) berichteten über Erfolge mit der Verwendung demineralisierter Knochenmatrix zur Rekonstruktion von experimentell erzeugten Kalottendefekten kritischer Größe, die keine Spontanheilung zeigten. Kloss et al. (2004) haben mit ihren tierexperimentellen Untersuchungen an adulten Schweinen zur Osteoinduktivität des Wachstumsfaktors bP (bovines Protein) gezeigt, dass lediglich in den ersten zwei Wochen eine Beschleunigung der Knochenregeneration erzielt werden konnte.

Urist selbst verband mit seiner Entdeckung die Hoffnung, dass im 21. Jahrhundert verloren gegangener Knochen in beliebiger Menge mit Hilfe der BMPs ersetzt werden könnte und praktisch keine Entnahmeoperationen zur Gewinnung autologer Knochentransplantate mehr notwendig wären. BMPs sind heute dank gentechnischer

Herstellung verfügbar, jedoch sehr teuer. Seit dem Jahr 2001 besteht in Europa eine klinische Zulassung für die Anwendung von rekombinantem BMP-7 zur Behandlung von Pseudarthrosen langer Röhrenknochen; in den USA ist BMP-2 seit 2002 zur Fusion von Wirbelkörpern bei Erwachsenen zugelassen. Zur Osteoinduktion im adulten Organismus sind lokal hohe BMP-Dosen erforderlich, die im Mikrogrammbereich und damit weit über den physiologischen Konzentrationen liegen, die bei embryonalen Differenzierungsvorgängen notwendig sind (Würzler et al. 2004).

Die Behandlung mit BMPs hat die in sie gesetzten Erwartungen bisher nicht erfüllen können, da zur Osteoinduktion nicht nur Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, sondern auch Stammzellen und eine Matrix als Leitschiene vorhanden sein müssen.

Das Ausmaß der Knochenneubildung wird in erster Linie durch die Anzahl der mesenchymalen Stammzellen im Implantatlager und die Halbwertszeit der BMP-Moleküle im Gewebe bestimmt (Kübler et al. 2000). Da die Zahl der induzierbaren Stammzellen durch das Lebensalter des Patienten und die Vaskularisation vorgegeben ist, richtet sich die Forschung hauptsächlich auf die Suche nach geeigneten Trägermaterialien für die BMPs, um deren Verweildauer und verzögerte Freigabe verbessern zu können (Kübler et al. 2000). Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich daher auch mit der Gewinnung und osteogenen Differenzierung von adulten mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark oder Fettgewebe sowohl am Tiermodell (Knippenberg et al. 2005), als auch an humanen Zellen (Romanov et al. 2005), die in Zukunft zur Regeneration von Geweben eingesetzt werden könnten, die die Fähigkeit zur Autoregeneration verloren haben.

In den letzten Jahren sind im Bereich der chirurgischen Zahnheilkunde aber auch andere Alternativen zur Ausheilung von Knochendefekten verfolgt worden. Insbesondere die große Gruppe der Knochenersatzmaterialien, allein oder in Verbindung mit autologem bzw. homologem Knochen von Leichenspendern, hat einen außerordentlichen Boom erlebt. Allen Knochenersatzmaterialien ist gemein, dass sie lediglich die Knochenmatrix ersetzen, nicht jedoch die zur Regeneration notwendigen Zellen und Signalmoleküle (Terheyden 2000). In der Regel handelt es sich um osteokonduktive Biomaterialien, die inkorporiert oder vom Körper resorbiert werden sollen und den Osteoblasten des Knochenlagers als Leitschiene dienen. Die schrittweise appositionelle Besiedlung mit Knochenzellen benötigt je nach Defektgröße Monate und erfolgt nicht immer vollständig, so dass bindegewebig eingehheilte Partikel keine Seltenheit sind. Organische Kalziumverbindungen wie Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat sowie kalziumhaltige

Silikate (Biogläser) werden als poröse bzw. solide Partikel angeboten. Alpha-Tricalciumphosphat wandelt sich spontan zu einem gewissen Prozentsatz in Hydroxylapatit um, welches sich im Körper inert verhält und deshalb noch Jahre nach der Implantation zum Beispiel im Röntgenbild nachgewiesen werden kann. Beta-Tricalciumphosphat soll sich vollständig innerhalb von Monaten auflösen (Terheyden 2000).

Knochenersatzmaterialien stellen also für den Operateur meist einen Kompromiss gegenüber der ausschließlichen Verwendung autologen Knochens dar, da dieser in der Mundhöhle als Transplantat nur in begrenztem Umfang zur Verfügung steht. Große Knochendefekte können durch frei transplantierten Knochen wie zum Beispiel vom Beckenkamm versorgt werden. Hierzu ist jedoch eine zusätzliche Entnahmeoperation notwendig und eine gewisse Resorption des Transplantates, deren Ausmaß nicht genau vorausgesagt werden kann, unvermeidlich.

Wegen der Gefahr der Infektionsübertragung, Abstoßung bzw. allergischer Reaktion auf allogene und xenogene Knochentransplantate sowie daraus hergestellter Produkte ist auch deren Einsatz nicht unumstritten.

Ende der 1990er Jahre rückte mit der Anwendung von plättchenreichem Plasma (PRP) wieder eine körpereigene Quelle von Wachstumsfaktoren in den Mittelpunkt des Interesses. Da Thrombozyten verschiedene Wachstumsfaktoren wie Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), TGF- β 1 und TGF- β 2, Insulin-Like Growth Factor (IGF) enthalten, wurde deren möglicher Nutzen bei der Knochenregeneration geprüft. Die Wirkungsentfaltung der Wachstumsfaktoren setzt jedoch voraus, dass vitale Knochenzellen als Zielzellen lokal vorhanden sind (Schlegel et al. 2003).

Bereits 1969 hatte Schulte die Verwendung von zentrifugiertem Eigenblut zur Füllung von Knochendefekten nach Zystektomie (Schulte 1969) angegeben. Er modifizierte durch die Entfernung des zellfreien Plasmas das von ihm angegebene stabilisierte Eigenblutkoagulum. Die Erstbeschreibung der PRP-Herstellung und Anwendung zur beschleunigten knöchernen Regeneration in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie stammt von Whitman et al. (1997), die außerdem einen positiven Effekt auf die Weichteilheilung fanden. Als Ursache für die Förderung der Regeneration sahen die Autoren Fibrinogen und Wachstumsfaktoren aus PRP an.

Die präoperative Herstellung von PRP aus dem patienteneigenen Blut erfolgte zunächst aufwändig unter transfusionsmedizinischen Bedingungen durch diskontinuierliche Thrombozytapherese, später dann durch Zentrifugation kleinerer Vollblutvolumina

mittels Laborzentrifugen. Da PRP nicht osteoinduktiv ist, wird es meist in Verbindung mit autologem Knochen und/oder Knochenersatzmaterialien in die Knochendefekte eingebracht. Marx et al. (1998) haben in einer klinischen Studie mit Unterkieferkontinuitätsdefekten gezeigt, dass die Zugabe von Thrombin-aktiviertem PRP zu Knochentransplantaten die Knochenreifung beschleunigt und zu einer erhöhten Knochendichte führt. Diese Ergebnisse wurden geradezu euphorisch aufgefasst und in der Folgezeit Zentrifugen sowie Instrumentarien zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten unter zahnärztlichen Praxisbedingungen auf den Markt gebracht und zahlreich eingesetzt, ohne weitere ausführliche Studien abzuwarten (Bauer 2004). Wissenschaftliche Untersuchungen kommen zu unterschiedlichen, teils kontroversen Ergebnissen bezüglich des Nutzens der PRP-Anwendung bei der Knochenregeneration.

So haben Weibrich et al. (2002) unter In-vitro-Bedingungen eine Steigerung der Proliferationsrate humaner Zellen ossären Ursprungs durch Zugabe von Thrombozyten gezeigt. Zechner et al. (2003) fanden bei der Sofortimplantation im Prämolarenbereich von Minischweinen einen statistisch signifikanten Effekt für den Knochen-Implantat-Kontakt auf der PRP-Seite nach drei Wochen und damit eine Halbierung der Implantateinheilungszeit. Tayapongsak et al. (1994) fanden bei der Kombination von autologem Fibrinkleber mit gefriergetrocknetem Knochen und Knochenmark zur Rekonstruktion von Kieferdefekten eine Wachstumsstimulation von Fibroblasten und Osteoblasten und eine beschleunigte Transplantateinheilung. Bei der von den Autoren angegeben Methode wurde in der Blutbank präoperativ aus dem Patientenblut Fibrinkleber hergestellt, der aus konzentrierter Fibrinogenlösung und Thrombinlösung bestand. Damit wurde die Verwendung von bovinem Thrombin mit den daraus resultierenden Risiken vermieden. Thorn et al. (2004) haben beobachtet, dass autologer Fibrinkleber mit Wachstumsfaktoren Knochentransplantate besser verankern hilft und den Remodeling-Prozess beschleunigt.

In einigen tierexperimentellen Untersuchungen misslang allerdings der Nachweis der Osteoinduktion durch die Kombination von PRP mit autologem Knochen. Terheyden et al. (2002) fanden ebenfalls am Minischwein-Modell beim Sinuslift einen deutlich geringeren Effekt von PRP im Vergleich zu BMP. Bei zusätzlicher Kombination von sehr hoch konzentriertem PRP mit dem Knochenersatzmittel BioOss und autologem Knochen resultierte mit PRP eine deutlich gesteigerte Knochendichte bei gleichzeitig gering verminderter Knochen-Implantat-Kontaktrate. Choi et al. (2004) zeigten in ihren

Versuchen mit Unterkieferkontinuitätsdefekten am Kaninchenmodell, dass die Zugabe von PRP zum autologen Knochentransplantat die Knochenneubildung im Vergleich zur Nicht-PRP-Gruppe nicht erhöht. Schlegel et al. (2003) wiesen in einer Studie zur Knochenregeneration von „critical size“-Defekten am Os frontale adulter Schweine nach, dass die Zugabe von PRP zu autologem Knochen eine zeitliche Vorverlagerung der initialen Mineralisation um zwei Wochen bewirkt, ohne quantitativ über den Beobachtungszeitraum von 26 Wochen die Werte des autologen Knochens ohne PRP-Zugabe zu übertreffen. Die zusätzliche Kombination mit Knochenersatzmaterialien hatte keinen positiven Effekt, sondern führte im Gegenteil zu einem erhöhten Anteil von neugebildetem, nicht mineralisiertem Knochen. Aghaloo et al. (2002) fanden bei der Behandlung von Kaninchenkalottendefekten nicht kritischer Größe durch autologe Knocheneinlagerung mit oder ohne PRP keine signifikanten Unterschiede bei der Knochenneubildung mittels histomorphometrischer und radiographischer Untersuchung, sondern nur eine Tendenz zu erhöhter Knochendichte im Vergleich zur Kontrolle und PRP allein. In Zellkulturen (Osteoblasten und Präosteoblasten) gab es keinen Unterschied nach Stimulation mit plättchenreichem oder plättchenarmem Plasma (Seher 2004).

Auf Grund der widersprüchlichen Datenlage und der daraus resultierenden fehlenden Vergleichbarkeit der Studien und Fallberichte empfahl Grageda (2004) zur Vereinheitlichung ein standardisiertes Forschungsprotokoll. Bei der Auswertung sollte insbesondere auf die histomorphometrische Analyse und Quantifizierung der Knochentransplantate und Wachstumsfaktoren geachtet werden. Weibrich (2003) hielt bei der PRP-Herstellung eine Thrombozytenkonzentrierung von einem Zwei- bis Dreifachen des Vollblutgehaltes für sinnvoll, um bei der Kombination mit autologen Knochentransplantaten einen klinisch relevanten biologischen Effekt zu erzielen. Eine Konzentration oberhalb des Fünffachen führte bei humanen Knochenzellen zu weniger günstigen Ergebnissen, wie unter In-vitro-Bedingungen (Weibrich et al. 2002) und im Tiermodell (Gruber et al. 2002) gezeigt werden konnte.

Obwohl seit der zahlreich zitierten Publikation von Marx et al. (1998) bereits sieben Jahre vergangen sind, fehlt es letztlich an belastbaren klinischen Studien, die den Nutzen des PRP-Einsatzes belegen (Bauer 2004).

3. Zielstellung

In der Vergangenheit wurde vermutet, dass die hohe Primärheilungsrate nach Anwendung des „Schulte-Koagulums“, einer klinisch erfolgreichen Methode zur Versorgung größerer intraoraler Knochendefekte, auf seiner Retraktionsstabilität beruht (Schulte 1964).

Vom heutigen Wissensstand aus betrachtet ist außer dieser mechanischen Wirkung auch von den einzelnen Bestandteilen Blut, Penizillin, denaturiertem Gelatineschwamm und Thrombin eine biologische Aktivität zu erwarten, die die Knochenregeneration beeinflusst und in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll. Darüber hinaus werden durch die Interaktion von Thrombin und Blutplättchen Substanzen freigesetzt, welche die knöcherne Ausheilung der Defekte sekundär begünstigen. Thrombin, das in einer hohen Konzentration im „Schulte-Koagulum“ enthalten und als stärkster physiologischer Thrombozytenaktivator bekannt ist, kommt eine Schlüsselrolle zu.

Zur wissenschaftlichen Reevaluierung wird anhand eines in der Knochenforschung bewährten Zellkulturmodells mit immortalisierten osteoblastenartigen Mäusezellen (MC3T3-E1) deren Proliferationsrate unter reproduzierbaren Bedingungen untersucht. Die Einzelkomponenten des „Schulte-Koagulums“ und deren Kombinationen werden auf ihre proliferationsbeeinflussende Wirkung überprüft. Besonders soll die Stimulation der MC3T3-E1-Zellen mit humanen Thrombozyten, die durch zwei unterschiedliche Präparationsmethoden isoliert worden sind, und die von ihnen freigesetzten Inhaltsstoffen berücksichtigt werden. Als Methode zur Proliferationsbestimmung wird der Tritium-Thymidin-Assay optimiert.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

| Reagenzien | Bezugsquelle |
|---|--------------------|
| Apyrase | Sigma |
| a- MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modifikation) | Sigma |
| BSA (Bovines Serumalbumin) | Sigma |
| Calciumchlorid | Merck |
| Citronensäure-Monohydrat | Merck |
| D(+)-Glukose | Merck |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Fluka |
| Ethanol | Roth |
| FKS (fötale Kälberserum) | Biochrom AG |
| Gelaspon [®] | Ankerpharm |
| HEPES | Roth |
| Hirudin | Loxo |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kollagen (Kollagenreagens Horm) | Nycomed |
| L- Glutamin | Sigma |
| Lumasafe plus (Szintillationsflüssigkeit) | Lumac LSC |
| Magnesiumchlorid | Merck |
| [Methyl- ³ H]-Thymidin | Life Sciences Inc. |
| 2-Methylthio-ADP | Sigma |
| Natriumchloridlösung | Sigma/ Braun |
| Natriumchloridlösung | Braun |
| Natriumhydrogenkarbonat | Roth |
| Natriumhydroxid | Merck |
| PBS-Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ | Biochrom |
| Penizillin G | Sigma |
| Penizillin G 1 Mega | Jenapharm |

| | |
|--|---------------------|
| Salzsäure | Merck |
| Sepharose 2B | Amersham Bioscience |
| Serotonin | Sigma |
| Natriumbikarbonat | Sigma |
| SQ 29548 | Reatec; Biomol |
| Streptomycin | Sigma |
| Thrombin | Sigma |
| Thrombin, Topical (Bovine Origin) | Jones Pharma Inc. |
| Trichloressigsäure | Roth |
| Trinatriumcitrat-Dihydrat | Merck |
| Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) | Roth |
| Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%) | Sigma |
| Trypsin | Pan |
| U 46619 (9,11-dideoxy-11a, 9 a-expoxy-methano-Prostaglandin = F2a) | Sigma |

Geräte

| | |
|---|------------------|
| Aggregometer (Aggregationsprofiler PAP 4) | Bio/Data Corp. |
| Biofuge fresco | Heraeus |
| Biofuge primo | Heraeus |
| Hera cell (Brutschrank) | Heraeus |
| Hera instruments 6220 (Brutschrank) | Heraeus |
| Hera safe (Sicherheitsarbeitsbank) | Heraeus |
| Hermle-Zentrifuge Z364 | MAGV GmbH |
| Inolab pH 720 (pH-Meter) | WTW |
| Liquid Scintillation Analyser | Canberra Packard |
| Thermomixer 5436 | Störk- Tronic |
| Wilovert S (Phasenkontrastmikroskop) | Hundt |

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die Zelllinie embryonaler, fibroblastenartiger Mäusezellen MC3T3-E1, die zu Osteoblasten differenzieren können, stammte von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig.

Die Kultur erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Renner, Frankfurt) in a-MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modifikation), angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 100 Einheiten/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin (=a-MEM+) in humider Atmosphäre bei 6% CO₂ und 37 °C unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator (BBD6220, Haereus). Alle 14 Tage wurde das Medium mit 2 mM L-Glutamin aufgefrischt. Wöchentlich fand ein Mediumwechsel statt, und nach Ausbildung eines dichten Zellrasens nach 7-10 Tagen erfolgte das Umsetzen der Zellen (Passagieren) oder die Aussaat für die Versuche. Hierzu wurden die adhärennten Zellen nach Abnahme des Mediums für 10 min bei 37°C mit 10 ml 0,25%-iger (v/v) Trypsinlösung inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinlösung durch 10 ml a-MEM+ ersetzt und die Zellen darin durch etwa 15-20-maliges Aspirieren und Injizieren mit einer Glaspipette suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Renner, Dannstadt) überführt und weitere 10 ml a-MEM+ zugefügt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 200 g zentrifugiert (Biofuge fresco, Haereus), der Überstand abgenommen, das entstandene Zellsediment in 20 ml a-MEM+ resuspendiert und dieser Waschschrift einmal wiederholt. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer und Phasenkontrastmikroskop (Wilovert S, Hund) ermittelt.

Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte durch die Trypanblaufärbung. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der die defekte Zellmembran toter Zellen durchdringt und als Anion an zytosolische Proteine bindet.

Für die Untersuchungen wurden die Zellen der 4. bis 9. Passage verwendet. Nach Aussaat von je 1×10^5 vitalen Zellen pro ml a-MEM+ pro Loch auf 24-Loch-Zellkulturplatten erfolgte für 24 Stunden die Kultivierung im Brutschrank. Zum Versuch wurde von den adhärennten Zellen das FKS-haltige a-MEM+ abgenommen und die Zellen zweimal mit je 1 ml serumfreiem a-MEM gewaschen. Die verwendeten Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, in serumfreiem a-MEM verdünnt und damit die Zellen zu je 1 ml pro Loch überschichtet.

4.2.2 Proliferationbestimmung der MC3T3-E1 Zellen mittels Einbau von radioaktiv markiertem [³H]Thymidin

Nach der experimentell bestimmten optimalen Stimulationszeit von 9 Stunden (siehe Ergebnissteil 5.1.1) erfolgte die radioaktive Markierung der MC3T3-E1-Zellen mit je 0,5 µCi [³H]Thymidin (spezifische Aktivität 2,0 Ci/mmol) pro 1 ml Ansatz auf der 24-Loch-Zellkulturplatte. Nach 18 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die radioaktiven Überstände abgenommen und die Zellen durch Zugabe von je 250 µl einer 5 %-igen (w/v) Trichloressigsäure (TCA)-Lösung für 30 Minuten auf Eis fixiert. Es folgte die Abnahme der TCA-Lösung und zweimaliges Waschen der Zellen mit je 1 ml eiskaltem 90 %-igem Ethanol. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von je 200 µl 1 M Natriumhydroxid-Lösung für 10 min auf Eis und die Neutralisation durch anschließendes Zufügen von je 200 µl 2 M Salzsäure. Die Proben von ca. 400 µl wurden vollständig in 5 ml-Szintillationsgefäße (Pony Vial, Canberra Packard) überführt, 4 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus) zugegeben und gründlich durchmischt. Nach drei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden in den Proben mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Canberra Packard) für 10 Minuten die radioaktiven Zerfälle pro Minute bestimmt. Als Kontrolle dienten zellfreie Ansätze mit ebenfalls 0,5 µCi/ml [³H]Thymidin, mit deren Hilfe der prozentuale Anteil des eingebauten radioaktiv markierten Thymidins als Maß für die Zellproliferation ermittelt wurde (maximale Inkorporation=100%). Alle Messwerte wurden als Triplikate ausgeführt. Die statistische Auswertung und Signifikanzprüfung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism.

4.2.3 Gewinnung von Überständen aus „Schulte-Koagula“ in vitro

Zur Gewinnung von Überständen des „Schulte-Koagulums“ wurden dessen Zusammensetzung unter sterilen Bedingungen simuliert und seine Bestandteile (Vollblut, Penizillin, Thrombin, Gelaspon[®]-Schwamm) anteilmäßig variiert.

In einer 24-Loch-Zellkulturplatte wurden Penizillin und Thrombin zu je 100 µl pro Loch vorgelegt und durch Zugabe von 900 µl frisch entnommenem Vollblut auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Den Ansätzen wurde unmittelbar ein ca. 1 cm³ großer kubisch geschnittener Gelaspon[®]-Schwamm zugegeben und dieser mittels steriler

Pipettenspitze vollständig benetzt. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gelaspon[®]-Schwammstücke mit je einer sterilen Pipettenspitze in je 1100 µl physiologische NaCl-Lösung überführt und nach Rühren des Ansatzes nach 5, 30 und 60 Minuten jeweils 800 µl Überstand abgenommen. Bei 200 g erfolgte in sterilen Sarstedt-Röhrchen die Zentrifugation für 5 Minuten. Vom klaren Überstand wurden zweimal 350 µl abgenommen, mit 10 U/ml Hirudin oder einer äquivalenten Menge physiologischer NaCl-Lösung für weitere 5 Minuten inkubiert, um eventuell noch freies Thrombin zu binden und schließlich je 100 µl als Stimulus auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Die Weiterbehandlung entsprach dem Vorgehen wie beim Proliferationsassay. Bei hohen Penzillinkonzentrationen wurde in einem gesonderten Versuch zur Differenzierung vitaler und nicht vitaler MC3T3-E1-Zellen eine Trypanblaufärbung (siehe 4.2.11) durchgeführt.

4.2.4 Stimulation von MC3T3-E1 mit Thrombozytenüberstand

Nachdem bisher Vollblut Teil des Versuchsansatzes war, sollte jetzt die proliferationsfördernde Wirkung, die von den Thrombozyten herrührt, im Zellkulturmodell untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Blutplättchen aus der modifizierten Präparation nach Martinson et al. (1998), später auch durch Gelfiltration (nach: Gel filtration. Principles and Methods. Pharmacia Biotech, 1985) isolierte Thrombozyten verwendet, um eventuell zentrifugationsbedingte Unterschiede und Artefakte ausschließen zu können.

Die am Vortag in 24-Loch-Platten ausgesäten MC3T3-E1-Zellen wurden wie unter 4.2.1 beschrieben serumfrei gewaschen und je 900 µl serumfreies a-MEM pro Loch der 24-Loch-Zellkulturplatte vorgelegt.

Nach dem Einstellen der durch sterile Präparation gewonnenen Thrombozytensuspension auf 5×10^8 Plättchen pro ml erfolgten die weiteren Arbeitsschritte auf einem auf 37°C vorgewärmten Thermomixer (Eppendorf). Jeweils 360 µl Plättchensuspension wurden mit 40 µl Suspensionspuffer oder Thrombin (Endkonzentration 1 U/ml) inkubiert und für 5 Minuten auf dem Thermomixer unter Rühren mit 2 Stahlkügelchen (2 mm Durchmesser, SKF Schweinfurt) stimuliert. Die stattfindende Thrombozytenaggregation konnte makroskopisch beobachtet und durch Messung am Aggregometer quantifiziert werden. Die Überstände wurden in Sarstedt-Röhrchen überführt und in der Hermle-Zentrifuge

5 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert, um die zellulären Bestandteile abzutrennen. Es folgte dann die Abnahme von je 350 µl Überstand und nach Überführung auf Eis die Zugabe von 3,5 µl Hirudin (Endkonzentration 10 U/ml) oder Suspensionspuffer, um eventuell noch ungebundenes Thrombin abzufangen. Nach weiteren 5 Minuten wurden die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen mit je 100 µl der Überstände stimuliert, nach 9 Stunden der radioaktive Marker zugegeben und der [³H]-Thymidin-Einbau nach weiteren 18 Stunden durch Zugabe von 250 µl eiskalter TCA gestoppt (siehe 4.2.2).

4.2.5 Stimulation von MC3T3-E1 mit verschiedenen Thrombozyteninhaltsstoffen

Es ist bekannt, dass Blutplättchen in ihren Granulae eine Vielzahl verschiedener sekretorischer Proteine enthalten, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Gerinnungsproteine, Zytokine, zellaktivierende Agenzien und angiogenetische Faktoren (Übersicht bei Reed et al. 2002). Nachdem der Einfluss stimulierter und nicht stimulierter Thrombozyten bereits untersucht worden war, sollte nun mit Hilfe kommerziell verfügbarer einzelner Thrombozyteninhaltsstoffe bzw. stabiler Analoga deren proliferationsfördernde Wirkung im Zellkulturmodell geprüft werden.

Die Vorbereitung der am Vortag ausgesäten Zellen erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben. Auf die serumfrei gewaschenen Zellen wurden je 900 µl serumfreies a-MEM pipettiert, die Agonisten (z.B. U 46619, 2-Methyl-Thio-ADP, Serotonin) 10fach konzentriert zugegeben und weiter nach dem Protokoll für den Proliferationsassay verfahren.

4.2.6 Modifizierte Thrombozytenpräparation nach Greinacher

Zur Isolierung von menschlichen Thrombozyten wurden 60-80 ml Venenblut aus der Kubitalvene freiwilliger, gesunder Spender entnommen, nachdem vorher die Aufklärung erfolgt war, das Einverständnis der Probanden und ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit Schreiben vom 17.05.2001 vorlagen. Voraussetzung für die Eignung als Blutspender war außerdem ein mindestens zweiwöchiges Intervall ohne Einnahme von Medikamenten, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen, wie z. B. Analgetika und nichtsteroidale Antiphlogistika (Acetylsalicylsäure u. a.). Nach der Blutentnahme erfolgte

unter sterilen Bedingungen die Präparation entsprechend der Methode von Greinacher et al. (1991), modifiziert nach Martinson et al. (1998).

Hierbei wurde das Blut durch Zugabe von Acid-Citrate-Dextrose Formula A (ACD-A), bestehend aus 2,2 % Tri-Natrium-Dihydrat, 0,8 % Citronensäure-Monohydrat, 2,5 % α -D(+)-Glukose im Verhältnis 1:6 antikoaguliert und zum Abtrennen des plättchenreichen Plasmas (PRP) bei 275 g 15 Minuten lang in einer Hermle-Zentrifuge zentrifugiert. Durch vorsichtiges Abpipettieren des PRP, das der oberen Phase entspricht, wurden Verunreinigungen durch andere Blutzellen aus den unteren Phasen weitgehend vermieden. Nach Zugabe von 111 μ l ACD-A und 2,5 μ l Apyrase (zur Verhinderung einer ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung) pro ml PRP folgte der nächste Zentrifugationsschritt bei 700 g für 7 Minuten. Das den Überstand bildende plättchenarme Plasma (PPP) wurde verworfen und das aus je 10 ml Vollblut gewonnene Thrombozytensediment in 1 ml Waschpuffer (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5,5 mM Glukose, 1 U/ml Apyrase, 1 U/ml Hirudin, pH 6,4) resuspendiert. Nach Zugabe von jeweils einem weiteren Milliliter Waschpuffer erfolgte nach 10minütiger Inkubation im 37°C-Wasserbad erneut eine Zentrifugation bei 700 g für 7 Minuten. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Sediment in einem zweiten Waschschrift mit hirudinfreiem Waschpuffer analog resuspendiert. Durch das Fehlen des Hirudin im zweiten Waschpuffer sollten Interaktionen von Hirudin und Thrombin während der Versuche verhindert werden. Nach dem abschließenden Zentrifugationsschritt (700 g, 7 Minuten) und Verwerfen des Überstandes wurden die Sedimente in je 0,5 ml Suspensionspuffer (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5,5 mM Glukose, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7,4) resuspendiert, zusammengeführt und entsprechend der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer die gewünschte Plättchenkonzentration von 5×10^8 Thrombozyten /ml mit Suspensionspuffer eingestellt.

4.2.7 Thrombozytenisolation durch Gelfiltration

Die chromatographische Reinigung der Thrombozyten über ein Molekularsieb (Gelfiltration) erfolgte mit 18 ml Sepharose 2B. Dazu wurde das gut aufgeschüttelte Sepharosegel (in Ethanol konserviert) in eine Kunststoffsäule gefüllt (Bio Rad). Nach Absetzen des Gels und Abfließen des Ethanols erfolgte die Spülung mit 40 ml

Waschpuffer (siehe Thrombozytenpräparation nach Greinacher unter 4.2.6).

Zur Vorbereitung der Gelfiltration unter keimfreien Bedingungen wurde eine leere Säule zuerst mit 5 M NaOH- Lösung gespült und die Lauge dann mit Aqua bidest entfernt. Es erfolgte dann das Einfüllen des in einer zweiten Säule vorbereiteten Sepharosegels, das nun über Nacht mit absolutem unvergällten Ethanol bei Raumtemperatur sterilisiert wurde. Am nächsten Tag wurde das Ethanol abgelassen und die Säule mit 50 ml sterilem Suspensionspuffer (siehe Thrombozytenpräparation nach Greinacher unter 4.2.6) gespült. Das zur Isolierung der Thrombozyten benötigte PRP wurde nach der Greinacher-Präparation gewonnen. Durch vorsichtiges Herablaufenlassen an der inneren Säulenwand wurde 1 ml PRP aufgetragen und 1 ml Eluat in einem sterilen silikonisierten Eppendorfgesäß aufgefangen. Es erfolgte nun das schrittweise Auftragen von je 1 ml Suspensionspuffer (insgesamt 5 ml) und das fraktionierte Auffangen des Eluates zu jeweils 0,5 ml. Nach Verwerfen des Ausschlussvolumens (ca. 2 ml) kündigte sich die Plättchenfraktion durch eine Trübung des Eluates an. Die plättchenhaltigen Fraktionen wurden in 0,5-ml-Portionen aufgefangen, die Thrombozytenzahl wie unter 4.2.8 beschrieben in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Bis zum Versuchsbeginn stand die gepoolte Plättchensuspension ($3-5 \times 10^8$ Thrombozyten pro ml) kurzzeitig im 37°C-Wasserbad.

4.2.8 Thrombozytenzählung

Von der gewonnenen Thrombozytensuspension wurden 10 µl abgenommen und 1:100 mit Suspensionspuffer verdünnt. Nach Aufbringen von 10 µl der verdünnten Thrombozytensuspension in eine Neubauer-Zählkammer erfolgte die Zählung der Blutplättchen unter dem Phasenkontrastmikroskop. Hierbei wurden drei Gruppenquadrate ausgezählt und die Thrombozytenzahl pro ml wie folgt berechnet: Mittelwert der gezählten Thrombozyten x 100 (Verdünnungsfaktor) x 250.000.

4.2.9 Messung der Thrombozytenaggregation

Zur Feststellung der Funktionstüchtigkeit sowohl der präparierten Thrombozyten als auch des verwendeten Thrombins diente die Thrombozytenaggregationsmessung.

Zunächst erfolgte die Eichung des Aggregometers (Aggregationsprofiler PAP 4, Mölab) mit Suspensionspuffer (= maximale Lichtdurchlässigkeit). Von der auf 3×10^5 Zellen pro ml eingestellten Thrombozytensuspension wurden 198 μl mit 11 μl Kontrollpuffer fünf Minuten lang unter Rühren mittels Magnetrührer in silikonisierten Glasküvetten (Mölab, Hilden) vorinkubiert. Nun wurde durch Zugabe von 11 μl Thrombinlösung (Endkonzentration 1 U/ml) die Aggregation unter weiterem Rühren gestartet. Mittels eines angeschlossenen Schreibers erfolgte die Aufzeichnung der prozentualen Aggregatebildung indirekt über die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit, bis mehrere Minuten lang keine Veränderung mehr feststellbar war.

4.2.10 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

Die Anfärbung von MC3T3-E1-Zellen mit Trypanblau diente der Unterscheidung vitaler von nicht vitalen Zellen.

Nach dem Ablösen des Zellrasens vom Boden der Kulturschalen mit 0,25%-igem Trypsin für 10 Minuten wurde durch Zugabe von 2 ml FKS-haltigem α -MEM gestoppt, die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt, mit gleichem Medium auf 10 ml aufgefüllt, bei 200 g in der Biofuge 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 10 ml FKS-haltigem α -MEM resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Es folgte das Verwerfen des Überstandes, die Resuspension in 5 ml PBS (pH 7,4) und die Zählung in der Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl wurde dann auf 10^5 Zellen pro ml eingestellt.

Zur Färbung wurden 100 μl Trypanblau auf 500 μl Zellsuspension pipettiert und nach einer Minute Einwirkzeit in der Neubauer-Zählkammer die gefärbten und ungefärbten Zellen in jeweils drei Eckquadraten gezählt, wobei sich vitale Zellen als ungefärbt darstellten. Nach Ermitteln der Mittelwerte konnte der prozentuale Anteil vitaler Zellen errechnet werden.

5. Ergebnisse

5.1 Einfluss der definierten Bestandteile des „Schulte-Koagulums“ auf die Proliferation von MC3T3-E1-Zellen

5.1.1 Zeitliche Bedingungen für die Proliferationsbestimmung

Die Proliferationsrate wurde anhand des Einbaus von Tritium-markiertem Thymidin ($[H^3]$ -Thymidin) in die DNA bestimmt, der in der S-Phase des Zellzyklus stattfindet.

Um hierfür ein geeignetes Zeitfenster zu finden, wurden den MC3T3-E1-Zellen 24 Stunden nach der Aussaat das serumhaltige Medium und damit die Wachstumsfaktoren entzogen und durch serumfreies Medium ersetzt. Ausgehend von diesen Basalbedingungen erfolgte die Stimulation mit Thrombin (1 U/ml) oder serumfreiem Medium (Kontrolle). Nach 6 bis 24 Stunden wurde der radioaktive Marker (0,5 μ Ci/ml $[H^3]$ -Thymidin) zugegeben und nach weiteren 18 Stunden dessen Einbau in die DNA gestoppt. Die Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute im eingebauten $[H^3]$ -Thymidin wurde gemessen und aus dem Verhältnis zum Gesamt- $[H^3]$ -Thymidin die Proliferationsrate bestimmt.

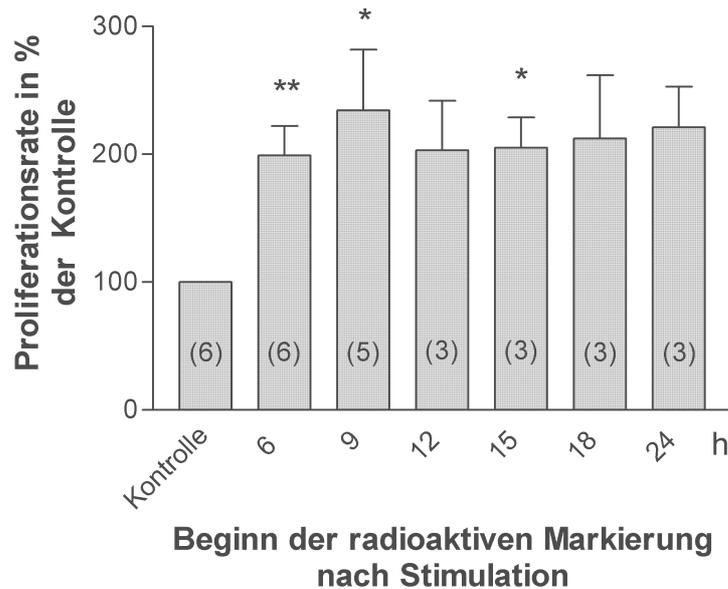


Abb.1: Zeitverlauf der Proliferation nach Stimulation von MC3T3-E1 mit Thrombin

MC3T3-E1-Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit Thrombin (1 U/ml) oder serumfreiem Medium (Kontrolle) stimuliert, nach 6, 9, 12, 15, 18 und 24 Stunden der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNA jeweils 18 Stunden später gestoppt (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt und zu jedem Versuch wurde eine eigene Kontrolle mitgeführt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=3-6$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t -Test (Vergleich zur Kontrolle), * $p=0,05$, ** $p=0,01$

Zur quantitativen Vergleichbarkeit der Einzelversuche untereinander wurden diese auf den jeweiligen Kontrollwert (100 %) normiert.

Die Proliferationsrate der MC3T3-E1-Zellen war nach radioaktiver Markierung 6 Stunden nach dem Stimulationsbeginn mit 199 ± 23 % signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert (s. Abb.1).

Nach 9, 12, 15, 18 und 24 Stunden konnte ebenfalls etwa eine Verdoppelung der Proliferationsrate festgestellt werden, welche mit 234 ± 47 % nach 9 Stunden und 205 ± 24 % nach 15 Stunden signifikant war.

Entsprechend der Ergebnisse und aus verfahrenstechnischen Gründen wurden in allen weiteren Proliferationsversuchen die Zellen 9 Stunden nach dem Einwirken des Stimulus mit [H^3]-Thymidin markiert.

5.1.2 Abhängigkeit der Proliferation von der Thrombinkonzentration

Thrombin führte reproduzierbar zu einer Proliferationssteigerung bei MC3T3-E1-Zellen. Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Proliferation ermittelt. Schulte empfahl die Anwendung von einer Einheit Thrombin auf 10.000 IE Penizillin; bezogen auf die heute verwendeten Packungsgrößen von 1 Mega IE Penizillin entspricht das 100 U Thrombin. Um der Empfehlung Schultes nahe zu kommen, wurden im Rahmen einer Konzentrationskurve Thrombinkonzentrationen bis 100 IE/ml eingesetzt.

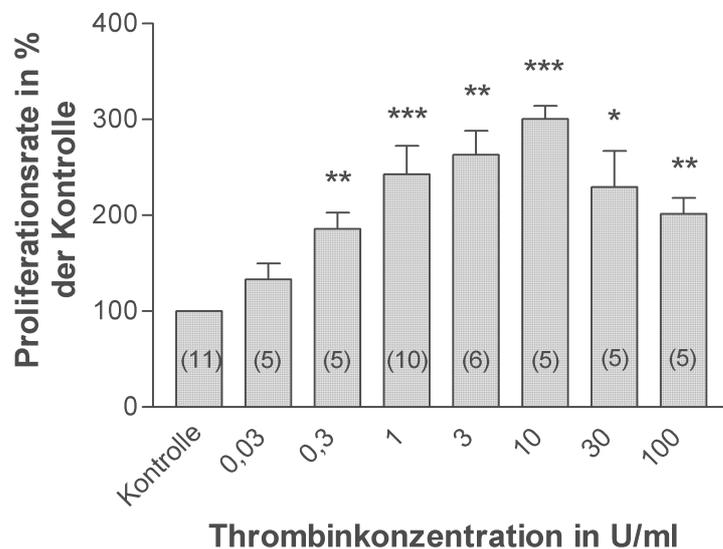


Abb.2: Konzentrationsabhängige Stimulation der Proliferation von MC3T3-E1-Zellen mit Thrombin

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden mit serumfreiem Medium (Kontrolle) oder Thrombin in Konzentrationen von 0,03 bis 100 U/ml stimuliert, nach 9 Stunden der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNA jeweils 18 Stunden später gestoppt (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=5-11$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t -Test (Vergleich zur Kontrolle), * $p=0,05$, ** $p=0,01$, *** $p=0,005$

Die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen lag nach Stimulation mit 0,03 U/ml Thrombin bei 133 ± 17 % und damit etwas höher als die Kontrolle (s. Abb.2).

Nach Behandlung mit 0,3 U/ml Thrombin war eine signifikante Steigerung auf 186 ± 17 % zu verzeichnen.

Nach Stimulation mit 1 U/ml Thrombin stieg die Proliferationsrate signifikant noch höher auf 243 ± 30 %, bei 3 U/ml Thrombin weiter auf 263 ± 25 %, um bei 10 U/ml Thrombin mit 301 ± 25 % ein Maximum zu erreichen.

Die Proliferationsrate lag nach Stimulation mit 30 U/ml Thrombin bei 229 ± 38 % und 100 U/ml Thrombin bei 201 ± 17 % und damit noch immer signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle, aber unter dem Maximum.

Zusammenfassend betrachtet stellte sich eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach Stimulation der MC3T3-E1-Zellen mit Thrombin dar, wobei die maximale Proliferationsrate bei einer Thrombinkonzentration von 10 U/ml, die halbmaximale zwischen 0,3 und 1 U/ml Thrombin erreicht wurde.

Da bereits mit 1 U/ml Thrombin die Proliferationsrate signifikant auf mehr als das Doppelte der Kontrolle gesteigert war, wurde in allen folgenden Proliferationsversuchen diese Konzentration als Thrombinstandard eingesetzt, anhand dessen die Funktionstüchtigkeit der Zellkulturen und des Thrombins selbst in jedem Einzelversuch überprüft wurde.

5.1.3 Einfluss von Penizillin auf die Thrombinwirkung

Das „Schulte-Koagulum“ enthält zur Infektionsprophylaxe eine hohe Konzentration an Benzylpenizillin, so dass auch dessen Auswirkung auf die Zellproliferation untersucht werden musste.

In Vorversuchen führte die Zugabe von Penizillin in Konzentrationen ab 10^4 IE/ml und mehr zu einer starken Ansäuerung des Mediums und schließlich zum Absterben der Zellenkulturen (Ergebnisse nicht gezeigt). Um eine pH-Wert-bedingte Beeinflussung der Proliferation auszuschließen, wurde für den folgenden Versuch das serumfreie Medium durch 40 mM HEPES gepuffert und damit der pH-Wert bei 7,4 stabil gehalten. Der HEPES-Puffer selbst beeinflusste die Proliferation nicht, so dass dieser auch als Kontrolle mit serumfreiem Medium verwendet werden konnte.

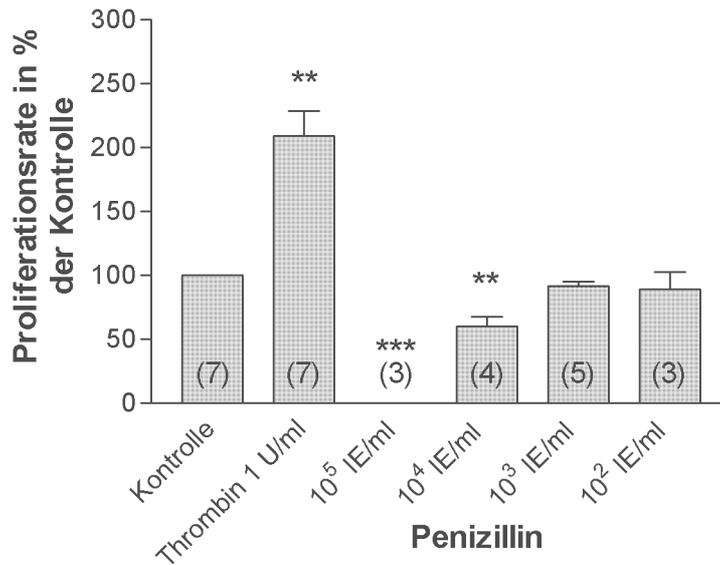


Abb.3: Bestimmung der Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Penizillinkonzentrationen

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden nach 24 Stunden entweder mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Thrombin (1 U/ml) oder Penizillin in Konzentrationen von 10^2 - 10^5 IE/ml inkubiert, wobei das Medium zur pH-Stabilisierung mit 40 mM HEPES gepuffert war. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNA jeweils 18 Stunden später gestoppt (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=3-7$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test (Vergleich zur Kontrolle), ** $p=0,01$, *** $p=0,005$

Zwischen den beiden Kontrollgruppen (serumfreies α -MEM mit und ohne HEPES-Puffer) bestand kein Unterschied (nicht dargestellt).

Die Inkubation mit Penizillin (10^5 IE/ml) führte zum Absterben der MC3T3-E1-Zellen trotz ausreichender Pufferung mit HEPES (pH 7,4); der Zelltod wurde mittels Trypanblau-Färbung verifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Penizillin in einer Konzentration von 10^4 IE/ml bewirkte das Absterben eines Teils der Zellen, die Proliferationsrate lag jedoch mit 60 ± 8 % signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (s. Abb.3).

Penizillinkonzentrationen von 10^3 IE/ml und 10^2 E/ml beeinflussten die basale Proliferation nicht (92 ± 4 % und 89 ± 14 %).

Nachdem der Einfluss von Penizillin auf die basale Proliferationsrate gezeigt worden ist, wurde nun die Penizillinwirkung auf die Thrombin-induzierte Proliferation der MC3T3-E1-Zellen untersucht.

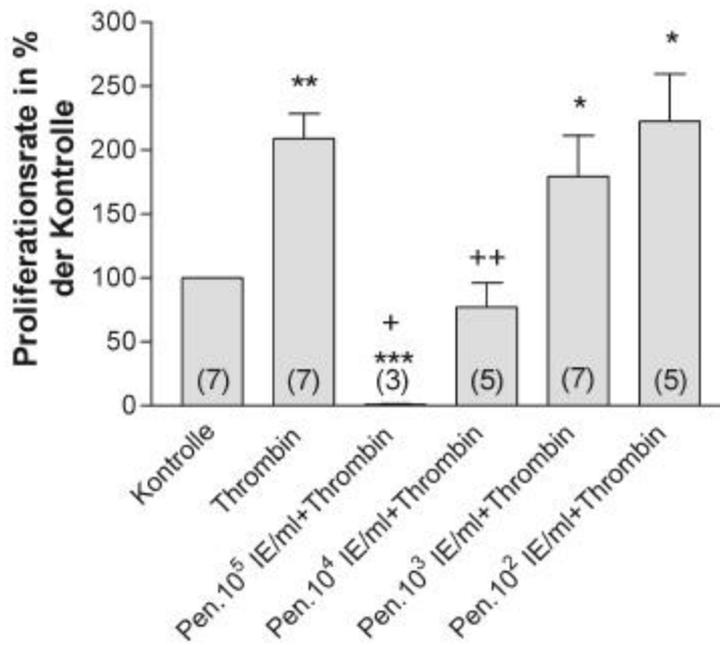


Abb.4: Bestimmung der Proliferationsrate von MC3T3-E1 nach Behandlung mit Penizillin und Thrombin

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden nach 24 Stunden entweder mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Thrombin (1 U/ml) oder Penizillin (10^2 - 10^5 E/ml) +Thrombin (1 U/ml) inkubiert, wobei das Medium zur pH-Stabilisierung mit 40 mM HEPES gepuffert war. Nach 9 Stunden erfolgte die Zugabe des radioaktiven Markers mit [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml), dessen Einbau in die DNA wurde jeweils 18 Stunden später gestoppt (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=3-7$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t -Test im Vergleich zur Kontrolle: * $p=0,05$, ** $p=0,01$, *** $p=0,005$ und im Vergleich zu 1 U/ml Thrombin: + $p=0,05$, ++ $p=0,01$

Die Stimulation mit 1 U/ml Thrombin führte erwartungsgemäß zu einer Steigerung der Proliferationsrate auf 209 ± 19 %.

Die Inkubation mit 10^5 E/ml Penizillin und 1 U/ml Thrombin bewirkte wie bei der alleinigen Penizillingabe in dieser Konzentration das Absterben der Zellen (s. Abb.4).

Bei einer Penizillinkonzentration von 10^4 E/ml und 1 U/ml Thrombin war die Proliferation nur noch unvollständig gehemmt und lag mit 77 ± 19 % wenig unter dem Kontrollniveau.

Nach Stimulation mit 10^3 E/ml Penizillin und 1 U/ml Thrombin lag die Proliferationsrate mit 179 ± 32 % signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der niedrigsten untersuchten Penizillinkonzentration (10^2 E/ml) und 1 U/ml Thrombin lag die Proliferationsrate mit 222 ± 37 % signifikant über der Kontrolle.

Im Vergleich zwischen der alleinigen Stimulation mit 1 U/ml Thrombin war die Proliferation bei Thrombin (1 U/ml) mit 10^5 IE Penizillin und Thrombin (1 U/ml) mit 10^4 IE Penizillin signifikant gehemmt. Nach Stimulation mit 1 U/ml Thrombin und 10^3 sowie 10^2 IE Penizillin näherte sich die Proliferationsrate dem Thrombinstandard an, die penizillinbedingte Proliferationshemmung war aufgehoben.

5.1.4 Einfluss löslicher Bestandteile variierter „Schulte-Koagula“ auf die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen

Nachdem in den bisherigen Versuchen der Einfluss der einzelnen Komponenten des „Schulte-Koagulums“ auf die Zellproliferation von MC3T3-E1 gezeigt worden ist, musste nun untersucht werden, welchen Effekt die sich aus dem Koagulum lösenden Stoffe auf die Proliferationsrate haben. Hierzu wurde das „Schulte-Koagulum“ miniaturisiert und in seiner Zusammensetzung aus Vollblut, Penizillin, Thrombin und Gelaspon[®]-Schwamm variiert. Die Gewinnung steriler Überstände, mit denen die Zellkulturen inkubiert wurden, erfolgte durch Überführen der Koagula in eine physiologische Badlösung, von der nach 5, 30 und 60 min definierte Volumina (s. 4.2.3) entnommen und zentrifugiert wurden. Zur Inaktivierung des enthaltenen Thrombins wurde Hirudin im Überschuss (10 U/ml Hirudin auf 1 U/ml Thrombin) zugesetzt.

Zunächst sollte der Einfluss des Gelaspon[®]-Schwammes auf die Proliferation der Zellkulturen untersucht werden. Hierzu wurde dieser ebenso wie die Koagula in eine Badlösung gebracht (s. 4.2.3) und mit dem Überstand die MC3T3-E1-Zellen inkubiert.

Um eine Beeinflussung der Proliferation durch Hirudin selbst ausschließen zu können, erfolgte die Inkubation der Zellen mit Hirudin (10 U/ml). Dass durch Hirudin Thrombin wirksam blockiert wird, konnte im folgenden Versuch ebenfalls gezeigt werden.

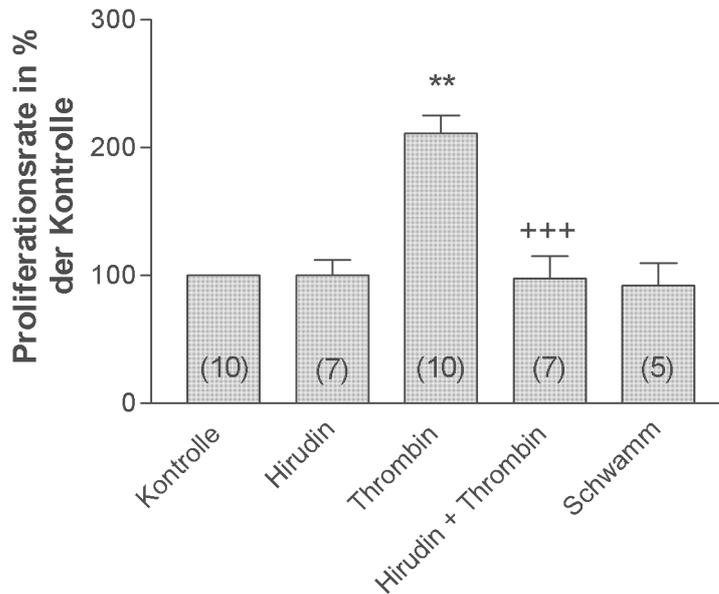


Abb.5: Hirudinwirkung und Einfluss des Gelaspon[®]-Schwammes auf die Proliferation von MC3T3-E1-Zellen

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden nach 24 Stunden entweder mit physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), Hirudin (10 U/ml), Thrombin (1 U/ml), Hirudin (10 U/ml) mit Thrombin (1U/ml) oder dem Überstand des in Lösung gebrachten Gelaspon[®]-Schwammes inkubiert. Nach 9 Stunden erfolgte die Zugabe des radioaktiven Markers [³H]-Thymidin (0,5 µCi/ml), dessen Einbau in die DNA jeweils 18 Stunden später gestoppt wurde (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. n=5-10, arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle, **p=0,01 und Vergleich von Thrombin mit Thrombin und Hirudin +++p=0,005

Der in Abb. 5 dargestellte Versuch zeigt, dass Hirudin (10 U/ml) keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen hatte (100 ± 12 %).

Thrombin (1 U/ml) führte erwartungsgemäß etwa zu einer Verdoppelung der Proliferationsrate auf 211 ± 14 %.

Nach Stimulation mit dem für 5 Minuten in Gegenwart von Hirudin (10 U/ml) vorinkubierten Thrombin (1U/ml) lag die Proliferationsrate mit 98 ± 17 % wieder im Kontrollniveau. Die Thrombinwirkung ließ sich durch das im 10fachen Überschuss zugesetzte Hirudin vollständig blockieren.

Im Überstand des in physiologische Kochsalzlösung überführten Gelaspon[®]-Schwammes gab keine Substanzen, die die Proliferation beeinflussten (93 ± 17 %).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in allen weiteren Versuchen mit Überständen von Koagula, die Thrombin enthielten, letzteres jeweils durch 10 U/ml Hirudin blockiert.

Im folgenden Versuch wurde geprüft, welchen zeitabhängigen Einfluss die aus den Koagula gelösten Stoffe auf die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen hatten.

Tab.1: Zeitabhängiger Einfluss löslicher Bestandteile variiertes „Schulte-Koagula“ auf die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen in % der Kontrolle

| | 5'-Überstand | 30'-Überstand | 60'-Überstand |
|--|--------------|---------------|---------------|
| Blut+Schwamm | 142 ± 22 | 200 ± 38 | 109 ± 21 |
| Blut+Schwamm+ Hirudin 10 U/ml | 93 ± 17 | 178 ± 50 | 144 ± 19 |
| Blut+Schwamm+ Thrombin 1 U/ml | 162 ± 22 | 310 ± 95 | 125 ± 21 |
| Blut+Schwamm+ Thrombin 1 U/ml+ Hirudin 10 U/ml | 113 ± 19 | 235 ± 50 | 147 ± 39 |

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden nach 24 Stunden entweder mit serumfreiem Medium (Kontrolle, nicht dargestellt) oder den Überständen von Blut-Schwamm-Koagula mit oder ohne Thrombin (1 U/ml) und Hirudin (10 U/ml) inkubiert (s. 4.2.3). Thrombin und Hirudin wurden für die Blut-Schwamm-Thrombin-Hirudin-Koagula 5 min vorinkubiert. Nach 9 Stunden erfolgte die Zugabe des radioaktiven Markers [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml), dessen Einbau in die DNA jeweils 18 Stunden später gestoppt wurde (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. n=3, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, keine signifikanten Unterschiede

Wie in Tabelle 1 dargestellt führte der nach 5 Minuten entnommene Überstand des blutgetränkten Schwammes zu einer nicht signifikanten Proliferationszunahme auf 142 ± 22 %, während der 30minütige Überstand mit 200 ± 38 % eine Verdoppelung der Proliferationsrate bewirkte, ohne jedoch das Thrombinniveau zu erreichen..

Die Inkubation mit dem nach 60 Minuten entnommenen Überstand beeinflusste die Proliferation nicht (109 ± 21 %).

Die Stimulation mit dem 5-Minuten-Überstand eines Blut-Schwamm-Hirudin-Koagulums führte zu keiner Proliferationssteigerung (93 ± 17 %).

Der 30-Minuten-Überstand erhöhte die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen (178 ± 50 %) nicht signifikant.

Nach Stimulation mit dem 60-Minuten-Überstand eines Blut-Schwamm-Hirudin-Koagulums war ebenfalls eine Proliferationssteigerung zu verzeichnen, die jedoch mit 144 ± 19 % weniger deutlich ausfiel.

Die Stimulation mit dem 5-Minuten-Überstand eines Blut-Schwamm-Thrombin-Koagulums steigerte die Proliferation mit 162 ± 22 %; nach Inkubation mit dem 30-min-Überstand stieg die Proliferationsrate auf das Dreifache (310 ± 95 %) des Kontrollwertes.

Der nach 60 min gewonnene Überstand stimulierte die Proliferation mit 125 ± 21 % nur wenig über Kontrollniveau.

Die Stimulation mit dem 5-Minuten-Überstand der Blut-Schwamm-Thrombin-Hirudin-Koagula beeinflusste die Proliferationsrate nicht (113 ± 19 %).

Der 30-min-Überstand führte mit 235 ± 50 % zu einer nicht signifikanten Verdoppelung der Proliferation.

Die Stimulation mit dem 60-Minuten-Überstand hatte ebenfalls einen proliferationsfördernden Effekt, der mit 147 ± 39 % aber weniger deutlich war.

Zusammenfassend betrachtet bewirkte bei den 5-Minuten-Überständen nur das Blut-Schwamm-Thrombin-Koagulum eine merkliche, jedoch nicht signifikante Proliferationssteigerung. Dieser Thrombin-bedingte Effekt war durch die Anwesenheit von Hirudin im Koagulum hemmbar.

Der 30-Minuten-Überstand führte bei allen Variationen des Koagulums zu einer nicht signifikanten Proliferationssteigerung, die für das Blut-Schwamm-Thrombin-Koagulum am deutlichsten ausfiel. Bei Anwesenheit von Hirudin in den Koagula fiel die Proliferationssteigerung tendenziell geringer aus.

Mit den 60-Minuten-Überständen waren keine nennenswert gesteigerten Proliferationsraten nachweisbar.

5.2 Einfluss freigesetzter Thrombozyteninhaltsstoffe auf die Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen

5.2.1 Stimulation mit dem Überstand von Thrombozyten, präpariert durch Zentrifugation nach Greinacher

Nachdem im Rahmen der vorangegangenen Versuche insbesondere der Einfluss der pharmakologisch definierten primär wirksamen Bestandteile des „Schulte-Koagulums“ auf die Proliferation im Zellkulturmodell untersucht worden war, sollte nun speziell die Rolle der Blutplättchen charakterisiert werden. Die Isolierung menschlicher Thrombozyten aus dem Blut gesunder Spender erfolgte entsprechend einer in der Plättchenforschung etablierten Methode modifiziert nach Greinacher et al. (Martinson et al. 1998) wie im Kapitel 4.2.8 beschrieben.

Der Puffer, in dem die Plättchen suspendiert waren, wurde als Kontrolle verwendet und auch Thrombin und Hirudin darin gelöst. Zwischen den Kontrollen mit Suspensionspuffer und serumfreiem Zellkulturmedium gab es keinen Unterschied bezüglich der Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen (Ergebnis nicht gezeigt).

Die präparierten Blutplättchen wurden entweder mit Suspensionspuffer (Plättchen unstimuliert) oder Thrombin (1 U/ml) 5 Minuten inkubiert (Plättchen stimuliert) und die Überstände durch Zentrifugation abgetrennt. Um das darin noch vorhandene Thrombin funktionell zu blockieren, erfolgten bei der einen Hälfte der Proben die Inkubation mit Hirudin (10 U/ml) für 5 Minuten, bei der anderen mit Suspensionspuffer und gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Mit den dadurch gewonnenen Überständen wurden die Zellkulturen stimuliert.

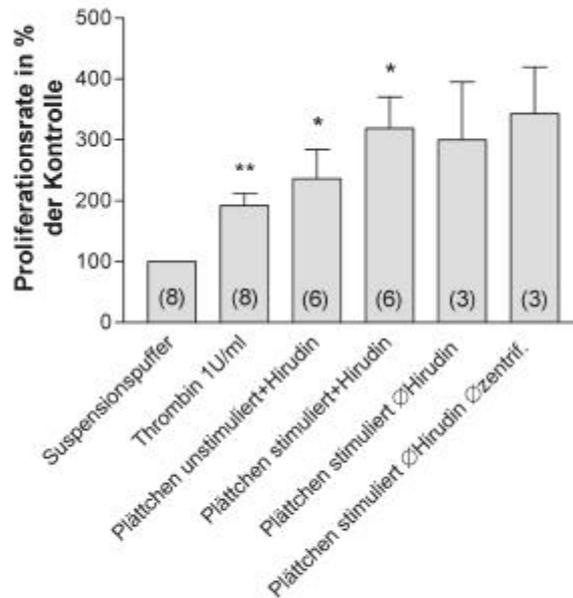


Abb.6: Bestimmung der Proliferation von MC3T3-E1-Zellen nach Stimulation mit Überständen von Thrombozyten (Präparation nach Greinacher)

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden mit dem Überstand unstimulierter und stimulierter Plättchen behandelt, mit und ohne Bindung des Thrombins (1 U/ml) mittels Hirudin (10 U/ml), mit und ohne abschließende Zentrifugation (s. 4.2.8). Nach 9 Stunden erfolgte die Zugabe des radioaktiven Markers [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml), dessen Einbau in die DNA 18 Stunden später gestoppt wurde (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=3-8$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle mit Suspensionspuffer, * $p=0,05$, ** $p=0,01$

Wie in Abb.6 gezeigt führte die Stimulation mit Thrombin (1 U/ml) mit 192 ± 20 % erwartungsgemäß zur Verdoppelung der Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Nach Inkubation mit Hirudin (10 U/ml) lag die Proliferation mit 121 ± 11 % etwa im Kontrollniveau.

Überraschenderweise führte die Zugabe des unstimulierten Überstandes von Thrombozyten in Anwesenheit von Hirudin (10 U/ml) zu einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen auf 236 ± 48 %, die damit sogar über dem Thrombinstandard lag.

Der Überstand stimulierter Plättchen mit Hirudin (10 U/ml) führte zu einer signifikanten

Proliferationssteigerung auf das Dreifache der Kontrolle ($319 \pm 52 \%$) und deutlich über Thrombinniveau.

Etwa gleich hoch stiegen die Proliferationsraten nach Zugabe des Überstandes stimulierter Plättchen ohne Hirudin ($300 \pm 96 \%$) und des Überstandes stimulierter Thrombozyten, die nicht zentrifugiert wurden und in dem kein Hirudin anwesend war ($343 \pm 77 \%$).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Überstand isolierter menschlicher Blutplättchen, die durch verschiedene Zentrifugationschritte präpariert wurden, einen stark proliferationsfördernden Reiz auf MC3T3-E1-Zellen ausübt, und zwar unabhängig davon, ob die Plättchen stimuliert wurden.

5.2.2 Stimulation mit dem Überstand von Thrombozyten, präpariert durch Gelfiltration

Da bei den Stimulationsversuchen mit Thrombozyten aus der modifizierten Präparation nach Greinacher bereits ein proliferationsfördernder Effekt auf die Zellkulturen mit dem Überstand nicht stimulierter Plättchen festzustellen war und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dieser durch eine zentrifugationsbedingte Voraktivierung der Plättchen oder Bildung von Mikropartikeln bedingt war, wurde zum Vergleich eine andere Präparationstechnik mittels Gelfiltration angewendet.

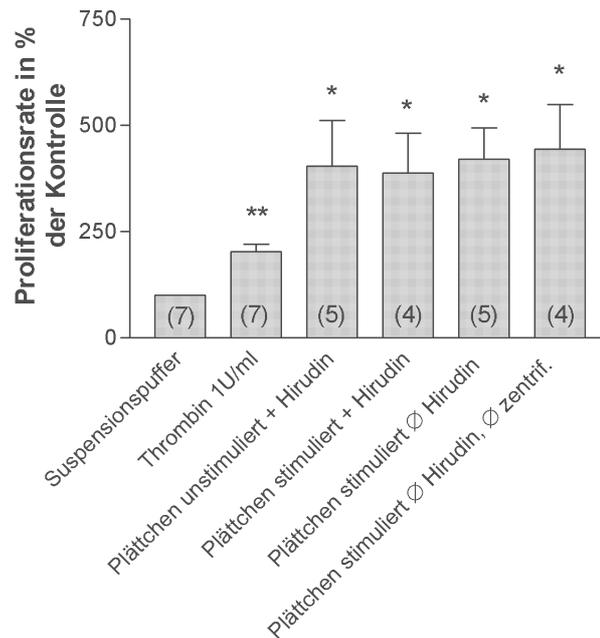


Abb.7: Bestimmung der Proliferation von MC3T3-E1-Zellen nach Stimulation mit Überständen von Thrombozyten (Präparation durch Gelfiltration)

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden mit dem Überstand unstimulierter und stimulierter durch Gelfiltration präparierter Plättchen inkubiert, mit und ohne Bindung des Thrombins (1 U/ml) mittels Hirudin (10 U/ml), mit und ohne abschließende Zentrifugation (s. 4.2.8). Nach 9 Stunden erfolgte die Zugabe des radioaktiven Markers [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml), dessen Einbau in die DNA 18 Stunden später gestoppt wurde (s.4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelexperimente ist in Klammern angegeben $n=3-7$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t -Test im Vergleich zur Kontrolle, * $p=0,05$, ** $p=0,01$

Wie in Abb.7 dargestellt führte Thrombin 1 U/ml auch in diesem Versuch zu einer signifikanten Proliferationssteigerung auf das Doppelte der Kontrolle (204 ± 16 %).

Die Inkubation mit Hirudin (10 U/ml) hatte keinen Einfluss auf die Proliferationsrate (109 ± 4 %).

Wie im schon vorherigen Versuch bewirkte bereits die Zugabe des unstimulierten Plättchenüberstandes + 10 U/ml Hirudin eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate auf 404 ± 107 %, die damit sogar doppelt so hoch wie die der Thrombinkontrolle war.

Der Überstand stimulierter Plättchen + 10 U/ml Hirudin führte ebenfalls zu einer signifikanten Proliferationssteigerung auf das Vierfache der Kontrolle ($389 \pm 93 \%$).

Auf etwa gleichem Niveau befanden sich die Proliferationsraten nach Zugabe des stimulierten Plättchenüberstandes ohne Hirudin ($421 \pm 73 \%$) und des nicht zentrifugierten Überstandes ohne Hirudin ($444 \pm 105 \%$).

Die Stimulationsversuche mit den Thrombozyten haben gezeigt, dass nach Ausschaltung der Thrombinwirkung ein überraschender weise stark proliferationsfördernder Effekt von den Plättchen selbst ausgeht, und zwar unabhängig davon, ob diese zuvor aktiviert wurden oder nicht.

5.2.3 Einfluss definierter, aus aktivierten Thrombozyten freigesetzter Substanzen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass der durch Zentrifugation gewonnene Überstand stimulierter und nicht stimulierter Thrombozyten stark proliferationsfördernd auf MC3T3-E1-Zellen wirkt. Um herauszufinden, welche der zahlreichen in Thrombozytengranula vorkommenden Stoffe zu diesem Effekt beitragen, sind im folgenden Versuch die vermutlich für die Proliferation wichtigsten untersucht worden. Anstelle des instabilen Thromboxan-A₂ wurde das stabile Analogon U 46619 eingesetzt.

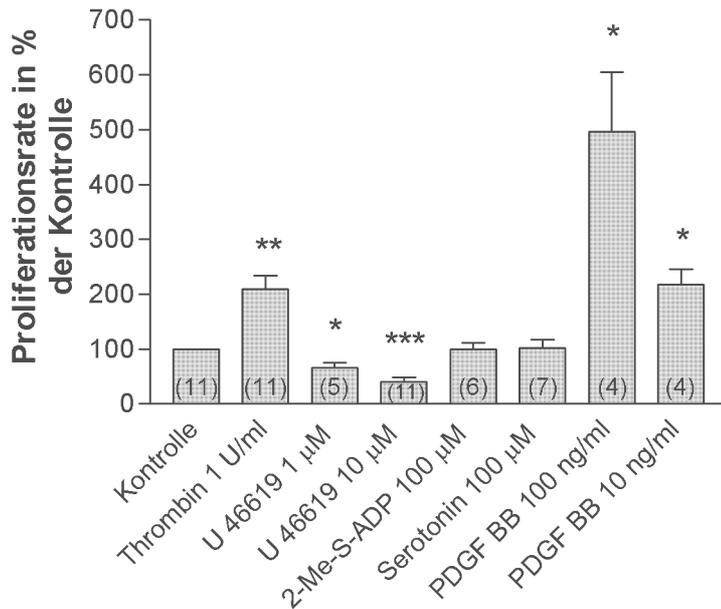


Abb.8: Stimulierbarkeit der Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen mit Plättcheninhaltsstoffen bzw. stabilen Analoga

Die vorbereiteten MC3T3-E1-Zellen (s. 4.2.1) wurden lt. Schema inkubiert, nach 9 Stunden der radioaktive Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNA nach 18 Stunden gestoppt (s. 4.2.2). Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelexperimente ist in Klammern angegeben $n=4-11$, arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle, * $p=0,05$, ** $p=0,01$, *** $p=0,005$

Die Stimulation von Zellkulturen mit Thrombin (1 U/ml) führte zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation auf 209 ± 24 % gegenüber der Kontrolle (s. Abb.8).

Nach Inkubation mit dem stabilen Thromboxan-A₂-Analogon U 46619 (1 μ M) war die Proliferation mit 66 ± 9 % signifikant gehemmt, ein Effekt, der bei U 46619 (10 μ M) noch deutlicher ausfiel (41 ± 7 %).

Serotonin 100 μ M und 2-Methyl-Thio-ADP beeinflussten die Proliferationsrate nicht (100 ± 12 % und 102 ± 15 %).

Mit PDGF BB war eine signifikante Proliferationssteigerung zu verzeichnen, die für 10 ng/ml das Doppelte (218 ± 27 %) und bei 100 ng/ml (496 ± 108 %) sogar das Fünffache der Kontrolle betrug.

Thromboxan A₂ kommt in dem untersuchten System eine stark proliferationshemmende Wirkung zu, während PDGF BB die Proliferationsrate konzentrationsabhängig weit über das Thrombinniveau hinaus zu steigern vermag.

6. Diskussion

Ausgangspunkt für die Entwicklung des „Schulte-Koagulums“ war der Wunsch nach einem primären Wundverschluss größerer intraoraler Knochendefekte wie zum Beispiel nach der Ausschälung von Zysten, um eine Primärheilung mit knöcherner Regeneration zu erzielen. Da Wunden in der Mundhöhle auf Grund der physiologischen Keimbesiedlung als sauber kontaminiert eingestuft wurden, empfahlen Schulte (1959) und andere Autoren, z.B. Fröhlich (1957), eine lokale und ggf. gleichzeitige systemische Antibiotikaphylaxe, wobei Penizillin G das Medikament der ersten Wahl war. Lokal angewendet, verursachte Penizillin G jedoch bei Konzentrationen von über 7500 IE/ml (Schulte 1960a) eine vollständige Ungerinnbarkeit des Blutes, so dass die Ausbildung eines Koagulums ausblieb. In dem Artikel: „Die Hemmung der Blutgerinnung bei lokaler Penicillinanwendung und ihre Verhütung“ gab Schulte (1960a) daher folgendes an:

„...1. Bei der lokalen Penicillinanwendung in der notwendigen hohen Dosierung ist in der nahtverschlossenen Wunde mit einer zeitlich unkontrollierbaren Verzögerung der Blutgerinnung und den entsprechenden ungünstigen Folgen für Wundheilung und Regeneration zu rechnen.

2. Um die Blutgerinnung zu normalisieren, sind lokale, blutgerinnungsfördernde Zusätze angezeigt.

3. Die Verhütung der penicillinbedingten Gerinnungsstörung kann erfolgen:

a) durch gleichzeitiges Ausfüllen des Defektes mit Gelatineschwamm, der in trockenem, nicht komprimiertem Zustand eingebracht werden und den Defekt möglichst vollständig ausfüllen muß,

b) durch Zusatz von Thrombin, das die penicillinbedingte Störung der Fibrinbildung verhindert oder herabsetzt,

c) als zweckmäßigste Form durch Zusatz von Gelatineschwamm und Thrombin. Dabei ist zu beachten, dass der Thrombinzusatz erst erfolgt, wenn große Teile des Defektes bzw. des Gelatineschwammes vollgeblutet sind. ...“

Schulte (1959) empfahl die Zugabe von einer Einheit Thrombin pro 10.000 Einheiten Penizillin und die Stabilisierung des Koagulums durch denaturierten Gelatineschwamm. In umfangreichen experimentellen Untersuchungen konnte belegt werden (Schulte 1964), dass dadurch die Festigkeit des Gerinnsels erhöht und die Retraktion verhindert wurden.

Infolge dessen blieb das Koagulum wandständig und konnte von allen Seiten her organisiert werden, worin Schulte die Ursache für die hohe Primärheilungsrate sah. Zur praktischen Anwendung gab Schulte (1960b) folgende Anleitung:

Zur Füllung großer Defekte wurde dem Patienten Venenblut entnommen und in ein steriles Porzellanschälchen überführt, in dem sich bereits das zur lokalen Anwendung vorgesehene Antibiotikum und Gelatineschwammstückchen befanden. Mit einem sterilen Instrument erfolgte die Durchmischung bis sich die Schwämmchen mit dem Blut-Antibiotikum-Gemisch vollgesaugt hatten. Durch Zugabe des Thrombins wurde die Koagulation eingeleitet, jedoch nicht abgewartet und der Defekt vollständig mit den Schwammstückchen ausgefüllt. Abschließend erfolgte der dichte Nahtverschluss der Weichgewebe.

In Anlehnung an diese Vorgaben wird das „Schulte-Koagulum“ auch in der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg seit Jahrzehnten erfolgreich angewendet. Die Vorteile dieser einfach und kostengünstig realisierbaren Behandlungsmethode liegen in der hohen Primärheilungsrate mit knöcherner Regeneration der Defekte, so dass auf die Anwendung von alloplastischen Knochenersatzmaterialien und Transplantation von autologem oder homologem Knochen verzichtet werden kann (Maurer et al. 2002). Das „Schulte-Koagulum“ stellt damit nach dem heutigen Wissensstand eine osteoinduktive Methode dar, die den Vergleich mit moderneren Knochenregenerationsverfahren nicht zu scheuen braucht.

Die erfolgreiche klinische Anwendung bei der spezifischen Zusammensetzung aus Blut, Penizillin, denaturiertem Gelatineschwamm und Thrombin macht das „Schulte-Koagulum“ jedoch auch für die aktuelle Forschung interessant.

Während Schulte entsprechend des damaligen Wissensstandes in der mechanischen Stabilität die Ursache des Erfolges sah, weiß man heute, dass Thrombin weit mehr als nur ein Gerinnungsfaktor ist. Thrombin kann durch Rezeptorstimulation die Signaltransduktion einer Vielzahl von Zellen, insbesondere aber Thrombozyten aktivieren (Gawaz 1999), die selbst wiederum proliferationsfördernde Faktoren freisetzen.

Im „Schulte-Koagulum“ kommt es vermutlich zu einer Summation mehrerer die Knochenheilung begünstigender Mechanismen, insbesondere bedingt durch Thrombin. Es bewirkt zusätzlich zu der von Schulte (1960b) nachgewiesenen mechanischen Stabilisierung des Koagulums eine primäre Proliferationsförderung der Osteoblasten und

durch die Aktivierung der Thrombozyten eine sekundäre Freisetzung proliferationsfördernder Substanzen. Zur genaueren Charakterisierung dieser Zusammenhänge war eine wissenschaftliche Reevaluierung dieser Methode notwendig.

Zunächst wurden die Einzelkomponenten des „Schulte-Koagulum“ und deren Kombinationen auf ihren proliferationsfördernden Einfluss im Zellkulturmodell geprüft. Da der Ausgangspunkt zur Entwicklung des „Schulte-Koagulum“ die lokale Antibiotikaphylaxe war, wurde als erstes die Wirkung von Penizillin innerhalb des Testsystems betrachtet.

Das Produkt des Pilzes *Penicillium chrysogenum* wird in Deutschland seit 1944 industriell hergestellt und auf Grund seiner biologischen Breite und guten Verträglichkeit (Hotz und Singer 1985) noch immer häufig angewendet.

Bei dentogenen pyogenen Infektionen handelt es sich praktisch immer um aerob-anaerobe Mischinfektionen mit 3-6 Keimen (Al-Nawas et al. 2002), wobei für Anaerobier Resistenzquoten von bis zu 50 % angegeben werden (Piesold et al. 1999, Buff et al. 2001). Eckert (2004) fand im Patientengut der Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vergleichsweise sehr niedrige Resistenzquoten bei Erregern odontogener Infektionen und empfiehlt daher für unsere Region auch zum gegenwärtigen Zeitpunkt Penizillin G/V zur kalkulierten Therapie als ergänzende Maßnahme zur chirurgischen Entlastung. Im Rahmen von prophylaktischen Anwendungen wird das oral zu applizierende Phenoxymethylpenizillin bezüglich Resorption und Wirksamkeit gegenüber dem parenteral verabreichten Benzylpenizillin als gleichwertig betrachtet (Naber et al. 1998). So erscheint die von Schulte (1960a) angegebene Penizillin-Prophylaxe einer Wundinfektion bei intraoralen Eingriffen mit Bildung größerer Knochendefekte auch heute noch aktuell.

Penizillin, das 1928 von Alexander Fleming entdeckte β -Lactam-Antibiotikum, hemmt das Wachstum grampositiver Bakterien, indem es deren Mureinsynthese und damit die Ausbildung der Zellwand verhindert. Hieraus wird verständlich, warum Penizilline selektiv auf Bakterienzellen und nicht auf tierische Zellen wirken, die keine Zellwand sondern eine Zellmembran besitzen. Daher war in unserem Zellkulturmodell keine Proliferationshemmung zu erwarten.

Bereits 1960 stellte Schulte allerdings fest, dass die lokale Anwendung von Penizillin G zu einer deutlichen Verlängerung der Gerinnungszeit führt und bei Konzentrationen über 7500 E/ml das Blut ungerinnbar wird (Schulte 1960a). Die Ursache dafür ist einerseits die Hemmung der Plättchenaggregation, andererseits wird die Fibrinogen-Fibrin-

Umwandlung, also die Koagulation, durch Penizillin gestört (Adam et al. 1999). Dieses Phänomen war vor Schulte bereits bekannt; eine Ungerinnbarkeit des Blutes wurde z.B. von Flemming und Fish (1947) für Penizillinkonzentrationen von 25.000 E/ml Blut angegeben und von Matis et al. (1951) mit 60.000 E/ml beziffert.

Neben der hier angeführten Gerinnungshemmung verursachte Penizillin in den eigenen Untersuchungen ab einer Konzentration von 10.000 IE/ml und mehr auch einen toxischen Effekt auf die MC3T3-E1-Zellen, welcher sich in einer signifikant verringerten Proliferationsrate widerspiegelte (s. Abb. 3). Bei Stimulation mit 100.000 IE/ml Penizillin kam es sogar zum Absterben der Zellen, wie mit Hilfe der Trypanblau-Färbung nachgewiesen werden konnte.

Vorversuche hatten gezeigt, dass Penizillin in diesen hohen Konzentrationen auch zu einer starken Ansäuerung des Mediums führt, die allein schon die Zellproliferation beeinflussen kann. Um eine pH-bedingte Proliferationshemmung auszuschließen, wurde das Medium ausreichend mit HEPES gepuffert und damit der pH-Wert bei 7,4 stabil gehalten. Eine Verminderung der Proliferationsrate war aber auch unter diesen Bedingungen nachweisbar. Penizillinkonzentrationen von 1.000 IE/ml und weniger hatten keinen Einfluss auf die MC3T3-E1-Zellen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass Penizillin in Konzentrationen von mindestens 10.000 IE/ml, wie sie im „Schulte-Koagulum“ verwendet werden, proliferationshemmend wirkt, da es zytotoxisch ist und eine pH-Verschiebung ins saure Milieu verursacht. Weil aber bei der Anwendung des „Schulte-Koagulums“ eine hohe Spontanheilungsrate zu verzeichnen ist, wird die durch Penizillin verursachte Proliferationshemmung durch andere Mechanismen kompensiert, die nachfolgend dargestellt werden.

Da Schulte (1960a) zum Ausgleich der Penizillin-bedingten Gerinnungshemmung den Zusatz von einer Einheit Thrombin pro 10.000 Einheiten Penizillin empfahl, wurde der Einfluss von Thrombin auf die Proliferationsrate der MC3T3-E1-Zellen und auf die Penizillinwirkung untersucht.

Thrombin wird in der Leber synthetisiert und gehört zu den Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren. Es liegt im Blutplasma als Prothrombin in Konzentrationen von 60-100 mg/l vor. In der Endreaktion der Gerinnungskaskade wird diese inaktive Form (GF II) durch Prothrombinase aktiviert, es entsteht Thrombin (GF IIa), das Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Durch positive Rückkopplung kann Thrombin die eigene Aktivierung verstärken. Es aktiviert außerdem zellständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und

damit die Signaltransduktion einer Vielzahl von Zellen einschließlich Thrombozyten (Gawaz 1999) und ist einer der potentesten physiologischen Thrombozytenaktivatoren.

In der Zahnmedizin wurde Thrombin in der Vergangenheit hauptsächlich als Hämostyptikum eingesetzt, das bei lokaler Applikation die körpereigene Koagulation unterstützt, wobei lösliches Fibrinogen vorhanden sein muss. In diesem Sinne hat Schulte (1960a) die Verwendung von Thrombin zur Wiederherstellung der Penizillin-bedingten Koagulationshemmung angegeben.

Auch osteoblastenartige Zellen besitzen Thrombinrezeptoren (Pagel et al. 2003, Abraham et al. 1999), die zu den so genannten Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR1-4) zählen. Durch die Protease Thrombin wird das N-terminale Ende des Rezeptors abgespalten und somit der Rezeptor irreversibel aktiviert. Noch vor Entdeckung der PAR-Rezeptoren haben Suzuki et al. (1996) gezeigt, dass MC3T3-E1-Zellen durch Thrombin über den Signaltransduktionsschritt der Phospholipase-D-Aktivierung stimuliert werden. Durch den Gq-Protein-gekoppelten PAR-1-Rezeptor wird die Thrombin-induzierte Proliferation von Osteoblasten vermittelt, aber auch die Thrombozytenaggregation (Sagel et al. 2005).

Die Existenz G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wurde bereits 1977 von Rodbell et al. anhand der GTP-modulierbaren, Glucagon-abhängigen Aktivierung der Adenylatzyklase aus Rattenleber entdeckt. Es handelt sich dabei um in die Zellmembran eingelagerte Rezeptorproteine, die durch Ligandenbindung eine Konformationsänderung erfahren, die intrazellulär eine Wechselwirkung mit trimeren G-Proteinen (α -, β - und γ -Untereinheiten) hervorruft. Nach Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit löst sich diese vom Rezeptor und dem $\beta\gamma$ -Komplex, die unterschiedlich mit verschiedenen Effektoren und Ionenkanälen interagieren können und so das primäre Signal weiterleiten (Grauschopf 2000).

Die durch Thrombin über den PAR1-Rezeptor vermittelte MC3T3-E1-Proliferation wurde in den eigenen Versuchen mit Thrombinkonzentrationen von 0,03 bis 100 U/ml geprüft. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Thrombin konzentrationsabhängig die Proliferation der osteoblastenartigen Zellen stimuliert (s. Abb. 2). Bei Konzentrationen ab 0,3 U/ml ist im Vergleich zur Kontrolle mit serumfreiem Medium eine signifikante Proliferationssteigerung nachweisbar und ein Maximum bei 10 U/ml mit einer Erhöhung auf das Dreifache erreicht. Höhere Thrombinkonzentrationen von bis zu 100 U/ml bewirken eine signifikante, jedoch submaximale Proliferationssteigerung. Ähnliche Ergebnisse wurden von Seher (2004) an der gleichen Zelllinie gezeigt, jedoch führten hier Thrombinkonzentrationen von 0,5 bis 18 U/ml zu einer Steigerung der

Zellproliferation auf maximal 140 % bei 4,5 U/ml Thrombin gemessen mittels Bromodesoxyuridin-Proliferationstest. Tatakis et al. (1989, 1991) fanden einen fördernden Effekt von Thrombin auf Osteoblasten bei einer Konzentrationsreihe von 0,5-16 U/ml mit einem Maximum bei 8 U/ml; hingegen beobachteten Gandossi et al. (2000) an einem ähnlichen Zellkulturmodell mit Hamsterfibroblasten (CCL39) eine maximale Zellproliferation bei Stimulation mit 36 U/ml Thrombin.

Übereinstimmend kann festgestellt werden, dass in allen o.g. Untersuchungen eine Thrombinkonzentration von 1 U/ml Thrombin, so wie sie auch in unseren Stimulationsversuchen eingesetzt wurde, zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsrate der MC3T3-E1-Zellen führte.

Nachdem der Einfluss von Thrombin allein auf die Proliferationsrate gezeigt werden konnte, sollte der Effekt von Penizillin auf die Thrombinwirkung diskutiert werden. In den eigenen Untersuchungen führte die Inkubation mit 100.000 IE/ml Penizillin und 1 U/ml Thrombin ebenso zum Absterben der MC3T3-E1-Zellen wie nach alleiniger Penizillinbehandlung (s. Abb. 4). Bei einer 10fach geringeren Penizillinkonzentration und 1 U/ml Thrombin war die Proliferation noch unvollständig, jedoch signifikant auf 77 % der Kontrolle gehemmt, das heißt der proliferationshemmende Effekt des Penizillins konnte durch Thrombin nicht aufgehoben werden. Penizillin in Konzentrationen unter 10.000 IE/ml hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen; so dass bei gleichzeitiger Stimulation mit 1 U/ml Thrombin die Proliferationsrate im Niveau der Thrombinkontrolle lag.

Bei der klinischen Anwendung des „Schulte-Koagulums“ werden in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entsprechend der derzeit verfügbaren Arzneimittelabpackungen 1 Million IE Penizillin pro 5 ml Blut angewendet, also 200.000 IE pro ml. Demnach muss bei einer solch hohen Penizillinkonzentration von einer proliferationshemmenden Wirkung zumindest theoretisch ausgegangen werden. Es erscheint eine Konzentrationsverringering sinnvoll und dem angestrebten antibakteriellen Effekt nicht abträglich.

Als weiterer Bestandteil des „Schulte-Koagulums“ wurde der denaturierte Gelatineschwamm (Gelaspon[®]) auf seine Beeinflussung der Proliferationsrate untersucht. Die medizinische Anwendung von Kollagen- und Gelatineschwämmen ist weit verbreitet. Sie dienen zur lokalen Blutstillung, zur Tamponade chirurgischer Wunden und wegen des

Volumeneffektes zur Auffüllung von Gewebedefekten nach operativen Eingriffen oder Zahntfernungen.

Die im Gelaspon[®]-Schwamm enthaltene Gelatine ist ein Hydrokolloid, das zu über 80 % aus Protein, ansonsten aus Wasser und Mineralsalzen besteht. Man gewinnt sie durch Abbau kollagenhaltiger Bindegewebe. Bei dem von uns angewendeten Präparat handelt es sich um einen gefriergetrockneten Schaum aus denaturierter Gelatine, die durch Partialhydrolyse von Kollagen aus Schweineschwarten gewonnen wird. Durch dieses Herstellungsverfahren überführt man das Kollagen in wasserlösliche Gelatine und vernetzt die Gelatinestränge durch Zusatz von 0,25 %iger Formaldehyd-Lösung, welches im weiteren Verlauf wieder entfernt wird. Durch die Härtung mit Formaldehyd erhält der Schwamm seine Stabilität, die unter anderem verhindert, dass er sich unter dem Zug des in ihm retrahierenden Gerinnsels zusammenzieht (Schulte 1964).

Laut Herstellerangaben (Chauvin Ankerpharm, Rudolstadt) hat der Gelaspon[®]-Schwamm einen neutralen pH-Wert und wird im Gewebe innerhalb von 2-3 Wochen resorbiert.

Um den Einfluss von löslichen Komponenten des Gelatineschwamms untersuchen zu können, wurde dieser in eine physiologische Natrium-Chlorid-Lösung gebracht und die MC3T3-E1-Zellen mit definierten Volumina des Überstandes inkubiert (s. 4.2.3). Dabei zeigte sich, dass der Schwamm-Überstand allein keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hatte. Es ist jedoch auch zu fragen, ob innerhalb des Untersuchungszeitraumes (1 h bei Raumtemperatur) Bestandteile des Schwammes in Lösung gegangen sind, die eine Proliferationsveränderung hätten bewirken können.

Nachdem bisher der Einfluss der zugegebenen Einzelbestandteile des „Schulte-Koagulums“ auf die Proliferationsrate der MC3T3-E1-Zellen gezeigt worden ist, sollten nun die proliferationsfördernden Eigenschaften, die aus dem Zusammenwirken der Komponenten resultieren, anhand der aus miniaturisierten, variierten „Schulte-Koagula“ freigesetzten Substanzen untersucht werden.

Die Stimulation mit den Überständen von Blut-Schwamm-Koagula führte mit dem 5-Minuten-Überstand zu einer geringen Proliferationssteigerung, mit dem 30-Minuten-Überstand zu einer Verdoppelung und mit dem 60-Minuten-Überstand zu einer unveränderten Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inaktivierung des endogen freigesetzten Thrombins durch Hirudin vor der Inkubation der MC3T3-E1-Zellen war mit dem nach 5 Minuten gewonnenen Überstand die Proliferation unverändert im Vergleich zur Kontrolle (s. Tabelle 1). Der 30-Minuten-Überstand führte zu einer

Erhöhung der Proliferationsrate, die mit dem 60-Minuten-Überstand etwas schwächer ausfiel.

Die Stimulation mit dem Überstand der Blut-Schwamm-Thrombin-Koagula zeigte den gleichen Zeitverlauf wie die Blut-Schwamm-Koagula, jedoch lagen alle Proliferationswerte etwa ein Drittel höher, was offensichtlich durch das exogen zugegebene Thrombin bedingt war. Nach Bindung des freien Thrombins in den Überständen führte der 5-Minuten-Überstand zu keiner Proliferationsbeeinflussung, der 30-Minuten-Überstand wiederum zu einer Verdoppelung und der 60-Minuten-Überstand zu einer gering gesteigerten Proliferationsrate.

Daraus lässt sich ableiten, dass die geringe Proliferationssteigerung innerhalb der ersten 5 Minuten durch Thrombin selbst oder Thrombin-vermittelte Botenstoffe hervorgerufen wird, da dieser Effekt nach Hirudinzugabe nicht mehr nachweisbar ist. Gandossi et al. (2000) hatten ebenfalls im Zellkulturmodell nachgewiesen, dass clot-assoziiertes Thrombin die Proliferation signifikant steigert und dieser Effekt durch Thrombininhibitoren (PPACK, Hirudin, Heparin) hemmbar ist. Die Proliferationssteigerung erwies sich dabei als direkt proportional zu der für die Clotherstellung verwendeten Thrombinkonzentration.

Mit dem 30-Minuten-Überstand war ein starker Proliferationsanstieg, teils bis auf das Dreifache, zu verzeichnen, der nach Thrombininaktivierung zwar absank, aber deutlich über der Kontrolle lag. Die Thrombinwirkung spielt auch hier eine wichtige Rolle, der proliferationsfördernde Effekt bleibt aber auch nach Hirudinzugabe nachweisbar und liegt höher als nach Thrombinstimulation.

Die Zellproliferation nach Stimulation der MC3T3-E1-Zellen mit den 60-Minuten-Überständen ist im vorliegenden Modell generell gering. Die Thrombininaktivierung erhöhte hier jedoch den proliferationsfördernden Effekt, das heißt in diesem Zeitintervall scheint Thrombin eher den Proliferationsanstieg zu hemmen, wobei das Niveau der Kontrolle nicht unterschritten wird.

Der Einfluss der Komponenten des „Schulte-Koagulums“ auf die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen ist isoliert und in ihrem Zusammenwirken dargestellt worden, und es wurde gezeigt, dass dabei Thrombin eine herausragende proliferationsfördernde Rolle spielt, indem es die MC3T3-E1-Zellen direkt stimuliert, aber auch indirekt über die aus den Koagula freigegebenen Substanzen. Der proliferationshemmende Effekt hoher Penizillinkonzentrationen kann durch Thrombin zumindest partiell gemildert werden.

Da Thrombin der stärkste physiologische Thrombozytenstimulator ist und Thrombozyten thrombinabhängig aggregieren, lag es nahe, den Beitrag der sekundär aus den Plättchen freigegebenen Substanzen zu prüfen.

Blutplättchen sind essentiell bei der primären Hämostase, also der Bildung eines arteriellen Gefäßwandthrombus, der zur Blutstillung führt (Gawaz 1999). Beim Kontakt mit freien Kollagenfasern, z.B. einer verletzten Gefäßwand, adhären Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandläsion und bilden durch Interaktion mit weiteren Blutplättchen den primären hämostatischen Thrombus. Bereits bei der Adhäsion werden die Plättchen aktiviert und setzen biologisch aktive Substanzen frei, die sekundär agonistisch wirken. Der adhärente und aktivierte Thrombozyt bildet aus freigesetzter Arachidonsäure Thromboxan A_2 (TXA_2), das durch Bindung an einen spezifischen, thrombozytären, membranständigen Thromboxanrezeptor den Aktivierungsvorgang verstärkt und durch lokale Vasokonstriktion den Blutfluss verlangsamt. Durch die freigesetzten Granulainhaltsstoffe werden auch ruhende Thrombozyten aus der Zirkulation rekrutiert und zur Aggregation mit den schon adhären Plättchen angeregt. Als Aggregation bezeichnet man die Koadhäsion zwischen Thrombozyten über Fibrinbrücken, wobei lösliche, sekundär freigesetzte Agonisten wie Thromboxan A_2 und ADP an ihre Rezeptoren auf den Thrombozyten binden und über Signaltransduktionswege die weitere Aktivierung der Blutplättchen bewirken. In der primären Aggregationsphase sind die Thrombozyten reversibel locker miteinander verbunden. Die Freisetzung der sekundären Agonisten bewirkt die irreversible Aggregation. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Bildung von Thrombin und Fibrin wird Fibrin an das Plättchenaggregat angelagert und führt über Quervernetzungen zur Konsolidierung des Thrombus. Das Plättchen-Fibrin-Konglomerat retrahiert sich, wodurch das Gerinnsel verfestigt wird.

Die Blutgerinnung erfolgt nach historischer Einteilung über zwei Mechanismen: 1. das extrinsische System, dessen Auslöser die bei der Gewebeerletzung freiwerdenden Gewebefaktoren sind und 2. das intrinsische System, das durch den Kontakt des Gerinnungsfaktors XII mit Kollagen gestartet wird. Beide Systeme aktivieren einzeln oder gemeinsam den Plasmafaktor X, der zusammen mit anderen Faktoren Prothrombin zu Thrombin umwandelt (Silbernagel und Despopoulos 1991). Gawaz (1999) gab zwei verschiedene Thrombinbindungsstellen auf menschlichen Plättchen an: eine hochaffine Bindungsstelle, die im Bereich des Glykoproteins 1b liegt und eine mäßigaffine, die durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranösen Domänen

gebildet wird.

Lange Zeit nahm man an, dass sich die Rolle der Plättchen in der Thrombusbildung und Initiierung der Gerinnungskaskade erschöpft. Heute ist jedoch bekannt, dass Thrombozyten aktiv verschiedene Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren freisetzen. Die Wachstumsfaktoren fördern die Geweberegeneration und beeinflussen die Reaktivität von Gefäßzellen und anderen Blutzellen (Carlson et al. 2002). Thrombozyten haben Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β und VEGF gespeichert, aber auch Cytokine wie PF4 und CD40L. Zu den von Plättchen freigesetzten Substanzen zählen außerdem Chemokine und neu synthetisierte aktive Metaboliten, die die Wundheilung und Geweberegeneration beschleunigen können (Anitua et al. 2004).

Die Freisetzung der zahlreichen Plättcheninhaltsstoffe erfordert die Thrombozytenaktivierung, die durch eine Vielzahl von Einflüssen ausgelöst werden kann. Primäre Plättchenaktivatoren sind Thrombin und Kollagen, die wiederum zur Ausschüttung sekundärer Plättchenaktivatoren wie Thromboxan A₂, ADP und Plättchenaktivierender Faktor führen (Barthels, Poliwoda 1993).

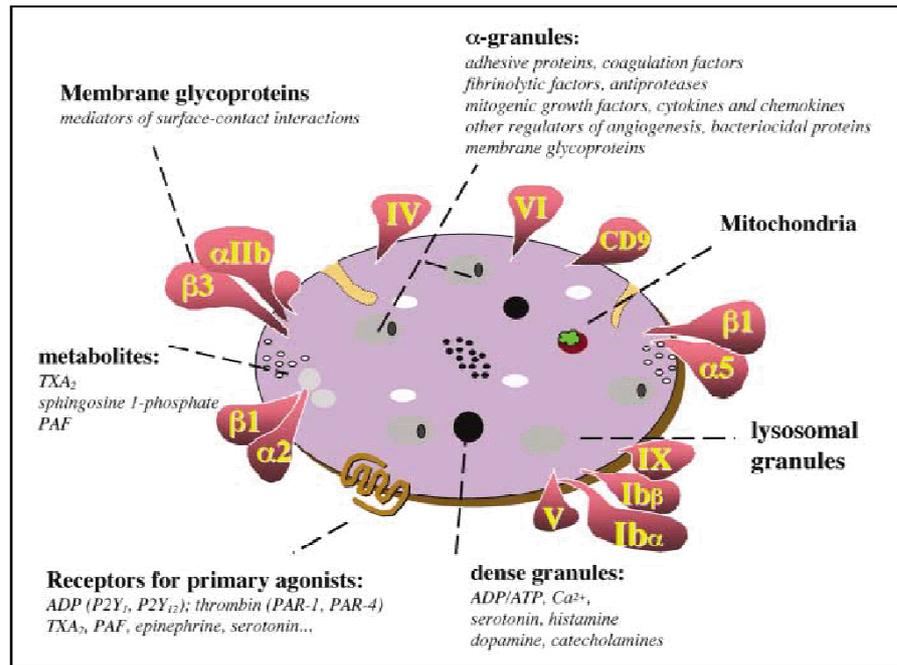


Abb.12: Schematisches Bild eines Blutplättchens mit den Hauptmembranglykoproteinen und einem 7-Transmembranhelices-Rezeptor für primäre Agonisten wie Thrombin, ADP, TXA₂ und andere; Darstellung der intrazellulär gelegenen Organellen, deren Inhalt bei Aktivierung sezerniert werden kann und synthetisierter aktiver Metabolite; (Abbildung entnommen aus Anitua et al. 2004)

Um außer der Gerinnungsbildung auch die Vielzahl der freigesetzten Plättcheninhaltsstoffe therapeutisch nutzen zu können, sind verschiedene Verfahren zur Plättchenanreicherung und -applikation etabliert worden. Nachdem in den frühen 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts Fibrinkleber als Biomaterial mit blutstillender und Klebereigenschaft entwickelt wurde, kamen später Plättchenkonzentrate hinzu.

Zur Herstellung des zunächst durch Plasmapherese-Systeme gewonnenen PRP hat sich in den letzten Jahren die Zentrifugation kleinerer Zitratblutmengen mittels Laborzentrifugen durchgesetzt, welche direkt in der Arztpraxis oder im OP erfolgen kann. Die Qualität und der Anreicherungsgrad sind im Schrifttum jedoch kritisch betrachtet worden (Sanchez et al. 2003). Wie in der Literaturübersicht bereits ausführlich dargestellt worden ist, findet sich eine Vielzahl von Arbeiten zur Wirkung von PRP bei der Wundheilung, jedoch mangelt es an gut gestalteten, prospektiven humanen Studien, die die Effizienz des PRP-Einsatzes beweisen (Bauer 2004).

Marx et al. (1998) wiesen in ihren klinischen Untersuchungen nach, dass bei der PRP-Herstellung mittels Zellseparator die Plättchen auf mehr als das Dreifache pro Volumeneinheit angereichert werden können und nach Aktivierung mittels

Kalziumchlorid und bovinem Thrombin die Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- β freigesetzt werden. Beim kombinierten Einsatz von Knochentransplantaten und aktiviertem PRP zum Ersatz von Unterkieferdefekten konnten sie sechs Monate postoperativ histomorphometrisch eine höhere Knochendichte im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Knochentransplantaten nachweisen. Die beschleunigte Knochenheilung und erhöhte Knochenquantität sind auf die Aktivierung der Thrombozyten mit Kalzium und Thrombin zurückzuführen und nicht auf die bloße Konzentration der Plättchen. Einzig in der von Weibrich et al. (2002) durchgeführten Studie an humanen osteoblastenähnlichen Zellen wurde eine PRP-konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferationsrate durch gewaschene, nicht stimulierte Thrombozyten nachgewiesen. Die Autoren selbst halten die Übertragung der In-vitro-Ergebnisse auf die In-vivo-Situation für nur begrenzt möglich. Ursächlich kommen hier auch alternative Mechanismen zur Plättchenaktivierung in Frage wie die Flip-flop-Reaktion in der Plättchenmembran und die Bildung von prokoagulatorischen Mikropartikeln.

In den eigenen Versuchen erfolgte die Thrombozytenaktivierung durch Stimulation mit 1 U/ml Thrombin. Die freigesetzten löslichen Substanzen wurden durch Zentrifugation von den Plättchen abgetrennt und das noch freie Thrombin durch Zugabe von Hirudin im Überschuss inaktiviert.

Überraschenderweise führte bereits die Stimulation mit dem Überstand nicht aktivierter Plättchen zu einer Steigerung der Proliferationsrate auf mehr als das Doppelte und lag sogar noch über der Thrombinkontrolle. Dieser Befund war nicht durch Thrombin bedingt, da der Überstand eine ausreichende Konzentration Hirudin enthielt.

Der Überstand stimulierter Plättchen erbrachte eine signifikante Proliferationssteigerung auf das Dreifache im Vergleich zur Kontrolle, und zwar unabhängig davon, ob Hirudin zugegeben worden war und der Überstand abzentrifugiert wurde oder nicht.

Wie bereits erwähnt, konnte in diesem Versuch mit den nach Martinson et al. (1998) durch verschiedene Zentrifugationsschritte präparierten Plättchen der Einfluss des Thrombins auf die Proliferation der osteoblastenartigen Zellen ausgeschlossen werden. Da in den eigenen Untersuchungen bereits nicht aktivierte Plättchen die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen steigerten, lag die Vermutung nahe, dass die Thrombozyten präparationsbedingt bereits aktiviert und Mikropartikel gebildet worden waren, die ihrerseits zur Freisetzung proliferationsfördernder Substanzen wie z.B. PDGF oder TGF- β ausgelöst hatten.

Zur Überprüfung dieser Annahme erfolgte daher eine zweite, schonendere Präparationsmethode durch Gelfiltration.

Die Stimulation mit dem Überstand unstimulierter Plättchen führte aber auch hier zu einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate auf das Vierfache der Kontrolle und lag damit doppelt so hoch wie die Thrombinkontrolle.

Da der Überstand stimulierter Plättchen mit und ohne Hirudin zu einer ebenso hohen Proliferationssteigerung führte, ist der Effekt nicht auf die Thrombinwirkung zurückzuführen.

Die Stimulationsversuche mit den Thrombozyten haben gezeigt, dass auch nach Ausschaltung der Thrombinwirkung ein starker proliferationsfördernder Effekt von den Plättchen selbst ausgeht, und zwar unabhängig davon, ob diese zuvor aktiviert worden waren oder nicht. Diese Befunde decken sich mit den schwer interpretierbaren Ergebnissen von Weibrich et al. (2002). Gruber et al. (2002) haben festgestellt, dass bei der Aktivierung menschlicher Thrombozyten mit physiologischen Agonisten wie Thrombin kleine Membranpartikel, sogenannte Mikropartikel, entstehen, die ebenso wie die Plättchenmembran selbst und das freigesetzte PDGF die Proliferation humaner Osteoblasten stimulieren können. Diese Mikropartikel sind in den abzentrifugierten Überständen aktivierter Plättchen nachweisbar, aber auch bei suspendierten Plättchen (Cauwenberghs et al. 2006). Gruber et al. (2002) kommen zu dem Ergebnis, dass sowohl native Plättchen als auch solche Mikropartikel, Plättchenmembranen und lösliche Faktoren die Proliferation von Osteoblasten steigern können und dadurch zur Regeneration mineralisierter Gewebe beitragen. Bei den löslichen Faktoren kann der mitogene Effekt auch nach Blockade von PDGF nachgewiesen werden. Darüber hinaus fanden Barry und FitzGerald (1999) sowie Weber et al. (2000), dass Mikropartikel die Funktion von Plättchen, Monozyten und vaskulären Endothelzellen modulieren können und unabhängig von PDGF die Proliferation von glatten Koronararterienmuskelzellen stimulieren.

Exemplarisch für die zahlreichen bekannten Plättcheninhaltsstoffe, die bei Aktivierung freigegeben werden, wurden die Substanzen Thromboxan A₂, ADP, Serotonin und PDGF herausgegriffen und deren Einfluss auf die Proliferation der osteoblastenartigen Zellen untersucht.

Nach Stimulation der Zellkulturen mit U 46619, einem stabilen Thromboxan-A₂-

Analogon, war eine konzentrationsabhängige signifikante Hemmung der Proliferationsrate auf bis zu 40 % der Kontrolle zu verzeichnen.

Für Serotonin und 2-Methyl-Thio-ADP konnte in unserem Modell kein Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen werden.

Mit PDGF BB wurde eine signifikante konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung bis auf das Fünffache der Kontrolle erreicht. Gruber et al. (2002) fanden bei der Stimulation mit dem aus Plättchen gereinigtem PDGF ebenfalls eine erhöhte mitogene Aktivität bei humanen Osteoblasten. Hock und Canalis (1994) sowie Yu et al. (1997) hatten ebenfalls gezeigt, dass PDGF die Knochenzellreplikation steigert.

7. Zusammenfassung

Die sterile Eigenblutfüllung intraoraler Knochenhöhlräume, wie sie in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts durch Willi Schulte angegeben wurde, hat sich bis heute in der klinischen Anwendung bewährt. Die Behandlung größerer Knochendefekte, zum Beispiel nach Zystenentfernungen im Kieferbereich, führt in einem hohen Prozentsatz zur Primärheilung mit einer vollständigen knöchernen Regeneration. Den Erfolg seiner Methode begründete Schulte in der Retraktionsstabilität des Koagulums, hervorgerufen durch den Gelatineschwamm und eine erhöhte Koagelfestigkeit durch Thrombinzusatz (Schulte 1964). Das Koagulum bleibt dadurch wandständig und kann so allseits von den knöchernen Begrenzungen her organisiert werden.

Im Lichte neuerer Erkenntnisse über die Physiologie speziell der Thrombozyten und der Knochenregeneration konnte mit den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass Thrombin konzentrationsabhängig die Osteoblastenproliferation unter In-vitro-Bedingungen fördert. Das Maximum der Proliferationsantwort war mit 300 % gegenüber der Kontrolle bei 10 U/ml Thrombin erreicht, höhere Thrombinkonzentrationen steigerten die Proliferationsrate weniger stark. Mit der in allen Stimulationsversuchen verwendeten Thrombinkonzentration von 1 U/ml war zuverlässig eine Proliferationssteigerung auf etwa das Doppelte der Kontrolle zu erzielen.

Thrombin bewirkt außerdem als einer der stärksten physiologischen Thrombozytenaktivatoren die Freisetzung weiterer Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β aus humanen Blutplättchen, wodurch die mitogene Wirkung noch verstärkt wird. Insbesondere für PDGF war eine starke Proliferationsförderung im Zellkulturmodell nachweisbar; das stabile Thromboxan-A₂-Analogon U46619 bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung.

Überraschenderweise führte die Stimulation der osteoblastenartigen Zellen mit Überständen von Thrombozyten auch ohne Plättchenaktivierung zu einer stark erhöhten Proliferationsrate. Trotz Anwendung zweier verschiedener Thrombozytenpräparationstechniken können methodische Einflüsse, die zur Bildung prokoagulatorisch wirksamer Mikropartikel geführt haben, nicht ausgeschlossen werden.

Penizillin G allein hemmte in Konzentrationen von 10.000 E/ml und mehr die Proliferation der MC3T3-E1-Zellen. Dieser Effekt war teilweise durch Thrombin kompensierbar. Hohe Penizillinkonzentrationen führten zu einer starken Ansäuerung des

Mediums. Trotz ausreichender Pufferung mit HEPES-Puffer, der selbst keinen Einfluss auf die Zellkultur hatte, konnte mittels Trypanblaufärbung das Absterben der Zellen bei Penizillinkonzentrationen über 10.000 E/ml nachgewiesen werden. Die bereits von Schulte angegebene Koagulationshemmung bei lokaler Anwendung hoher Penizillinkonzentrationen war in Vorversuchen bestätigt worden.

Um das Zusammenspiel aller Komponenten (Blut, Penizillin, Thrombin, denaturierter Gelatineschwamm) im Zellkulturmodell untersuchen zu können, wurden miniaturisierte, variierte Schulte-Koagula hergestellt und in eine Bad-Lösung gebracht. Die nach verschiedenen Zeiten gewonnenen Überstände dienten zur Stimulation der Osteoblastenkulturen.

Der denaturierte Gelatineschwamm allein hatte keinen Einfluss auf die Osteoblastenproliferation, das Blut-Schwamm-Gerinnsel erhöhte die Proliferationsrate nach 30 Minuten. Die stärkste zeitabhängige Proliferationssteigerung auf das Dreifache der Kontrolle war mit dem thrombinstimulierten Blut-Schwamm-Koagulum nachweisbar.

Zusammenfassend betrachtet führte die Kombination aller Bestandteile zu einem mitogenen Effekt, der höher als die alleinige Thrombinwirkung lag.

Das „Schulte-Koagulum“ stellt damit auch im Lichte neuerer Erkenntnisse ein geeignetes Verfahren zur Förderung der Knochenregeneration dar, das als einfache, nebenwirkungsarme und nicht zuletzt kostengünstige, biologisch optimale Alternative den aktuell propagierten Knochenersatzverfahren überlegen erscheint.

Außer der bekannten, von Schulte (1964) nachgewiesenen mechanischen Stabilität konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das „Schulte-Koagulum“ auch auf zellbiologischer Ebene die Knochenregeneration aktiv fördert. Dabei kommt Thrombin auf Grund der direkten Osteoblastenstimulation und der indirekten Wirkung durch Aktivierung der Thrombozyten mit sekundärer Freisetzung von Wachstumsfaktoren eine Schlüsselrolle zu. Im Zellkulturmodell reichten bereits 0,3 U/ml Thrombin zur signifikanten Proliferationssteigerung aus, das Maximum wurde bei 10 U/ml Thrombin erreicht. Schulte empfahl den Zusatz von 1 Einheit Thrombin pro 10.000 IE Penizillin, um die Penizillin-bedingte Koagulationshemmung aufzuheben.

Auf Grund der Zytotoxizität hoher lokaler Penizillinkonzentrationen wäre es im Rahmen der klinischen Anwendung günstiger, auch heute noch den Empfehlungen Schultes (1959) zu folgen und nur 10.000 bis 30.000 IE Penizillin pro ml Blut einzusetzen. In diesem

Konzentrationsbereich scheint es möglich, die Penizillin-bedingte Proliferationshemmung zumindest teilweise durch Thrombin aufzuheben. Ob höhere Thrombinkonzentrationen den negativen lokalen Effekt von Penizillin vollständig verhindern können, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Die momentan durch die Pharmaindustrie angebotenen Abpackungen von 1 Mio IE Penizillin und 5.000 U Thrombin enthalten Wirkstoffmengen, die für die Anwendung im „Schulte-Koagulum“ weit oberhalb des Optimums liegen. Für die klinische Anwendung scheint es daher sinnvoll zu versuchen, die Industrie zur Abpackung eines Medikamentensets mit adäquater Dosierung zu animieren.

8. Literatur

1. Abraham LA, Mac Kie EJ: Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease activated receptor-1. *J Bone Miner Res* 14 (1999) 1320-1329
2. Adam D, Löscher T, Michel D, Mertens T: Antiinfektive Chemotherapeutika. In: Müller-Oerlinghausen, B, Lasch, R, Düppenbecher H, Munter K-H (Hrsg): *Handbuch der unerwünschten Arzneimittelwirkungen*. Urban & Fischer, München, Jena, 1999, 1. Auflage, S. 38-41
3. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG: Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in rabbit cranium. A pilot study. *Clin Oral Impl Res* 16 (2005) 250-257
4. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG: Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60 (2002) 1176-1181
5. Al-Nawas B: Stellungnahme der DGZMK: Einsatz von Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis. *Dtsch Zahnärztl Z* 57 (2002)
6. Anitua E, Anida I, Ardanza B, Nurden P, Nurden A,: Autologous platelets as a source for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91 (2004) 4-15
7. Bakamijan V, Leonard A: Bone dust cranioplasty. *Plast Reconstr Surg* 60 (1977) 784
8. Barry OP, FitzGerald GA: Mechanismus of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost* 82 (1998) 794-800
9. Barthels M, Poliwoda, H: *Gerinnungsanalysen*. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993, S. 5-9

10. Bauer F: Der Einfluss von plättchenreichem Plasma (PRP) auf Sinusboden-augmentate- Eine intraindividuelle Vergleichsstudie. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München 2004, S. 3-4
11. Buff S, Al-Nawas B, Hohlfelder M, Schulze R, Grötz KA, Maerer M, Wagner W: Therapierelevante mikrobiologische Unterschiede bei der Antibiotikatherapie von submukösen und Logenabszessen. Dtsch Zahnärztl Z 5 (2001) 335-338
12. Carlson NE, Roach RB: Platelet-rich plasma. Clinical applikations in dentistry. J Am Dent Assoc 133 (2002) 1383-1386
13. Cauwenberghs S, Feijge MAH, Keuren JFW, van Pampus ECM, Curvers J, Heemskerk JWM: Intergrins mediate shedding of prokoagulant microparticles at minimal platelet activation. Platelets (2006) im Druck
14. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH: Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. J Oral Maxillofac Surg 33 (2004) 56-59
15. Eckert AW: Erregerspektrum und Resistenzsituation bei Infektionen im mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Bereich. Dissertationsschrift Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2004, S. 18-43
16. Flemming A, Fish E.W. Brit Med J. 45 (1947) 242
17. Fröhlich E: Die operative Behandlung von Kieferzysten. Dtsch Zahnärztl Z 33 (1957)
18. Gandossi E, Lunven C, Berry CN: Role of clot-associated (-derived) Thrombin in cell proliferation induced by fibrin clots in vitro. Brit J Pharmacol 129 (2000) 1021-1027
19. Gawaz M: Das Blutplättchen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1999, S.18-24

20. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB: Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissues Int* 33 (1981) 71
21. Grageda E: Platelet-rich plasma and bone graft materials: A review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 13 (2004) 301-309
22. Grauschopf U: Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. Dissertationsschrift Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2000) 1-2
23. Greinacher A, Michels, I, Kiefel, V, Mueller-Eckhardt, C: A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 66 (1991) 734-736
24. Gruber R, Varga F, Fischer M, Watzek G: Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Impl Res* 13 (2002) 529-535
25. Hock JM, Canalis E: Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinol* 134 (1994) 1423-1428
26. Hotz G, Singer R: Antibiotika-Anwendung im Rahmen der Zahnärztlichen Praxis. *ZWR* 94 (1985) 962-967
27. Kübler NR, Würzler KK, Reuther JF, Sieber E, Kirchner T, Seebald W: Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Eigenschaften von rekombinanten BMPs. *Mund Kiefer Gesichts Chir Supplement* 2 (2000) 465-469
28. Kübler N, Urist MR: Allogenic bone and cartilage morphogenesis: rat BMP in vivo and in vitro. *J Craniomaxillofac Surg* 19 (1991) 283-288

29. Kloss F R, Schlegel K A, Felszeghy E, Falk S, Wiltfang J: Anwendung eines osteoinduktiven Proteinkomplexes zur Regeneration knöcherner Defekte. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 8 (2004) 12-17
30. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Semeins CM, Wuisman PI, Klein-Nulend J: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng* 11 (2005) 1780-1788
31. Martinson EA, Scheible S, Greinacher A, Presek P: Secreted ADP plays a central role in thrombin-induced phospholipase D activation in human platelets. *Thromb Haemost* 80 (1998) 976-981
32. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss J E, Georgeff KR: Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone crafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod* 85 (1998) 638-646
33. Matis P, Mayer M, Nagel W: *Z Exper Med* 118 (1951)
34. Maurer P, Eckert AW, Schubert J: Reconstruction of intraoral bone defects using the stabilised autologous blood coagulum after SCHULTE. A 10-year experience. *Int Poster J Dent Oral Med* 5 (2003) 186
35. Maurer P, Goldbecher C, Eckert AW, Schubert J: Auffüllung von Knochendefekten der Kiefer durch das stabilisierte Eigenblutkoagulum nach Schulte. *Quintessenz* 53 (2002) 803-806
36. Naber KG, Vogel F, Scholz H: Paul-Ehrlich-Gesellschaft Empfehlungen: Rationaler Einsatz oraler Antibiotika in der Praxis. *Chemother J* 7 (1998) 16-26
37. Pagel CN, De Niese MR, Abraham LA, Chinni C, Song S-J, Pike RN, Mackie EJ: Inhibition of osteoblast apoptosis by thrombin. *Bone* 33 (2003) 733-743
38. Partsch C: Über Kieferzysten. *Dtsch Monatsschr Zahnheilkd* 10 (1892) 271-273

39. Partsch C: Zur Behandlung von Kieferzysten. Dtsch Monatsschr Zahnheilkd 28 (1910) 252-258
40. Piesold J, Vent S, Schönfeldt S: Odontogene pyogene Infektionen. Mund Kiefer Gesichts Chir 3 (1999) 82-86
41. Reichenbach E, Taege E: Ein Beitrag zur osteoplastischen Behandlung von Kieferzysten. HNO-Wegweiser für die fachärztliche Praxis. 10 Band 4 (1954)
42. Rodbell M, Lad PM, Welton AF: Evidence for distinct nucleotide sites in the regulation of the glucagon receptor and of adenylate cyclase activity. J. Biol. Chem. 252 (1977) 5942-5946
43. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB: Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: Isolation, characterization and differentiation potentialities. Cell Tech Biolog Med 3 (2005) 138-143
44. Sagel S, Song SJ, Pagel CN, Campbell TM, Pike RN, Mackie EJ: The role of protease-activated receptor-1 in bone healing. Am J Physiol 166 (2005) 857-868
45. Salyer KE: Kraniofaciale Chirurgie. Thieme, Stuttgart , New York, 1992, S. 246
46. Sanchez A, Sheridan P, Kupp L: Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. J Oral Maxillofac Surg 18 (2003) 93-103
47. Schlegel K A, Kloss F R, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Wiltfang J: Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Kombination von autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien. Mund Kiefer Gesichts Chir 7 (2003) 112-118

48. Schulte W: Über den primären Nahtverschluß nach intraoralen Eingriffen am Kieferknochen und die Defektversorgung mit Gelatineschwamm, Penizillin und Thrombin. Dtsch Zahnärztl Z 6 (1959) 456-471
49. Schulte W: Die Hemmung der Blutgerinnung bei lokaler Penizillin-Anwendung und ihre Verhütung. Dtsch Zahn Mund Kieferhkl 3-6 (1960 a) 147-165
50. Schulte W: Die Eigenblutfüllung: eine neue Methode zur Versorgung größerer Knochendefekte nach intraoralen Eingriffen. Dtsch Zahnärztl Z 15 (1960 b) 910-914
51. Schulte W: Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung für die primäre Heilung von Kieferknochendefekten. Habilitationsschrift. Carl Hanser Verlag, München, 1964, S. 9-16
52. Schulte W: Zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung großer Knochendefekte- eine Modifikation der Eigenblutmethode. Dtsch Zahnärztl Z 10 (1969) 854-857
53. Seher GA: In-vitro-Untersuchungen zur Zellstimulation durch Thrombozytenkonzentrate (PRP), Dissertationsschrift, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2004) S. 57-59, S. 75-84
54. Silbernagel S, Despopoulos A: DTV-Atlas der Physiologie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1991, 74-76
55. Suzuki A, Kozawa O, Shinoda J, Watanabe Y, Saito H, Oiso Y: Thrombin induced proliferation of osteoblast-like cells through phosphatidylcholine hydrolysis. J cell Physiol 168 (1996) 209-216
56. Tatakis DN, Dolce C, Dziak R, Fenton JW: Thrombineffekts on osteoblastic cells. I. Cytocolic Calicium and Phosphoinositedes. Biochem Biophys Res Commun 164 (1989) 119-127

57. Tatakis DN, Dolce C, Dziak R, Fenton JW: Thrombineffects on osteoblastic cells. II. Structure-function relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 174 (1991) 181-188
58. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY: Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 52 (1994) 161-165
59. Terheyden H, Roldan S, Miller J, Jepsen S, Acil Y: Platelet-rich Plasma in der Knochenregeneration - erste Ergebnisse zweier experimenteller Studien. *Implant* 10: (2002) 195-205
60. Terheyden H, Jepsen S: Wachstumsfaktoren und osteoinduktive Proteine in der zahn-ärztlichen Implantologie. *Dtsch Zahn Mund Kieferhkl* 17 (2001) 476-485
61. Terheyden H: Stellungnahme der DGZMK zur Verwendung von Knochenersatzmaterialien in der chirurgischen Zahnheilkunde. *Dtsch Zahnärztl Z.* 55 (2000)
62. Terheyden H, Jepsen S: Hartgeweberegeneration durch Wachstumsfaktoren und morphogene Proteine. Grundlagen und klinische Anwendung. *Implant* 4 (1999) 359-378
63. Thorn JJ, Sørensen H, Weis-Fogh U, Andersen M: Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (2004) 95-100
64. Urist MR: Bone: formation by autoinduktion. *Science* 150 (1965) 893-899
65. Urist MR, Silverman BF, Burning K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. *Clin Orthop* 53 (1967) 243-283
66. Weber A-A, Köppen HO, Schrör K: Platelet derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by PDGF-independent mechanism. *Thromb Res* 98 (2000) 461-466

67. Weibrich G: Platelet-rich plasma (Thrombozytenkonzentrate) in der prothetischen Chirurgie und Implantologie- eine aktuelle Literaturübersicht. *Z Zahnärztl Impl* 19 (2003) 168-174
68. Weibrich G, Gnoth S-H, Otto M, Reichert T E, Wagner W: Wachstumsstimulation von humanen osteoblastenähnlichen Zellen durch Thrombozytenkonzentrate in vitro. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 6 (2002) 168-174
69. Whitman DH, Berry RL, Green DM: Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 55 (1997) 1294-1299
70. Wozney JM: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32 (1992) 160-167
71. Wozney JM: Biology and clinical applications of rhBMP-2. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (Hrsg): *Tissue Engineering. Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Publ., Chicago, 199 S.103
72. Würzler KK, Heisterkamp M, Böhm H, Kübler NR, Sebald W, Reuther JF: Unterkieferrekonstruktion mit autologem Knochen und einem induktiven Implantat beim Göttinger Minischwein. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 8 (2004) 75-82
73. Yu X, Hsieh SC, Bao W, Graves DT: Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures. *Am J Physiol* 272 (1997) 1709-1716
74. Zechner W, Tangl S, Teppner G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G: Influence of platelet rich plasma on osseous healing of dental implants: A histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Impl* 18 (2003) 15-22

9. Thesen

1. Das „Schulte-Koagulum“, die in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eingeführte Eigenblutfüllung enoraler Knochenhöhlräume, bestehend aus Venenblut des Patienten, Gelatineschwamm, Penizillin und Thrombin, hat sich bis heute in der klinischen Anwendung bewährt.
2. Entsprechend seiner ursprünglichen Intention bewirkt es eine erhöhte mechanische Stabilität des Koagulums mit Verhinderung der Retraktion und eine lokale Infektionsprophylaxe.
3. Neuere Erkenntnisse zur Wirkung von Thrombin und stimulierten Thrombozyten lassen zusätzlich auch zellbiologische Effekte erwarten.
4. Die in der Erforschung der Knochenregeneration etablierte immortalisierte Zelllinie MC3T3-E1 ist ein geeignetes Modell für die Untersuchung des Einflusses von Komponenten des „Schulte-Koagulums“ auf die Zellproliferation.
5. Ein optimierter Proliferationsassay mit Tritium-markiertem Thymidin ist zur reproduzierbaren Bestimmung der Proliferationsrate von MC3T3-E1-Zellen geeignet.
6. Die Einzelbestandteile des „Schulte-Koagulums“ zeigen folgende Wirkungen:
 - 6.1 Penizillin bewirkt im Zellkulturmodell ab Konzentrationen von 100.000 IE/ ml das Absterben der MC3T3-E1-Zellen.
 - 6.2 Penizillinkonzentrationen ab 10.000 IE/ml hemmen die Proliferation. Dieser Effekt ist durch Thrombin teilweise kompensierbar.
 - 6.3 Thrombin bewirkt im Zellkulturmodell eine direkte, konzentrationsabhängige Osteoblastenproliferation.
 - 6.4 Bereits 0,3 U/ml Thrombin sind zur signifikanten Proliferationssteigerung ausreichend, das Maximum wird mit 10 U/ml Thrombin erreicht.

- 6.5 Die Stimulation mit Überständen von Thrombozyten mit und ohne Plättchenaktivierung führt zu einer stark erhöhten Proliferationsrate, unabhängig davon, ob die Thrombozyten durch Zentrifugation (Präparation nach Greinacher, modifiziert nach Martinson et al.) oder durch Gelfiltration isolierten worden sind.
- 6.6 Denaturierter Gelatineschwamm hat keinen Einfluss auf die Osteoblastenproliferation.
7. Es gibt synergistische Effekte der Einzelbestandteile:
- 7.1 Die Penizillin-bedingte Proliferationshemmung ist teilweise durch Thrombin hemmbar.
- 7.2 Die Aktivierung der Blutplättchen durch Thrombin, einen der stärksten physiologischen Thrombozytenstimulatoren, führt zur Freigabe weiterer Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β , die sekundär die Osteoblastenproliferation fördern.
- 7.3 PDGF bewirkt eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation, die weit über der alleinigen Thrombinwirkung liegt.
8. Zusammenfassend betrachtet führt die Kombination der Bestandteile des „Schulte-Koagulums“ zu einem proliferationssteigernden Effekt, der höher liegt als die alleinige Thrombinwirkung.
9. Für die klinische Anwendung sollte zur Vermeidung lokal zytotoxischer Penizillineffekte auch heute noch die von Schulte (1959) empfohlene Konzentration zwischen 10.000 und 30.000 IE Penizillin pro ml Blut nicht überschritten werden. In diesem Bereich ist die Penizillin-bedingte Proliferationshemmung teilweise durch Thrombin aufgehoben.
10. Das „Schulte-Koagulum“ stellt auch auf zellbiologischer Ebene ein geeignetes Verfahren zur Förderung der Knochenregeneration dar, das als einfache, nebenwirkungsarme und nicht zuletzt kostengünstige, biologisch optimale Alternative den aktuell propagierten Knochenersatzverfahren überlegen erscheint.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Linß
Vorname: Christine
Geburtsdatum/-ort: 01.08.1969 in Ilmenau
Familienstand: ledig, Tochter Hanna Helene (geb. 12.10.1999)

Schulbildung:

1976-1986 Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ in Ilmenau
1986-1988 Erweiterte Oberschule „Goetheschule“ in Ilmenau, Abschluss: Abitur

Krankenpflegepraktikum:

1988-1989 Kreiskrankenhaus Ilmenau, Innere Abteilung

Hochschulbildung:

1989-1990 Studium der Humanmedizin:
Medizinische Akademie Magdeburg
1990-1995 Friedrich-Schiller-Universität Jena, Staatsexamen
1996-2001 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

1996-1997 Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Approbation als Ärztin
1997-2001 Ärztin im Bereitschaftsdienst in der Universitätsklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie Halle-Wittenberg
seit 03.12.2001 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Schubert)

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle, den 03.04.2006

Christine Linß

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, den 03.04.2006

Christine Linß

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und wissenschaftliche Beratung möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, recht herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Presek, Leiter der Sektion Klinische Pharmakologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die intensive Betreuung bei der experimentellen Umsetzung des Themas, die kritische Beratung bei der Erstellung der Arbeit und die Bereitstellung der Laborräume und -ausstattung.

Herzlich bedanke ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Knut Fälker sowie Frau Annelies Hauser, Cornelia Just und Claudia Kielmann für die angenehme Zusammenarbeit und Motivation im Labor.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die durch ihr Verständnis und ihre Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.