

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Schubert)

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

Die intraorale Eigenblutfüllung von Knochenhöhlräumen nach SCHULTE – zellbiologische Erkenntnisse zur Wirkungsweise

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

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

von Sebastian Krause

geboren am 04.04.1983 in Apolda

Betreuer: Prof. Dr. P. Presek

Gutachter: Prof. Dr. P. Presek
PD Dr. K. Hoffmann (Weimar)
Prof. Dr. Dr. H. Schliephake (Göttingen)

eingereicht am: 15.03.2011

verteidigt am: 07.12.2011

Meinen Eltern

Referat

Das 1959 von Willi Schulte (Tübingen) in die Zahnheilkunde eingeführte Verfahren, mit Eigenblut, Gelatineschwamm, Thrombin und Benzylpenizillin größere, intraorale Knochendefekte aufzufüllen, hat sich bis heute im klinischen Alltag bewährt.

Ziel dieser Arbeit war, die gemeinsame Wirkung von Penizillin und Thrombin sowie den genauen Einfluss von PDGF aus aktivierten Thrombozyten auf die Proliferation von Knochenzellen zu untersuchen. Zudem sollte geklärt werden, ob es zellbiologisch sinnvoll ist, Thrombin durch sog. „Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide“ (TRAP) zu ersetzen.

In einem etablierten Zellkulturmodell mit osteoblastenartigen Mäusefibroblasten (MC3T3-E1) wurden die einzelnen Bestandteile und deren Einfluss auf die Zellproliferation getestet. Es wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch geringe Penizillinemengen (10^4 - 10^2 IE/ml) beobachtet, während 10^5 IE/ml ein Absterben der MC3T3-E1 Zellen bedingte. Die proliferationshemmenden Penizillineffekte konnten durch Thrombin (3-30 IE/ml) kompensiert werden. Die Verwendung von Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden allein und untereinander kombiniert, beeinflusste die basale Zellproliferation nicht. In Kombination mit geringen Thrombinkonzentrationen (0,03 und 0,1 IE/ml) war allerdings ein additiver Effekt mit dem PAR-1 Peptid (SFLLRN) zu erkennen. PDGF steigerte die Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen konzentrationsabhängig bis zu 600%. AG 1296 (10 μ M), ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinasaktivität der katalytischen Domäne des PDGF-Rezeptors war in der Lage, den proliferativen Effekt von PDGF vollständig zu inhibieren. Im Gegensatz dazu gelang dies mit AG 1478 (10 μ M), einem Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors nur unvollständig. Wasserlösliche Komponenten des Überstands von experimentell angefertigten, miniaturisierten Vollblutgerinnseln erhöhten die Proliferation der MC3T3-E1 Zellen zeitabhängig mit einem Maximum bei 30 Minuten. Da bei gleichzeitiger Verwendung von AG 1296 (10 μ M) der proliferative Effekt deutlich minimiert war, wird angenommen, dass ein großer Anteil der proliferativen Wirkung des stabilisierten Eigenblutkoagulums durch PDGF generiert wird. Es lässt sich feststellen, dass sich die klinische Effektivität des Schulte-Koagulums nicht, wie ursprünglich angenommen, allein auf dessen Retraktionsstabilität beschränken lässt. Ebenso müssen mitogene Effekte durch Thrombin und PDGF aus aktivierten Thrombozyten und dessen Zusammenwirken mit den anderen Bestandteilen des Schulte-Koagulums berücksichtigt werden.

Krause, Sebastian: Die intraorale Eigenblutfüllung von Knochenhöhlräumen nach SCHULTE- zellbiologische Erkenntnisse zur Wirkungsweise
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2011

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Biologie des Knochens	1
1.2	Knochenersatzmaterialien	5
1.3	Die Eigenblutfüllung von Knochendefekten („Schulte-Koagulum“)	8
1.3.1	Penizillin G	9
1.3.2	Thrombin und Thrombinrezeptor	10
1.3.3	Gelatineschwamm	12
2.	Zielstellung	13
3.	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.2	Methoden	16
3.2.1	Kultivierung der MC3T3-E1 Zellen	16
3.2.2	Bestimmung des [³ H]-Thymidineinbaus in MC3T3-E1 Zellen	17
3.2.3	Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit PDGF und Einfluss von Thyrphostin AG 1296 und Thyrphostin AG 1478	18
3.2.4	Herstellung miniaturisierter Schulte-Koagula in vitro	18
3.2.5	Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung	19
4.	Ergebnisse	20
4.1	Einfluss von Thrombin und Penizillin auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen	20
4.1.1	Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 100 000 IE/ml	20
4.1.2	Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 10 000 IE/ml	21
4.1.3	Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 1 000 IE/ml	22
4.1.4	Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 100 IE/ml	23
4.2	Einfluss von Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen	24
4.3	Einfluss von Thrombin und Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen	26
4.4	Einfluss von PDGF auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen	29

4.5	Einfluss von Tyrphostin AG 1478 auf den proliferativen Effekt von Thrombin und PDGF	33
4.6	Einfluss löslicher Bestandteile verschiedener Schulte-Koagula auf die Proliferation von MC3T3-E1-Zellen	36
5.	Diskussion	39
6.	Zusammenfassung und Ausblick	53
7.	Literatur	56
8.	Thesen	74

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
aFGF	Acidic fibroblast growth factor
AG 1296	6,7-Dimethyl-2-phenylquinoxaline
AG 1478	4-(3-chloroquilino)-6,7-dimethoxyquinazoline
α -MEM	<u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium, Alpha-Modifikation
BCA-SMC	Bovine coronary artery smooth muscle cells
BCP	Biphasisches Kalziumphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
ca.	circa
Ci	Curie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
et al.	et altera
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gravitation
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like growth factor
LEC	Lymphendothelzellen
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
ng	Nanogramm
PAR	Protease-activated receptor

PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PLC	Phospholipase C
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRP	Plättchenreiches Plasma
Ras	<u>R</u> at <u>s</u> arcoma (monomers G-Protein)
SEM	Standard error of the mean
Shc	Sarc homology collagen
Src	<u>C</u> ellular <u>s</u> arcoma (intrazelluläre Tyrosinkinase)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
=	ist gleich
±	plus minus
≤	kleiner gleich

1. Einleitung

1.1 Biologie des Knochens

Der Knochen als hochdifferenziertes, metabolisches Organ ist in besonderem Maße dazu befähigt, sich ständig ändernden Anforderungen durch An-, Ab- und Umbauprozesse anzupassen. Dies befähigt ihn im Gegensatz zu anderen Geweben zu einer vollständigen und narbenfreien Ausheilung von Defekten (Terheyden, 2001). Neben der mechanischen Funktion des Knochens als Stütz-, Schutz- und Halteelement, trägt er wesentlich zur Kalzium- und Phosphathomöostase im Körper bei (Ng et al., 1997). Wichtigstes Merkmal des Knochens ist die ihm eigene Leichtbauweise. Dabei wird eine Einsparung von Stoffwechselenergie durch reduzierte Knochenmasse bei gleichzeitiger voller mechanischer Belastbarkeit erreicht (Schiebler und Schmidt, 2002).

Knochen entwickelt sich embryologisch aus dem Mesenchym, welches selbst aus dem Mesoderm hervorgeht (Sadler, 2003). Die Knochengrundsubstanz besteht zu 50 % aus anorganischen und zu 25 % aus organischen Bestandteilen. Die restlichen 25 % werden dem eingelagerten Wasser zugeschrieben. Neben Fluorapatit, Carbonatapatit, Calciumcarbonat und Magnesiumcarbonat ist Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ die wichtigste anorganische Verbindung im Knochen (Buddecke, 1994). Als weitere anorganische Bestandteile konnten Eisen, Fluor Magnesium, Strontium, Barium und andere Spurenelemente nachgewiesen werden (Lutz, 1975).

Der organische Knochenanteil besteht zu 90 % aus Kollagen (insbesondere Kollagen Typ I) und zu 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen wie zum Beispiel Osteonektine, Osteocalcine, Phosphoproteine, α_2 -Glykoproteine sowie Proteoglykane (Wintermantel und Ha, 1998). Die Kombination aus druckfesten Mineralkristallen und zugfesten Kollagenfibrillen verleiht dem Knochen seine Biegefestigkeit (Lüllmann-Rauch, 2003). Allerdings weist die chemische Zusammensetzung der Knochengrundsubstanz eine große Variationsbreite auf, welche neben Umwelt-, Ernährungs- und Stoffwechseleinflüssen vor allem von Alter und Geschlecht abhängig ist.

Neben der Knochengrundsubstanz finden sich auch zelluläre Bestandteile. Osteoblasten leiten sich von Osteoprogenitor-Zellen ab, welche sich wiederum aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen entwickeln.

Die meist einkernigen Osteoblasten liegen dem Knochen an einer freien Oberfläche in einer einschichtigen Lage an und produzieren pro Tag ca. 1-2 μm einer noch nicht mineralisierten Schicht, die als Osteoid bezeichnet wird (Kühnel, 2002). Dieses besteht vorwiegend aus Kollagen I, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen und wird durch die Einlagerung von Calcium- und Phosphationen sekundär mineralisiert. Die Osteoblasten regulieren zudem den Ablauf der Mineralisation sowie den Osteoklastenhaushalt. Nach erfolgreicher Funktion sterben etwa 50 % durch Apoptose ab. Die restlichen Zellen wandeln sich entweder in Osteozyten oder „lining cells“ um, oder kehren in den inaktiven Zustand zurück und werden Bestandteil des Endosts (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die Osteozyten (inaktive Osteoblasten) befinden sich in linsenförmigen, ca. 30 μm großen Knochenlakunen und sind vollständig von mineralisierter Knochenmatrix umgeben. Von diesen Lakunen verzweigen sich zahlreiche Kanälchen, in denen die dendritischen Fortsätze der Zellen liegen. Über diese sind die Osteozyten untereinander und mit Osteoblasten durch „gap junctions“ in Verbindung. Allerdings werden die Hohlräume dieses Labyrinths nicht vollständig von den Zellen und ihren Ausläufern ausgefüllt. Durch diese unvollständige Ausfüllung entstehen schmale, perizelluläre Räume, in denen sich vor allem nicht mineralisiertes Kollagen und interstitielle Flüssigkeit befinden. Über diesen Raum sind alle Osteozyten durch Diffusion erreichbar, welches einen intraossären Stofftransport garantiert und somit nicht nur die Ernährung, sondern auch das Wachstum und die Mechanotransduktion des Knochens gewährleistet (Wintermantel und Ha, 1998; Lüllmann-Rauch, 2003).

Osteoklasten sind große (50-100 μm) mehrkernige Riesenzellen, welche zur enzymatischen Auflösung von Knochengewebe befähigt sind (Lüllmann-Rauch, 2003). Sie entstehen aus Proosteoklasten, welche sich durch Fusion mehrerer mononukleärer Vorläuferzellen des phagozytären Systems entwickeln. Osteoblasten sezernieren Wachstumsfaktoren wie z. B. M-CSF, was die Proliferation der Osteoklastenvorläufer anregt (Lüllmann-Rauch, 2003). Umgekehrt, wird unter anderem die Osteoblastentätigkeit durch Gewebshormone, welche über die Knochenresorption durch Osteoklasten freigesetzt werden, reguliert. Daher ist es logisch, dass die scheinbar gegensätzlichen Funktionen der Osteoblasten und Osteoklasten miteinander verbunden sind (Teitelbaum, 2007). Nach 2 Wochen geht der Osteoklast durch Apoptose zugrunde und wird durch einen neuen ersetzt oder er kehrt in den Ruhezustand zurück und wird Bestandteil des Endosts (Lüllmann-Rauch, 2003).

Histologisch kann man den Knochen in Lamellen- und Geflechtknochen unterteilen. Geflecht- oder Faserknochen ist durch den zufälligen Verlauf der Kollagenfasern gekennzeichnet. Eine lamelläre Struktur fehlt. Er zeichnet sich durch seine hohe Druck- und Zugfestigkeit aus, hat aber im Vergleich zum Lamellenknochen eine geringere Biegefestigkeit. Neu gebildeter Knochen, z. B. während eines Heilungsprozesses im Kieferknochen ist immer Geflechtknochen, der später in Lamellenknochen umgebaut wird. Das ist ein Grund dafür, dass sich Geflechtknochen beim Erwachsenen nur noch an wenigen Stellen findet, so zum Beispiel die Pars petrosa des Felsenbeins, im Bereich der Schädelnähte oder an der Insertion einzelner Sehnen (Schiebler und Schmidt, 2002). Lamellenknochen dagegen ist das typische Knochengewebe des Erwachsenen. Es lässt sich ein lamelläres Ordnungsprinzip der Interzellulärsubstanz erkennen, wobei die einzelnen Lamellen 3-5 µm dick sind (Lüllmann-Rauch, 2003) und konzentrisch um einen, Blutgefäße und Nerven enthaltenden Kanal (Havers-Kanal) angeordnet sind. Die Osteozyten liegen im Kontaktbereich der einzelnen Lamellen und bilden zusammen mit diesen und dem Havers-Kanal eine ca. 3 mm lange Untereinheit, das Osteon. Um und zwischen den Osteonen finden sich sogenannte Schaltlamellen, die durch Ab- und Umbauprozesse entstanden sind. Weiterhin aufzufinden sind Generallamellen, welche den Knochen an der inneren und äußeren Oberfläche umfassen (Schiebler und Schmidt, 2002).

Wie erwähnt, ist der Knochen zur Restitutio ad integrum fähig. Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Knochenheilungsvorgänge. Die direkte Knochenheilung oder auch Primärheilung kann sich als Kontakt- oder Spaltheilung vollziehen. Hierbei müssen die Frakturrenden mechanisch absolut stabil aneinander liegen, damit der Prozess eines physiologischen Knochenumbaus stattfinden kann. Es fehlen Resorption und Kallusbildung (Stürmer, 1996).

Die indirekte Knochenheilung oder auch Sekundärheilung tritt bei mechanisch instabilen Bedingungen auf. Im Defektbereich bildet sich ein Hämatom aus, welches sich nach Einwanderung von Entzündungszellen in ein zell- und gefäßreiches Granulationsgewebe organisiert. Es folgt die periostale Ossifikation durch Osteoblasten, die sich aus Vorläuferzellen des Periosts entwickelt haben. Diese bilden direkt neues Knochengewebe, ohne die knorpelige Vorstufe. Eingewanderte Chondroblasten synthetisieren entlang des periostalen Knochens Knorpelgewebe, welches das Granulationsgewebe ersetzt. Letztendlich wird die gesamte Knorpelmasse in Knochen umgewandelt.

Eingeleitet wird dieser Vorgang durch Hypertrophie und teilweises Absterben von Knorpelzellen. In die verbleibende Knorpelgrundsubstanz lagern sich Kalksalze ein. Gleichzeitig dringen Kapillaren aus dem umliegenden Knochengewebe in den veränderten Knorpel ein. Dadurch können Osteoblasten in den Defektbereich gelangen und osteoide Matrix bilden. Dabei entsteht anfänglich Faser- oder Geflechtknochen, welcher nach ca. 4 Wochen durch Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität in Lamellenknochen umgebaut wird (Grundmann, 1994). Durch Chondroklasten werden die verbliebenen Knorpelreste abgebaut (Dimitriou et al., 2005).

Für die Heilung von Kieferknochendefekten interessiert der zweite Mechanismus. Nach Zahnextraktionen, aber auch chirurgischen Knocheneingriffen in der Mundhöhle (Zystektomie, Entfernung von benignen, intraossären Tumoren oder retinierten Zähnen) füllen sich die Hohlräume im Knochen mit Blut. Diese können bei geringer Ausdehnung (z. B. Extraktionsalveole) folgenlos heilen. Es werden mehrere Phasen unterschieden (Klammt, 2004). In der exsudativ-entzündlichen Phase kommt es zu einer Aktivierung ortsständiger Fermente, neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Phagozyten, welche mit dem Abbau von nekrotischem Material beginnen. Eine Vasodilatation begünstigt den Austritt von geformten und gelösten Bestandteilen aus der Blutbahn. Die Knochenwunde ist weiterhin mit einem Blutkoagulum aufgefüllt. Im Rahmen der proliferativen Phase sprossen zunehmend Kapillaren in das Wundgebiet ein, die Aktivität der Fibroblasten nimmt zu und das Blutkoagulum organisiert sich unter zunehmender Faserbildung zu Granulationsgewebe. Einwandernde Osteoblasten bilden Osteoid. Es reift zunehmend mit der Einlagerung von Kalksalzen zu Geflecht- oder Faserknochen, welcher später im Rahmen des Remodeling zu Lamellenknochen umgebaut wird. Zudem wird die typische funktionelle trabekuläre Struktur hergestellt, womit die regenerative Phase abgeschlossen ist.

Die Heilungsvorgänge in der Mundhöhle laufen dabei unter besonderen Bedingungen ab. So können sich Speichel, mechanische Belastungen beim Schlucken oder Kauen, thermische Einflüsse durch Speisen oder chemische Substanzen (Alkohol, Gewürze, Medikamente, Tenside) negativ auf den Heilungsvorgang auswirken (Klammt, 2004). Zudem ist die Wahrscheinlichkeit einer Primärheilung minimiert, wenn der chirurgisch geschaffene Hohlraum ein Volumen von Walnuss- bis Hühnereigröße übersteigt. Dann retrahiert sich das Blutkoagulum und reduziert sich im Volumen. Im sich bildenden Serumspiegel können sich Infektionen ausbilden und als Konsequenz erfolgt der putride Zerfall des (Rest-)Koagulums.

Um dieser Komplikation vorzubeugen, empfehlen verschiedene Autoren den lokalen und gegebenenfalls systemischen Gebrauch von Antibiotika (Schulte, 1960a; Sancho-Puchades et al., 2009).

Über die Fähigkeiten der *Restitutio ad integrum* und der Defektheilung hinaus ist der Knochen durch einen lebenslangen, funktionell-dynamischen Umbau der Knochenstruktur in der Lage, sich ständig ändernden Belastungs- oder Entlastungssituationen sowie Veränderungen im Mineralstoffwechsel optimal anzupassen (Boskey und Posner, 1984). Zudem können durch diese Umbauvorgänge alte und defekte Knochenabschnitte ersetzt und der im Rahmen der Knochenheilung neu entstandene Knochen funktionell angepasst werden. So werden bei einem Erwachsenen durchschnittlich ca. 25 % trabekulärer und 3 % kortikaler Knochen in einem Jahr abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt (Parfitt, 1994). Dieser funktionelle Ab-, Um- und Aufbau beginnt mit dem Abtrag von Knochengewebe durch Osteoklasten. Eingewanderte Osteoblasten bilden neues Osteoid, welches sekundär mineralisiert und damit den Vorgang des Remodeling abschließt. Damit die strukturelle Integrität des Knochens erhalten bleibt, wird immer gleich viel Knochen aufgebaut, wie vorher resorbiert wurde.

1.2 Knochenersatzmaterialien

Um den eben beschriebenen Mechanismen der gestörten Heilung in großen Knochenkavitäten entgegenzuwirken, wird vielfach versucht, größere Hohlräume einzuengen. Neben bestimmten chirurgischen Methoden werden hierfür seit alters her verschiedene Substanzen verwendet. Sie alle müssen sich am körpereigenen Knochen als Goldstandard (Sittitavornwong und Gutta, 2010) messen lassen. Der Bedarf und Einsatz von Knochenersatz- bzw. -aufbaumaterialien ist dabei in den vergangenen Jahren stetig gestiegen. So werden allein in den USA jährlich 250.000 – 300.000 Knochentransplantationen durchgeführt (Heary et al., 2002). Indiz dafür ist aber auch die Vielzahl von angebotenen Produkten auf dem deutschen Markt (z. B. Bio-Oss[®], Ostim[®] oder Osbone[®]).

Nach wie vor besitzt die frische autogene Spongiosa die höchste biologische Wertigkeit (Laurencin et al., 2006), da sie gleichzeitig osteoinduktiv als auch osteokonduktiv wirkt.

Als Osteoinduktion bezeichnet man die Differenzierung von pluripotenten Mesenchymzellen zu Knorpel- oder Knochen-bildenden Zellen mit darauf folgender Ossifikation (Glowacki et al., 2009). Dieser Vorgang wird durch osteoinduktive Zytokine, sogenannte Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) reguliert. Osteokonduktion beschreibt die Tatsache, dass ein Knochenersatzmaterial eine dreidimensionale Leitschiene für einwandernde mesenchymale Zellen sowie für neu einsprossende Gefäße bildet (Isaac et al., 2009; Zhou et al., 2010). Frischer, autogener spongiöser Knochen ist aber durch seine limitierte klinische Verfügbarkeit (Kobbe et al., 2008), den zusätzlichen chirurgischen Eingriff und dessen Komplikationen nur eingeschränkt nutzbar (Mazock et al., 2003; Niedhart et al., 2003). Als orale Entnahmestellen sind die Symphysen- und Kieferwinkelregion, Unterkieferrand sowie die Retromolarregion geeignet. Häufig verwendete extraorale Spenderregionen sind der anteriore und posteriore Beckenkamm, Rippe, Schädelkalotte oder Tibiakopf (Schlegel und Neukam, 2002).

Neben autologen Transplantaten werden allogene, kältekonservierte Bankknochen, xenogene Knochenpräparate (Hämmerle et al., 2008), bovine Proteinkomplexe (Kloss et al., 2004) sowie Knochenzemente (Wolff et al., 2004) und keramische Knochenersatzmaterialien seit Jahrzehnten erfolgreich im klinischen Alltag verwendet (Horch et al., 2006; Frenken et al., 2010). Bei allogenen Knochentransplantaten sind Spender und Empfänger genetisch nicht identisch und daher stellt der Transfer ein potentiell Infektionsrisiko dar (Kappe et al., 2010). Das Material hat allerdings den Vorteil, dass es in Knochenbanken in aufbereiteter Form verfügbar ist und somit ein Zweiteingriff zur Entnahme von autogenem Knochen vermieden werden kann.

Xenogene Knochenpräparate werden vorzugsweise von Rindern aber auch von Pferden gewonnen. Der Knochen wird chemisch und/oder physikalisch aufbereitet, so dass eine Abstoßungsreaktion oder die Übertragung von Krankheiten ausgeschlossen werden kann. Sie wirken osteokonduktiv und werden von autogenem Knochen eingeschlossen, wobei die Abbaurate des Materials als gering eingeschätzt wird (Cordaro et al., 2008).

Knochenzemente hingegen sind aus einer oder mehreren Pulverkomponenten und einer flüssigen Phase zusammengesetzt. Vermischt, bildet sich eine frei formbare, pastöse Masse, welche nach der Applikation in den knöchernen Defekt in situ abbindet. Es werden Hydroxylapatit-bildende und Bruschtit-Zemente voneinander unterschieden.

Die als Knochenersatzmaterial verwendeten Keramiken werden aus biologisch oder synthetisch gewonnenem Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) oder Trikalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) hergestellt. Hydroxylapatit-Keramik wird vom Empfänger nur sehr langsam oder gar nicht abgebaut (Schnürer et al., 2003). Trikalziumphosphat-Keramik dagegen löst sich innerhalb von 6 bis 24 Monaten auf, wobei der frei werdende Raum durch neu gebildeten Knochen ausgefüllt wird (Nair et al., 2006). Ein Nachteil von alloplastischen Keramiken ist, dass sie keine eigene biologische Aktivität, nur rein osteokonduktive Eigenschaften besitzen (Horch et al., 2006). Das osteokonduktive Potenzial der Keramik hängt dabei von der Morphologie, Porosität und der verwendeten Kalziumphosphat-Phase ab (Knabe et al., 2008). Allerdings werden anorganische Kalziumphosphat-Keramiken synthetisch hergestellt. Damit können bei gleich bleibender Chargenqualität physio- und kristallchemische Eigenschaften genau definiert und biologische Reaktionen besser abgeschätzt werden (Horch et al., 2006). Zudem können sie problemlos gelagert werden, sind nicht toxisch, immunologisch inert und weder kanzerogen noch teratogen. Sogenannte Biphasische Kalziumphosphate (BCP) stellen eine Mischung aus Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat dar. Sie vereinen die Vorteile beider Materialien, wobei das schwer lösliche Hydroxylapatit osteokonduktiv wirkt und als osseointegriertes Restmaterial im Knochen verbleibt. Das Trikalziumphosphat, welches 40–60 % der Masse ausmacht, löst sich mit der Zeit auf und setzt Ca^{2+} -Ionen frei, was sich positiv auf die Knochenneubildung auswirkt (Fellah et al., 2008). Zudem wird durch diese zusätzlich geschaffenen Porositäten die knöcherne Durchbaurate erhöht. Für Biphasische Kalziumphosphate ist außerdem eine osteoinduktive Wirkung nachgewiesen (Habibovic et al., 2008).

Durch rekombinant hergestellte BMPs (bone morphogenetic proteins), welche nicht auf die Präexistenz vitaler Knochenzellen angewiesen sind (Chen et al., 2004), sondern die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten bewirken (Urist et al., 1967; Kempen et al., 2009) und den Einsatz von rekombinanten Wachstumsfaktoren (Mitogene) wie z.B. „Insulin-like growth factor-1 und -2“ (IGF-1, IGF-2), „transforming growth factor-1 und -2“ (TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3), „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „Acidic and basic fibroblast growth factor“ (aFGF und bFGF) sind neue Konzepte zum genetisch induzierten Knochenwachstum entstanden (Devescovi et al., 2008). Bisher konnten über 40 BMPs isoliert, charakterisiert und gentechnisch hergestellt werden (Ducy und Karsenty, 2000), wobei von den bekannten BMPs insbesondere BMP-2, BMP-6, BMP-7 und BMP-9 osteoinduktiv wirken (Terheyden und Jepsen, 1999; Kroccek et al., 2010).

Die osteoinduktive Reaktionsweise der BMPs ist dabei dosisabhängig (Chen et al., 2004). Es muss allerdings beachtet werden, dass Gewebsproteasen in der Wunde rekombinante Wirkstoffe schnell zersetzen oder diese ungenutzt in die Umgebung diffundieren können. Daher muss auf eine geeignete Trägersubstanz geachtet werden, um eine maximale Expositionszeit auf Stammzellen und möglichst lange Interaktionszeit mit anderen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu ermöglichen (Fu et al., 2008). Die Trägersubstanz erfüllt dabei gleichzeitig eine Platzhalterfunktion, um den Knochendefekt gegenüber dem Weichgewebsdruck offen zu halten, bis sich genügend neuer Knochen gebildet hat. Zudem sollte die Trägersubstanz osteokonduktiv wirken und gegenüber den neu entstehenden Osteoblasten eine Matrix- und Leitschienenfunktion haben (Davis et al., 2009; Roosa et al., 2010).

In Verbindung mit Knochenersatzmaterialien sind auch immer wieder thrombozytäre Wachstumsfaktoren verwendet worden. Die Effektivität von plättchenreichem Plasma (PRP) ist allerdings von lokal bereits existierenden, vitalen Knochenzellen abhängig (Schlegel et al., 2003). Mehrere Studien haben die Wirkung von PRP auch in Verbindung mit Knochenersatzmaterial untersucht (Fürst et al., 2003; Wiltfang et al., 2004; Döri et al., 2009; Harnack et al., 2009) und kamen zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen. Letztendlich konnte nicht geklärt werden, ob durch die Verwendung von PRP ein stimulierender Effekt auf die knöcherne Regeneration erzielt wird.

Weiterhin wird in experimentellen und klinischen Studien die Verwendung kultivierter Osteoblasten zur zusätzlichen Versorgung von Kieferknochendefekten untersucht (Li et al., 2008). Zudem wird durch geeignete 3D-Gerüste, bestehend aus z.B. Hydroxylapatit und Kollagen versucht, die natürliche, extrazelluläre Matrix des Knochens zu imitieren (Jones et al., 2010). Diese Gerüste (sog. scaffolds) werden mit Wachstumsfaktoren, Mitogenen und humanen Knochenvorläuferzellen beschickt und in Bioreaktoren erfolgen Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen (Lv et al., 2009). Danach können die „scaffolds“ als potente Knochenersatzmaterialien in vivo verwendet werden (Xu et al., 2010).

1.3. Die Eigenblutfüllung von Knochendefekten („Schulte-Koagulum“)

Neben diesen, bereits erwähnten Materialien und Methoden, wird das von Willi Schulte in die Zahnheilkunde eingeführte Verfahren, mit einem stabilisiertem Eigenblutkoagulum kleine bis mittelgroße intraorale Knochendefekte zu füllen, auch heute noch klinisch sehr erfolgreich angewendet.

Es besteht klassischerweise aus Vollblut, Penizillin G, Thrombin und einem Gelatineschwamm (Schulte, 1959). Die Materialien werden in einem sterilen Behälter in einer bestimmten Reihenfolge vermischt und in den Knochendefekt appliziert. Das Operationsgebiet wird durch eine primäre Naht verschlossen. Den Erfolg seiner Methode begründete Schulte mit der durch den Gelatineschwamm hervorgerufenen Retraktionstabilität und die durch Thrombin verstärkten Koagelfestigkeit (Schulte, 1964). Das Koagulum liegt daher randständig im knöchernen Defekt und kann von allen Seiten her organisiert und durch Knochen ersetzt werden. Es wird in der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bis heute als Standardverfahren sehr erfolgreich nach Entfernung von benignen Tumoren, retinierten Weisheitszähnen oder nach Zystektomie angewandt.

1.3.1 Penizillin G

Penizillin G (Benzylpenizillin) wurde ursprünglich aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* gewonnen und ist strukturell ein β -Lactam-Antibiotikum. Es besitzt eine bakterizide Wirkung, indem es die Synthese der Mureinschicht der Bakterienzellwand irreversibel unterbindet. Als Folge dieser Störung lassen sich morphologische Veränderungen wie Deformierung und Lyse der Wand beobachten. Es ist besonders gut bei grampositiven Bakterien wirksam, da diese einen hohen Mureinanteil in der Zellwand aufweisen, hat insgesamt aber nur ein schmales Wirkspektrum. Vorteile von Penizillin G sind die sehr gute allgemeine Verträglichkeit sowie die große therapeutische Breite, zudem werden niedrige Antibiotikaresistenzen gegen Penizillin G im klinisch wichtigen anaeroben Bereich angegeben (Höhne et al., 1997; Eckert et al., 2000). Die dominierenden Keime dentaler Infektionen *Prevotella sp.*, *Peptostreptococcus sp.* und *Propionibacterium sp.* sind gegenüber Penizillin G nach wie vor ausreichend empfindlich (Eckert et al., 2005; Al-Nawas und Mäurer, 2008). Wichtigste Nebenwirkungen sind allergische Reaktionen, die zumeist als kutane Überempfindlichkeit mit einer Inzidenz von bis zu 5 % in Erscheinung treten (Reichl et al., 2007). Anaphylaktische Zustände nach Penizillingabe sind nur in ca. 0,04 % der Fälle zu erwarten (Rahn und Knothe, 1991).

Penizillin G kann nicht oral angewandt werden, da es durch die Magensäure gespalten und damit inaktiviert wird.

Zudem führt Penizillin bei lokaler Applikation zu einer deutlichen Verzögerung der Gerinnbarkeit des Blutes, und ab Konzentrationen von 7.500 IE/ml ist eine Gerinnung ausgeschlossen (Schulte, 1960a). Andere Autoren benennen mit 25.000 IE/ml (Fleming und Fish, 1947) und 60.000 IE/ml (Gross und Matis, 1952) allerdings deutlich höhere Werte. Ursachen hierfür sind eine Störung der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung sowie die Hemmung der Thrombozytenaggregation (Cazenave et al., 1973; Pastakia et al., 1993). Im Übrigen ist der gerinnungshemmende Effekt dabei nicht allein auf die Penizilline beschränkt, sondern auch bei anderen Antibiotika feststellbar (Natelson et al., 1976). Die Gerinnungskaskade im Schulte-Koagulum wird deshalb durch extern zugeführtes Thrombin angestoßen.

1.3.2 Thrombin und Thrombinrezeptor

Thrombin ist das Endprodukt der Gerinnungskaskade und besitzt sowohl enzymatische als auch hormonartige Eigenschaften (Dery et al., 1998). Es entsteht im Verlauf der sekundären Hämostase proteolytisch aus dem Prothrombinasekomplex. Die primäre Aufgabe des Thrombins besteht in der Umwandlung von löslichem Fibrinogen in Fibrinmonomere, welche zusammengelagert als Fibrinpolymere das fädige Gerüst des Gerinnsels bilden. Zudem kann Thrombin auch im Rahmen der primären Hämostase an spezifische Rezeptoren der Thrombozytenmembran binden und induziert dadurch die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine sowie gemeinsam mit ADP die Abgabe von Ca^{2+} aus den elektronendichten Granula in das Zytosol der Thrombozyten. Dadurch wird eine Ca^{2+} -abhängige Phospholipase A_2 aktiviert, welche die Freisetzung von Arachidonsäure katalysiert. Diese wird durch die Enzyme Zyklooxygenase und Thromboxan-Synthetase in die zyklischen Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 und weiter in Thromboxane umgewandelt. Die Endoperoxide und Thromboxan A_2 tragen dann im Zusammenspiel mit freigesetzten Inhaltsstoffen aus Granula der Thrombozyten zur irreversiblen Aggregation der Blutplättchen bei. Die Thrombozyten bilden dabei mit der Fibrinmatrix das Blutgerinnsel (Jelkmann, 2005).

Bei der Thrombolyse, dem Auflösen des Gerinnsels, wird aktives Thrombin freigesetzt, was zelluläre Effekte nach sich zieht. So reguliert Thrombin inflammatorische Prozesse in Leukozyten und Makrophagen (Bar-Shavit et al., 1992) und für die Knochenbildung wichtig, hat es mitogene Effekte auf mesenchymale Zellen (Clohisy et al., 1990), Fibroblasten (Gandossi et al., 2000), Lymphozyten (Naldini et al., 1993) sowie glatte Muskelzellen (Graham und Alexander, 1990).

Grundlegende strukturelle Eigenschaften des Thrombins wurden im Jahr 1989 aufgeklärt (Bode et al., 1989). Aktiviertes α -Thrombin besteht aus zwei durch eine Disulfidbrücke kovalent verbundene Polypeptidketten. Die A-Kette wird aus 36 Aminosäuren, die B-Kette aus 259 Aminosäuren gebildet (Degen et al., 1983). Aus der ellipsoid-dreidimensionalen Thrombinstruktur ergeben sich mehrere Besonderheiten der Serinprotease Thrombin. So befindet sich an der „Vorderseite“ des Moleküls eine Vertiefung, die sogenannte „active-site cleft“, in der sich das katalytische Zentrum befindet. Diese trägt zur hohen Spezifität des Thrombins bei, da sie für makromolekulare Substanzen schlecht zugänglich ist. Zudem verfügt Thrombin über einen Bereich mit besonders hoher positiver Ladungsdichte, die sogenannte „anion binding exosite“. Hierüber bindet Thrombin spezifisch an negative Ladungskomplexe und steuert über das katalytische Zentrum die proteolytische Aktivität, die für die zellulären Effekte verantwortlich ist (Bode et al., 1989). Besonders interessant ist die Art und Weise, wie Thrombin die Rezeptoraktivierung herbeiführt. Es aktiviert seinen Protease-aktivierten-Rezeptor (PAR) durch enzymatische Spaltung (Bahou, 2007). Dazu bindet Thrombin über die „anion binding exosite“ an den Rezeptor, der durch sieben transmembranale Helices gekennzeichnet ist und spaltet ihn am aminoterminalen Ende zwischen der Position Arginin-41 und Serin-42. Der dadurch neu entstehende Aminoterminus (SFLLRN) fungiert als Ligand für das Rezeptormolekül (Vu et al., 1991b). Dieser Mechanismus der Rezeptoraktivierung ist irreversibel (Coughlin, 1999). Entsprechend dem neuen aminoterminalen Ende können ebenfalls synthetische Peptide an den Rezeptor binden und Thrombineffekte imitieren. Dabei wird ein Minimum von fünf Aminosäuren benötigt, um den humanen PAR-1 vollständig zu aktivieren (Vouret-Craviari et al., 1992; Scarborough et al., 1992).

Neben dem PAR-1 gehören drei weitere Rezeptoren zur Familie der Protease-aktivierten-Rezeptoren. Der Protease-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) wird insbesondere von intestinalen Epithelzellen exprimiert, wurde aber auch in anderen Geweben wie z.B. Pankreas, Niere, Leber, Atemwege und im Ovar gefunden. Sowohl die physiologische Funktion von PAR-2 in diesen Geweben als auch die Proteasen, die den Rezeptor hier aktivieren, sind nur teilweise bekannt. Im intestinalen Lumen allerdings sind Trypsin und Mastzelltryptase potente Aktivatoren (Molino et al., 1997). PAR-3 wiederum wird im Knochenmark, von Endothelzellen sowie in geringer Anzahl von Thrombozyten (ca. 200 Rezeptoren pro Thrombozyt) exprimiert (Schmidt et al., 1998).

Zu 27 % sind die Aminosäuresequenzen von PAR-3 zu PAR-1 homolog (Ishihara et al., 1997), aber anders als PAR-1, wird PAR-3 zwischen der Position Lysin-38 und Threonin-39 gespalten. PAR-3 ist dabei alleinig auf Thrombin empfindlich, andere Proteasen wie Trypsin, Faktor Xa, Faktor VIIa oder Plasmin führen zu keiner Rezeptoraktivierung (Cupit et al., 1999). PAR-4 wurde insbesondere in Lunge, Pankreas und Schilddrüse aber auch in Endothelzellen und auf Thrombozyten identifiziert (Xu et al., 1998). Dreiunddreißig Prozent seiner Aminosäuresequenzen sind zu PAR-1 und PAR-3 homolog und ebenso ist Thrombin der primäre Aktivator. Allerdings werden experimentell höhere Thrombinkonzentrationen (5 nM) benötigt, um eine Rezeptoraktivierung an PAR-4 herbeizuführen, was mit der Abwesenheit der auf PAR-1 und PAR-3 vorhandenen „thrombin-interactive hirudin-like exodomain“ verbunden wird (Kahn et al., 1998). Thrombin spaltet den Rezeptor hierbei zwischen Arginin-47 und Glycin-48.

Die humanen Protease-aktivierten Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und können intrazellulär viele verschiedene Reaktionen auslösen. So können heterotrimere und monomere G-Proteine sowie Protein-Tyrosinkinasen aktiviert werden. Weiterhin kann es zur Hydrolyse von Phosphoinositiden sowie zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium kommen (Grand et al., 1996; Macfarlane et al. 2001).

1.3.3 Gelatineschwamm

Um die Stabilität des Schulte-Koagulums zu erhöhen und es gleichzeitig vor späterer Retraktion und entsprechendem Volumenverlust zu schützen, wird neben Vollblut, Penizillin und Thrombin auch ein Gelatineschwamm verwendet. Dieser ist steril, resorbierbar, fein porös, gewebeverträglich und besteht aus denaturierter Gelatine, welche durch Partialhydrolyse von Kollagen aus Schweineschwarten gewonnen wird. Er wird zur lokalen Blutstillung (Bechstein und Strey, 2007) und zur Tamponade von Gewebsdefekten nach operativen Eingriffen oder Zahnextraktionen verwendet. Die im gefriergetrockneten Schwamm enthaltene Gelatine ist ein Hydrokolloid, das zu 80 % aus Protein und zu 20 % aus Wasser und Mineralsalzen besteht. Der Gelatineschwamm wird innerhalb von 2 bis 3 Wochen resorbiert und wirkt durch die poröse Struktur zusätzlich osteokonduktiv.

2. Zielstellung

In der von Linß (2006) durchgeführten Untersuchung an immortalisierten, osteoblastenartigen Mäusezellen (MC3T3-E1) konnte gezeigt werden, dass der klinische Erfolg des Schulte-Koagulums zur Füllung größerer intraoraler Knochendefekte nicht ausschließlich auf der Retraktionsstabilität des Koagulums beruht (Schulte, 1964), sondern dass auch von den einzelnen Bestandteilen Blut, Penizillin, Gelatineschwamm und Thrombin eine biologische Aktivität ausgeht. So wurden vor allem Thrombin und PDGF als mitogene Faktoren benannt. Blieb der Gelatineschwamm in diesem Sinn wirkungslos, so hatte Penizillin dagegen durchweg einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation. Allerdings war das Zusammenspiel und gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Komponenten, insbesondere Penizillin und Thrombin nicht ausreichend geklärt worden.

Daher wurden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Lässt sich der proliferationshemmende Penizillineffekt durch verschiedene Thrombinkonzentrationen aufheben?
2. Werden durch „Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide“ (TRAP) mitogene Effekte des Thrombins imitiert, so dass das im Schulte-Koagulum enthaltene bovine Thrombin durch TRAPs ersetzt werden kann?
3. Können bei gleichzeitiger Verwendung von TRAP und Thrombin synergistisch-proliferative Effekte identifiziert werden?
4. Wie hoch ist die proliferative Wirkung verschiedener PDGF-Konzentrationen einzuschätzen und sind diese Effekte hemmbar?
5. Wie hoch ist der Anteil am zellproliferativen Effekt des Schulte-Koagulums, hervorgerufen durch PDGF?

Diese Fragestellungen haben z. T. unmittelbaren klinischen Bezug, wenn man die Schwierigkeiten der Beschaffung von Thrombin nach der Produktionseinstellung des bovines Thrombins infolge der BSE-Krise in Europa bedenkt.

3. Materialien und Methoden

Zur wissenschaftlichen Evaluierung wurde ein in der Knochenforschung bewährtes Zellkulturmodell mit immortalisierten osteoblastenartigen Mäusezellen (MC3T3-E1) benutzt, deren Proliferationsrate unter reproduzierbaren Bedingungen als Kriterium untersucht worden ist. Ein optimiertes Tritium-Thymidin-Assay diente zur quantitativen Messung der Zellproliferation. Alle Versuche waren als Triplikate angelegt.

3.1 Materialien

Tab. 1: Materialien (Reagenzien und Bezugsquellen)

Reagenzien	Bezugsquelle
α -MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modifikation)	Sigma
BSA	Sigma
Ethanol	Roth
FKS	Biochrom AG
Gelaspon	Ankerpharm
HEPES	Roth
L- Glutamin	Sigma
Lumasafe plus (Szintillationsflüssigkeit)	Lumac LSC
[Methyl- ³ H]-Thymidin	Life Sciences Inc.
Natriumhydrogenkarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
PAR-1 Peptid (H-8365) - SFLLRN	Bachem Sequenz
PAR-3 Peptid (H-4452) - TFRGAP	Bachem Sequenz
PAR-4 Peptid (H-4348) - GYPGQV	Bachem Sequenz
PBS-Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom
PDGF-BB recombinant human	PeproTech Hamburg
Penizillin G	Sigma
Penizillin G 1 Mega	Jenapharm
Salzsäure	Merck
Natriumbikarbonat	Sigma

Streptomycin	Sigma
Thrombin, Topical (Bovine Origin)	Jones Pharma Inc.
Trichloressigsäure	Roth
Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%)	Sigma
Trypsin	Pan
Tyrphostin AG 1296	Calbiochem
Tyrphostin AG 1478	Calbiochem

Tab. 2: Materialien (Geräte und Hersteller)

Geräte	Hersteller
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
Wasserbad	GFL
Absauganlage	
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Saugflasche	Schott
Handstück „VacuSafe“	IBS Integra Bioscience

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der MC3T3- E1 Zellen

Für die Untersuchungen wurde eine Zelllinie embryonaler, fibroblastenartiger Mäusezellen (MC3T3-E1) verwendet. Diese wurde erstmals von Kodama et al. (1981) aus Kalotten neugeborener Mäuse isoliert und beschrieben. Sudo et al. beschreiben zwei Jahre später die Möglichkeit der *in vitro* Differenzierung zu Osteoblasten (Sudo et al., 1983). Die genutzte MC3T3-E1 Zelllinie stammte von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Renner, Frankfurt) in α -MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modifikation), angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 100 Einheiten/ml Penizillin und 100 μ g/ml Streptomycin (= α -MEM +) in humider Atmosphäre bei 6 % CO₂ und 37 °C unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator (BBD6220, Haereus). Der Einsatz von 100 IE/ml Penizillin und 100 μ g/ml Streptomycin im Nährmedium hatte keinen Effekt auf die MC3T3-E1 Zellen.

Alle 6 Tage wurde das Medium gewechselt, um eine gleichmäßige Nährstoffzufuhr der Zellen sicherzustellen. Nach 2 Wochen erfolgte die Auffrischung des Mediums mit 2 mM L-Glutamin. Für das Waschen der Zellen wurde Dulbecco's „Phosphate buffered saline“ ohne Calcium und Magnesium verwendet. Die Kulturmedien und verschiedenen Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Nachdem die Zellen annähernd konfluent waren, erfolgte das Passagieren der Zellen beziehungsweise die Aussaat für die Versuchsreihe.

Die Zellen wurden, nachdem das Zellkulturmedium mit Hilfe einer Absauganlage abgenommen worden war mit 10 ml PBS gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit 10 ml 0,25%-iger (v/v) Trypsinlösung inkubiert, bis die Zellen vom Boden der Zellkulturschale abgelöst waren. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die Zellsuspension in 10 ml α -MEM + aufgenommen. Durch mehrmaliges Aspirieren und Injizieren wurden die Zellen suspendiert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Renner, Dannstadt) überführt, weitere 10 ml α -MEM + zugefügt und 5 min bei 200 g zentrifugiert (Biofuge fresco, Haereus). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 20 ml α -MEM + resuspendiert und dieser Waschschrift einmal wiederholt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer und eines Phasenkontrastmikroskop konnte die Zellzahl ermittelt werden. Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte durch die Trypanblaufärbung. Für die durchgeführten Experimente fanden subkonfluente Zellen (70- 90 % der Zellkulturschale bewachsen) der 3.-10. Passage Verwendung.

3.2.2 Bestimmung des [³H]-Thymidineinbaus in MC3T3-E1 Zellen

Dazu wurden vitale MC3T3-E1 Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten zu je 100.000 Zellen pro Milliliter α -MEM + pro Loch transferiert und 24 Stunden bis zur Subkonfluenz im Inkubator gezüchtet. Danach wurde das serumhaltige Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit je einem Milliliter α -MEM \emptyset (ohne Serum) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Stimulation mit den entsprechenden zu untersuchenden Substanzen. Diese wurden, wenn nicht anders angegeben, in serumfreiem α -MEM \emptyset verdünnt und die Zellen damit zu je 1 ml pro Loch überschichtet. Nach 9 Stunden (optimale Stimulationszeit nach Linß, 2006) wurden die Zellen für weitere 18 Stunden mit je 0,5 μ Ci [³H]-Thymidin (spezifische Aktivität 2,0 Ci/mmol) pro 1 ml Ansatz auf der 24-Loch-Zellkulturplatte radioaktiv markiert. Anschließend wurde das radioaktive Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe einer 5%-igen (w/v) Trichloressigsäure (TCA)-Lösung (250 μ l/Loch) für 30 Minuten auf Eis fixiert.

Nachfolgend wurde die TCA-Lösung abgenommen und die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskaltem 90 %-igem Ethanol gewaschen. Durch Zugabe von je 200 μ l 1 M Natriumhydroxid-Lösung für 10 min auf Eis erfolgte die Lösung der Zellen. Durch das darauffolgende Hinzufügen von je 200 μ l 2 M Salzsäure erfolgte die Neutralisation. Die 400 μ l- Proben wurden vollständig in 5 ml-Szintillationsgefäße (Pony Vial, Canberra Packard) überführt und 4 ml Szintillationscocktail (Lumasafe Plus) zugegeben. Nachdem die Proben gründlich durchgemischt wurden, folgte eine dreistündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Der [³H]-Thymidin-Einbau wurde durch Liquid-Szintillationsmessung (Canberra Packard) bestimmt. Als Kontrolle dienten zellfreie Ansätze mit ebenfalls 0,5 μ Ci/ml [³H]-Thymidin Zugabe. Mit deren Hilfe wurde der prozentuale Anteil des eingebauten radioaktiv markierten Thymidins als Maß für die Zellproliferation ermittelt. Alle Messwerte wurden als Triplikate ausgeführt. Die statistische Auswertung und Signifikanzprüfung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 3.0.

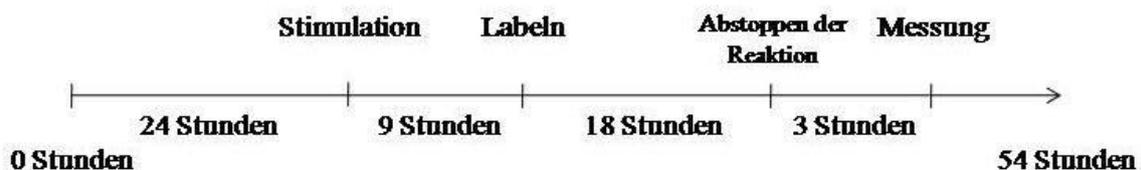


Abb.1: Zeitlicher Ablauf der Bestimmung des [³H]-Thymidineinbaus in MC3T3-E1 Zellen

3.2.3 Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit PDGF und Einfluss von Tyrphostin AG 1296 und Tyrphostin AG 1478

Der in den α -Granula von Thrombozyten gelagerte Wachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor) ist bei in vitro Zellversuchen als stark mitogen wirkender Faktor bekannt. Dies konnte ebenfalls durch Linß bei der untersuchten Zelllinie beobachtet werden (Linß, 2006). In den durchgeführten Untersuchungen wurden PDGF-Konzentrationen von 300 ng/ml, 100 ng/ml und 10 ng/ml verwendet. Die Hemmung der PDGF-Rezeptortyrosinkinaseaktivität erfolgte durch Verwendung von Tyrphostin AG 1296 (10 μ M) und Tyrphostin AG 1478 (10 μ M). Dazu wurden die MC3T3-E1 Zellen wie oben beschrieben auf einer 24-Loch-Zellkulturplatte zu 100.000 Zellen pro Loch ausgesät und 24 Stunden mit α -MEM + inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml α -MEM \emptyset gewaschen und für 10 Minuten mit AG 1296 (10 μ M) und/oder AG 1478 (10 μ M) inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mit verschiedenen PDGF-Konzentrationen und/oder Thrombin sowie Überständen aus miniaturisierten Schulte-Koagula. Die weitere Verfahrensweise entsprach dem in Punkt 3.2.2 beschriebenen Proliferationsassay.

3.2.4 Herstellung miniaturisierter Schulte- Koagula in vitro

Das Schulte-Koagulum besteht aus venösem Vollblut, Penizillin, Thrombin und einem Gelaspon[®]-Schwamm. Die Zusammensetzung der Bestandteile wurde unter sterilen Bedingungen simuliert. So wurde in einer 24-Loch-Zellkulturplatte Thrombin zu je 100 μ l pro Loch vorgelegt und mit 900 μ l frisch entnommenen venösem Vollblut auf die gewünschte Endkonzentration (1 IE/ml) verdünnt. Bei Versuchsansätzen ohne Thrombin wurde dieses durch 100 μ l physiologische NaCl-Lösung (0,9 %) ersetzt und mit 900 μ l Vollblut verdünnt. Der Gelaspon[®]-Schwamm wurde mittels sterilen Einmalskalpells (Aesculap) in ca. 1 cm³ große, kubische Stücke zerteilt. Diese wurden in die vorgelegten Ansätze überführt und mittels steriler Pipettenspitze vollständig benetzt. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die blutgetränkten Schwammstücke mit je einer Pipettenspitze in je 1100 μ l physiologische NaCl-Lösung überführt. Nachdem der Ansatz zum Lösen der Bestandteile gerührt worden war, erfolgte nach 5, 30 und 60 Minuten die Abnahme von jeweils 800 μ l Überstand. Es schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 200 g an.

Vom nunmehr klaren Überstand wurden jeweils 100 µl abgenommen und als Stimulus auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Die weitere Verfahrensweise entsprach dem bei 3.2.2 beschriebenen Vorgehen zum Proliferationsassay.

3.2.5 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

Das Anfärben der MC3T3-E1 Zellen mit Trypanblau ermöglichte die Unterscheidung in vitale und nicht vitale Zellen.

Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale erfolgte wie in Punkt 3.2.1 beschrieben durch Verwendung von 0,25%-igem Trypsin (v/v). Zum Abstoppen der Reaktion kam es durch Zugabe von 10 ml α -MEM +. Die Überführung der Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen und eine 5-minütige Zentrifugation bei 200 g schlossen sich an. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend in 10 ml α -MEM + resuspendiert und der Waschschrift einmal wiederholt. Daraufhin erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 5 ml PBS (pH 7,4) und die Auszählung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl wurde daraufhin auf 100.000 Zellen pro ml eingestellt. Auf 500 µl Zellsuspension wurden 100 µl Trypanblau pipettiert. Nach einer Minute erfolgte die Zählung der gefärbten und ungefärbten Zellen, wobei sich vitale Zellen als ungefärbt darstellten. Nach Ermitteln der Mittelwerte konnte der prozentuale Anteil vitaler Zellen errechnet werden.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Thrombin und Penizillin auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen

Wie bei Linß (2006) dargestellt, hemmt Penizillin die Proliferationsrate konzentrationsabhängig bis die Zellen bei einer Penizillinkonzentration von 100.000 IE/ml absterben. Zudem wurden Versuche durchgeführt, die bestätigen, dass durch die Zugabe von 1 IE/ml Thrombin dieser negative Proliferations-effekt teilweise aufgehoben werden kann. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten, wurden Penizillinkonzentrationen von 100 – 100.000 IE/ml und Thrombinkonzentrationen von 0,3 – 100 IE/ml verwendet und kombiniert, um deren Wechselwirkungen bestimmen zu können.

4.1.1 Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 100.000 IE/ml

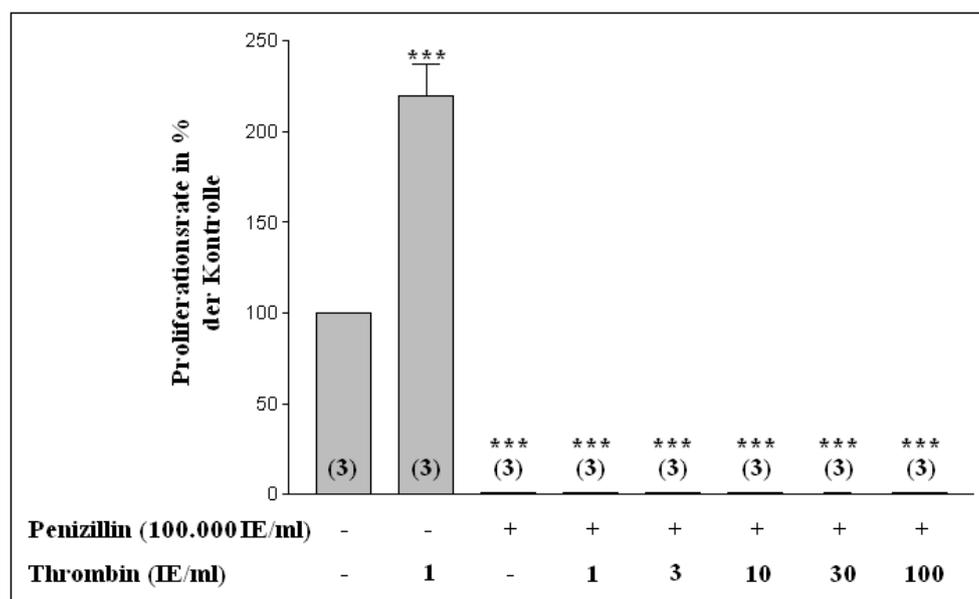


Abb.2: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit 100.000 IE/ml Penizillin und verschiedenen Thrombinkonzentrationen

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Penizillin in einer Konzentration von 100.000 IE/ml sowie verschiedenen Thrombinkonzentrationen (1-100 IE/ml) inkubiert. Die pH-Wert-Stabilisierung erfolgte mit 40 mM HEPES. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelexperimente ist in Klammern angegeben. $n=3$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t -Test im Vergleich zur Kontrolle *** $p \leq 0,005$. Die unstimulierte Kontrolle entspricht jeweils 100 % (siehe folgende Abbildungen).

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, erfolgte eine Verdopplung der Proliferationsrate durch Stimulation mit 1 IE/ml Thrombin ($220 \pm 17 \%$). Bei jedem durchgeführten Experiment wurde dieser Wert mit aufgeführt, um zu kontrollieren, ob die Zellen auf die verwendeten Stimulanzen reagierten. Die Stabilisierung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit 40 mM HEPES. Dies hatte keinen Einfluss auf die Proliferation (Ergebnisse nicht dargestellt). Weiterhin kann man erkennen, dass Thrombin auch in hohen Konzentrationen von bis zu 100 IE/ml das Absterben der MC3T3-E1-Zellen nicht verhindern konnte. Der Zelltod wurde mit Trypanblaufärbung verifiziert.

4.1.2 Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 10.000 IE/ml

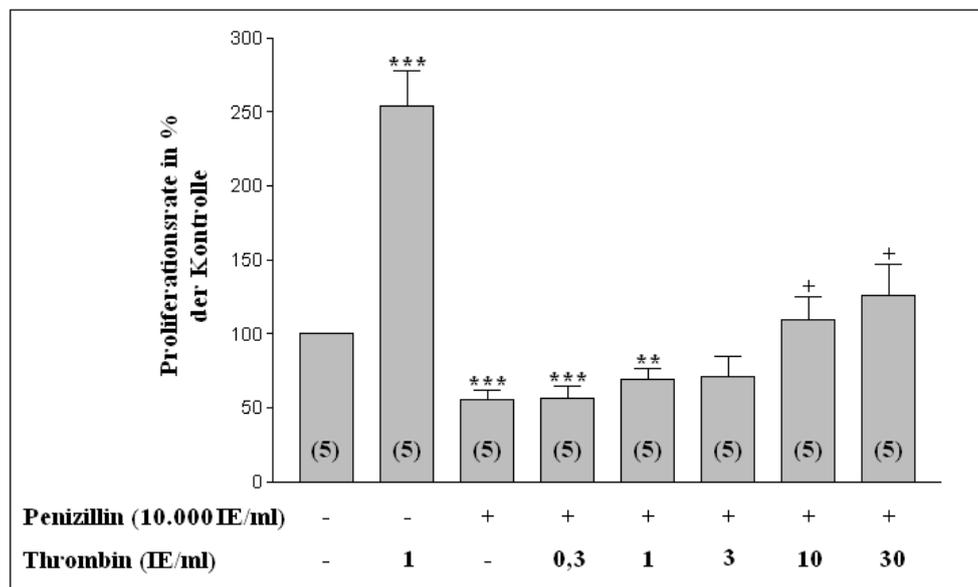


Abb.3: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit 10.000 IE/ml Penizillin und verschiedenen Thrombinkonzentrationen

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Penizillin in einer Konzentration von 10.000 IE/ml sowie verschiedenen Thrombinkonzentrationen (0,3-30 IE/ml) inkubiert. Die pH-Wert-Stabilisierung erfolgte mit 40 mM HEPES. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelexperimente ist in Klammern angegeben. $n=5$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,005$ und im Vergleich zur Hemmung mit 10.000 IE/ml Penizillin $+p \leq 0,05$

Durch 1 IE/ml Thrombin stieg die Proliferation signifikant auf $253 \pm 24 \%$. Die alleinige Inkubation mit 10.000 IE/ml Penizillin führte zu einer signifikant verminderten Proliferation ($p = 0,0001$) der MC3T3-E1 Zellen auf nur noch $56 \pm 6 \%$.

Durch Addition von 0,3 IE/ml Thrombin ergaben sich keine Unterschiede ($56 \pm 8 \%$). Die Zugabe von 1 IE/ml Thrombin bewirkte weiterhin eine signifikante Proliferationshemmung auf nunmehr $69 \pm 7 \%$ ($p = 0,0023$). Durch die Kombination mit 3 IE/ml Thrombin ließ sich wiederum eine Proliferationshemmung auf $71 \pm 13 \%$ feststellen, allerdings war diese nicht mehr signifikant gegenüber dem Kontrollniveau gehemmt. Bereits die Zugabe von 10 IE/ml Thrombin erhöhte die Proliferation auf $109 \pm 16 \%$. Dieser Wert ist gegenüber der alleinigen Inkubation mit 10.000 IE/ml Penizillin signifikant erhöht ($p = 0,0142$). Auch die gemeinsame Inkubation mit 30 IE/ml Thrombin erhöhte die Proliferation signifikant gegenüber Penizillin allein auf $126 \pm 20 \%$ ($p = 0,0105$).

4.1.3 Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 1.000 IE/ml

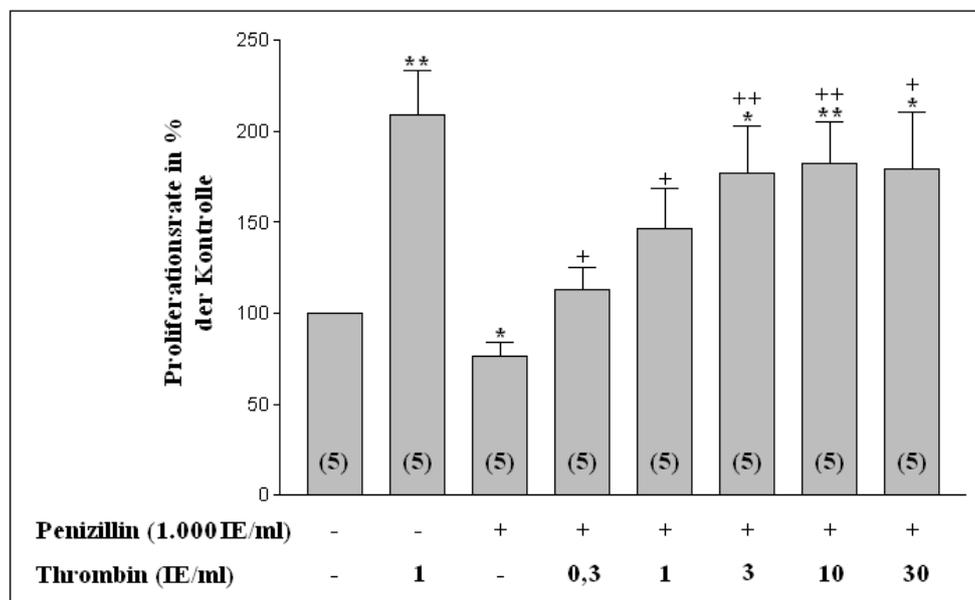


Abb.4: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit 1.000 IE/ml Penizillin und verschiedenen Thrombinkonzentrationen

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Penizillin in einer Konzentration von 1.000 IE/ml sowie verschiedenen Thrombinkonzentrationen (0,3-30 IE/ml) inkubiert. Die pH-Wert-Stabilisierung erfolgte mit 40 mM HEPES. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=5$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und im Vergleich zur Hemmung mit 1.000 IE/ml Penizillin + $p \leq 0,05$; ++ $p \leq 0,01$

Wie erwartet, steigerte sich die Proliferation auf 209 ± 24 % bei Stimulation der Zellen mit 1 IE/ml Thrombin. Durch den Einsatz von 1.000 IE/ml Penizillin wurde die Proliferation gegenüber der Kontrolle signifikant auf 76 ± 7 % gehemmt ($p = 0,0139$). Schon die zeitgleiche Stimulation mit 0,3 IE/ml und 1 IE/ml Thrombin steigerte die Zellproliferation signifikant gegenüber der Hemmung durch Penizillin auf 113 ± 13 % und 146 ± 13 %. Nach gleichzeitiger Stimulation der MC3T3-E1 Zelllinie mit 1.000 IE/ml Penizillin und 3 IE/ml Thrombin ließ sich eine Proliferation von 177 ± 26 % feststellen. Durch Verwendung von 10 und 30 IE/ml Thrombin ergaben sich mit 182 ± 22 % und 179 ± 32 % kaum gesteigerte Werte. Allerdings wurde mit diesen Thrombinkonzentrationen (3, 10 und 30 IE/ml) ein signifikanter Proliferationsanstieg sowohl gegenüber der Kontrolle als auch der alleinigen Hemmung mit Penizillin beobachtet.

4.1.4 Thrombineffekt bei einer Penizillinkonzentration von 100 IE/ml

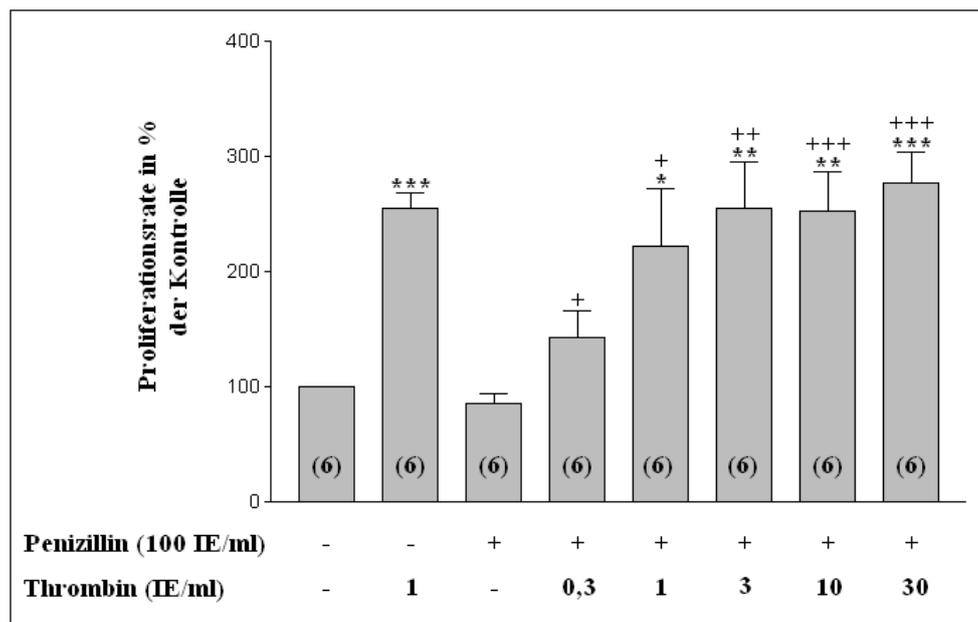


Abb.5: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit 100 IE/ml Penizillin und verschiedenen Thrombinkonzentrationen

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Penizillin in einer Konzentration von 100 IE/ml sowie verschiedenen Thrombinkonzentrationen (0,3-30 IE/ml) inkubiert. Die pH-Wert-Stabilisierung erfolgte mit 40 mM HEPES. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=6$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$ und im Vergleich zur Hemmung mit 100 IE/ml Penizillin + $p \leq 0,05$; ++ $p \leq 0,01$; +++ $p \leq 0,005$

Die Stimulation der MT3C3-E1 Zellen mit 1 IE/ml Thrombin steigerte die Proliferation wie erwartet um mehr als das Doppelte des Kontrollniveaus auf 254 ± 13 %. Erfolgte die Stimulation ausschließlich mit 100 IE/ml Penizillin, so war eine minimale, nicht signifikante Hemmung der Proliferation gegenüber der unstimulierten Kontrolle zu erkennen (85 ± 9 %). Bei gleichzeitiger Verwendung von Penizillin (100 IE/ml) und der Minimalkonzentration von 0,3 IE/ml Thrombin war eine signifikante Erhöhung der Proliferation gegenüber dem alleinigen Penizillinwert auf 142 ± 23 % zu verzeichnen ($p = 0,0405$). Mit zunehmender Thrombin- (1, 3, 10 und 30 IE/ml) aber gleichbleibender Penizillinkonzentration (100 IE/ml) erhöhten sich auch die ermittelten Proliferationswerte auf 221 ± 51 %, 254 ± 41 %, 252 ± 35 % und 276 ± 27 % und lagen damit in etwa in identischen Bereichen. Allerdings unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Signifikanzen gegenüber der Kontrolle sowie dem alleinigen Penizillinwert deutlich ($p \leq 0,01$ bis $p \leq 0,005$). Zudem wird zwar schon durch zeitgleiche Stimulation von 100 IE/ml Penizillin und 3 IE/ml Thrombin die proliferative Wirkung wie bei alleiniger Stimulation durch 1 IE/ml Thrombin erreicht, allerdings konnte auch nach Steigerung des zusätzlichen Thrombinstimulus auf 10 oder 30 IE/ml kein weiterer, signifikanter Proliferationszuwachs registriert werden.

4.2 Einfluss von Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen

Synthetisch hergestellte Peptide, welche dem Aminoterminus des aktivierten Thrombinrezeptors entsprechen, können an Thrombinrezeptor binden und verschiedene Effekte von Thrombin nachahmen. Man bezeichnet sie als Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide. Der Thrombinrezeptor gehört zu den Protease-aktivierten Rezeptoren. Es sind vier Protease-aktivierende Rezeptoren (PAR) bekannt: PAR-1 (Vu et al., 1991a), PAR-2 (Nystedt et al., 1994), PAR-3 (Ishihara et al., 1997) und PAR-4 (Xu et al., 1998). MC3T3-E1 Zellen exprimieren PAR-1 sowie PAR-3 und zusätzlich nach Thrombinstimulation PAR-4 (Bluteau et al., 2006). PAR-2 wird durch Trypsin aktiviert (Nystedt et al., 1994) und wurde deshalb nicht untersucht.

Um einen Aktivitätsverlust der Peptide auszuschließen, wurde durch Plättchenaggregationversuche nachgewiesen, dass peptidhaltiges Zellkulturmedium in der Lage ist, Thrombozyten zu aktivieren. (Ergebnisse nicht dargestellt)

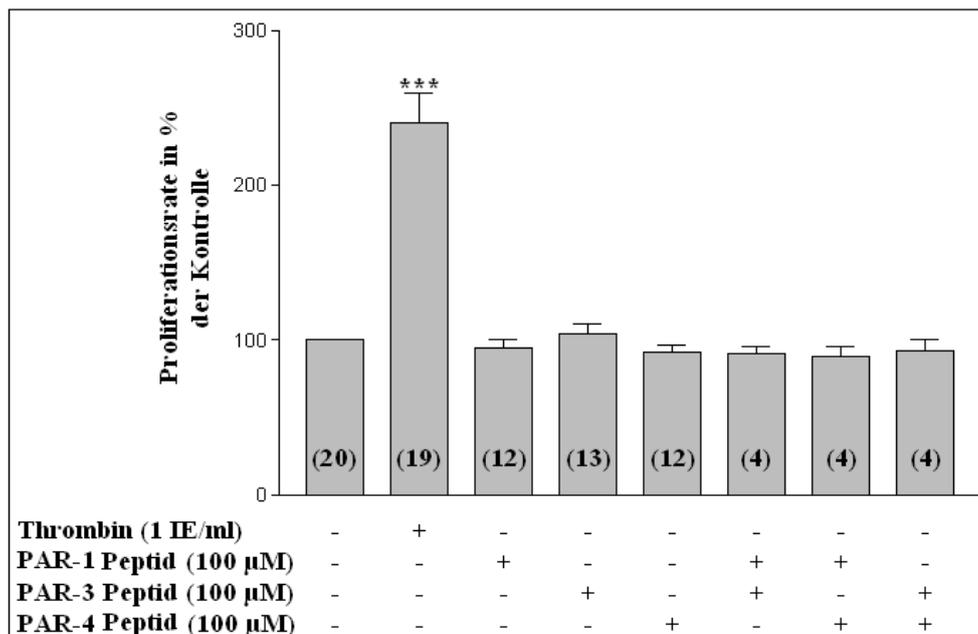


Abb.6: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM)

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), 1 IE/ml Thrombin und verschiedenen Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) stimuliert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 µCi/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelexperimente ist in Klammern angegeben. $n=4-20$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle *** $p \leq 0,005$

Thrombin steigerte die Proliferation erwartungsgemäß auf 241 ± 18 %. Die jeweilige Stimulation mit PAR-1 Peptid, PAR-3 Peptid und PAR-4 Peptid in einer Konzentration von 100 µM beeinflusste die basale Proliferation nicht (95 ± 5 %; 104 ± 7 % und 92 ± 4 %).

Auch durch eine Kombination der einzelnen Peptide untereinander wurde die Proliferation nicht verändert. So ergab sich für das PAR-1 Peptid und PAR-3 Peptid ein Proliferationswert von 91 ± 4 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Die Kombination von PAR-1 Peptid und PAR-4 Peptid löste eine Proliferation von 90 ± 6 % aus. Die gleichzeitige Stimulation durch PAR-3 Peptid und PAR-4 Peptid beeinflusste den Basalwert nicht nennenswert auf 93 ± 8 %.

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide allein keinen proliferativen Einfluss auf MC3T3-E1 Zellen ausüben.

4.3 Einfluss von Thrombin und Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide allein und untereinander kombiniert, keinen Einfluss auf den [H^3]-Thymidin-Einbau in die MC3T3-E1 Zellen haben, wurde untersucht, ob additive Effekte im Zusammenspiel mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen bestehen.

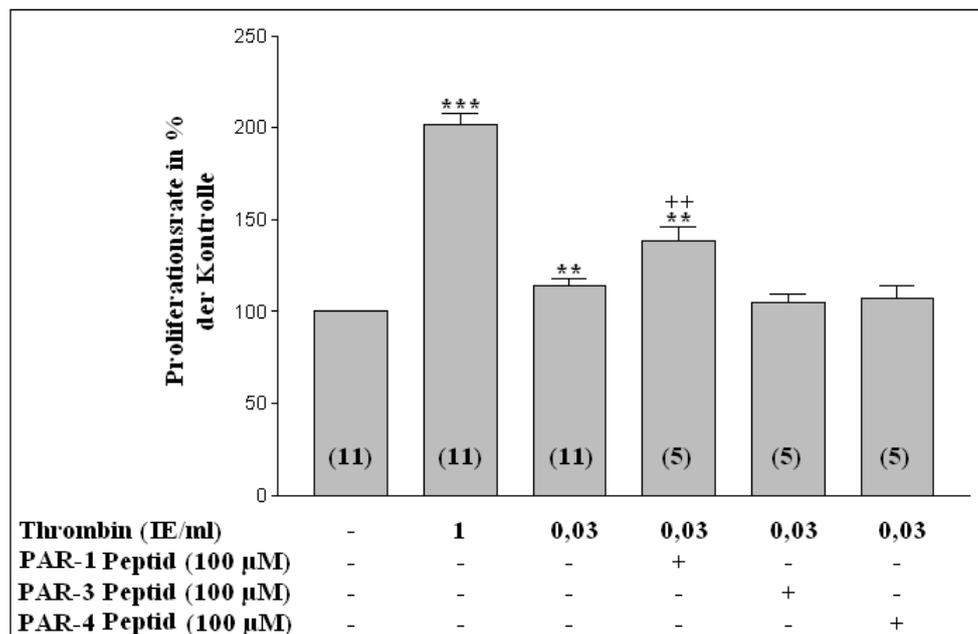


Abb.7: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100 μ M) und 0,03 IE/ml Thrombin

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100 μ M) sowie Thrombin (0,03 IE/ml) inkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=5-11$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,005$ und im Vergleich zur Stimulation mit 0,03 IE/ml Thrombin $++p \leq 0,01$

Erneut wurde die Funktionalität der Zelllinie mit 1 IE/ml Thrombin getestet. Hierbei wurde die Proliferation erwartungsgemäß verdoppelt (201 ± 7 %). Die Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit 0,03 IE/ml Thrombin steigerte die Proliferation signifikant auf 114 ± 4 %. Bei zeitgleicher Stimulation mit PAR-3 Peptid und PAR-4 Peptid war kein zusätzlich proliferativer Effekt zu beobachten (105 ± 5 % und 108 ± 7 %).

Allerdings ließ sich bei gleichzeitiger Stimulation mit dem PAR-1 Peptid ein signifikanter Proliferationsanstieg ($p = 0,007$) gegenüber der alleinigen Stimulation mit 0,03 IE/ml Thrombin auf $138 \pm 8 \%$ feststellen.

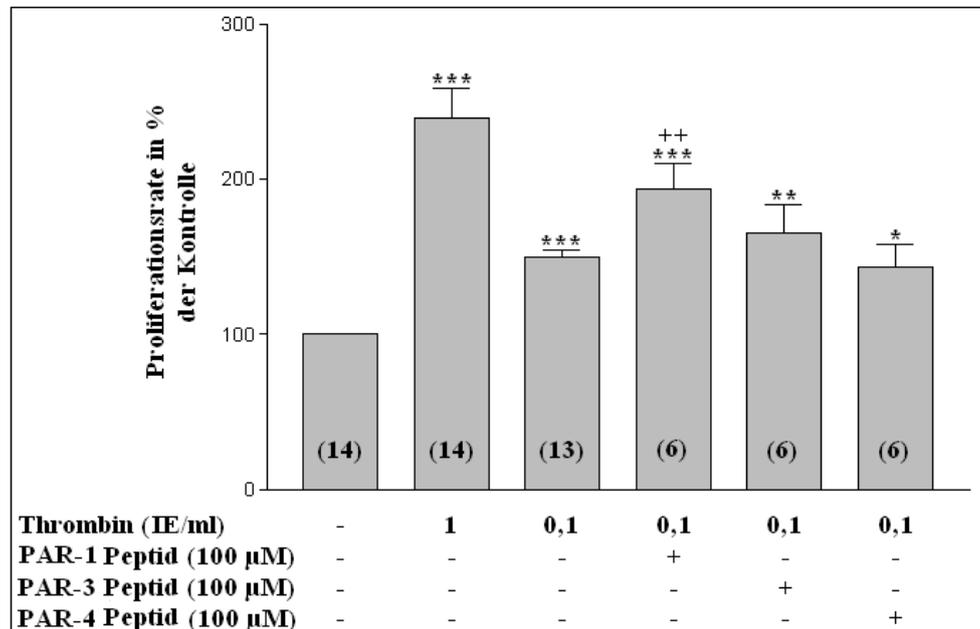


Abb.8: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) und 0,1 IE/ml Thrombin

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) sowie Thrombin (0,1 IE/ml) inkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 µCi/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=6-14$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem *t*-Test im Vergleich zur Kontrolle * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$ und im Vergleich zur Stimulation mit 0,1 IE/ml Thrombin ++ $p \leq 0,01$

Durch Stimulation mit 0,1 IE/ml Thrombin wurde eine signifikante Proliferationssteigerung auf $150 \pm 4 \%$ beobachtet. Durch die gleichzeitige Inkubation mit dem PAR-3 Peptid ($166 \pm 18 \%$) konnte zwar eine Proliferationssteigerung beobachtet werden, diese war allerdings gegenüber dem Thrombinstimulus nicht signifikant. Bei zusätzlicher PAR-4 Peptid Stimulation ($144 \pm 15 \%$) ließen sich keine Effekte gegenüber der alleinigen Stimulation mit 0,1 IE/ml Thrombin nachweisen.

Die zeitgleiche Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit 0,1 IE/ml Thrombin und 100 µM PAR-1 Peptid führte jedoch zu einer signifikanten Proliferationssteigerung ($p = 0,003$) gegenüber der alleinigen Aktivierung durch 0,1 IE/ml Thrombin auf $194 \pm 16 \%$.

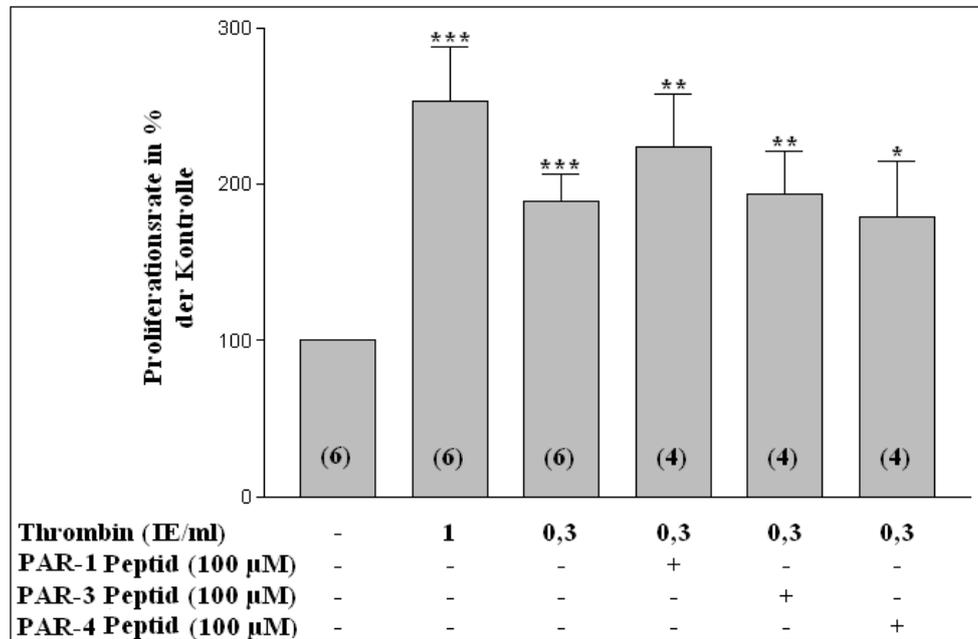


Abb.9: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) und 0,3 IE/ml Thrombin

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) sowie Thrombin (0,3 IE/ml) inkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 µCi/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=6-14$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$

Eine ebenfalls signifikante Proliferationssteigerung gegenüber der unstimulierten Kontrolle auf $189 \pm 17 \%$ wurde durch Zugabe von 0,3 IE/ml Thrombin beobachtet. In Anwesenheit von 100 µM PAR-1 Peptid konnte ein zusätzlicher, allerdings nicht signifikanter ($p = 0,3509$), proliferativer Effekt auf $223 \pm 34 \%$ beobachtet werden. Die zeitgleiche Stimulation der Zellen mit 0,3 IE/ml Thrombin sowie 100 µM PAR-3 Peptid ($193 \pm 28 \%$) bzw. PAR-4 Peptid ($179 \pm 35 \%$) veränderte den Grad der Proliferation gegenüber der alleinigen Stimulation mit 0,3 IE/ml Thrombin nicht.

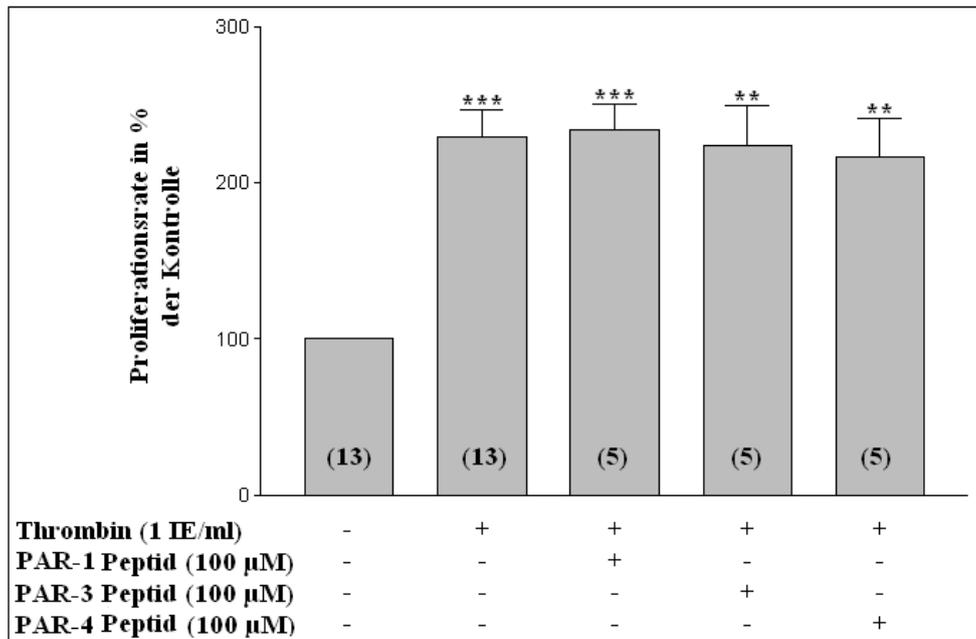


Abb.10: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) und 1 IE/ml Thrombin

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (100µM) sowie Thrombin (1 IE/ml) inkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 µCi/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=5-13$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,005$

Bei alleiniger Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit 1 IE/ml Thrombin stieg die Proliferation erwartungsgemäß auf 229 ± 17 %. Die ermittelten Werte bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit 1 IE/ml Thrombin und 100 µM der PAR-1, PAR-3 und PAR-4 Peptide (234 ± 17 %, 224 ± 26 % und 216 ± 25 %) zeigten, dass keine signifikanten Proliferationsunterschiede bestehen.

4.4 Einfluss von PDGF auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen

Schon in den Untersuchungen die Linß (Linß, 2006) durchführte, wurde ersichtlich, dass freigesetzte Substanzen aus degranulierten Thrombozyten, insbesondere PDGF, zur Proliferationssteigerung beitragen.

Das stabile Thromboxan A₂-Analogon U 46619 führte zu einer Verminderung der Proliferation. ADP und Serotonin (100 µM) beeinflussten die Proliferation nicht. Daher sollte nunmehr der Einfluss verschiedener PDGF-Konzentrationen auf den [³H]-Thymidin-Einbau in die DNS sowie die Möglichkeit der Einflussnahme durch Tyrphostin AG 1296, einem selektiven Inhibitor der PDGF-Rezeptortyrosinkinase, untersucht werden.

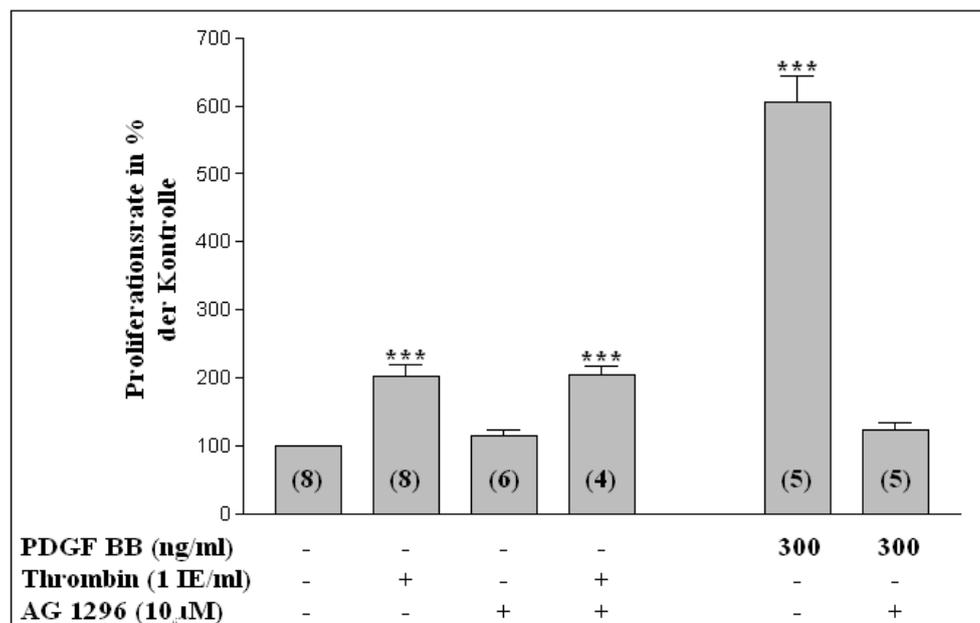


Abb.11: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit PDGF BB (300 ng/ml), 1 IE/ml Thrombin und AG 1296 (10 µM)

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), PDGF BB (300 ng/ml), Thrombin (1 IE/ml) in verschiedener Kombination inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit AG 1296 vorinkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [³H]-Thymidin (0,5 µCi/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelexperimente ist in Klammern angegeben. n=4-8, arithmetische Mittelwerte ± SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle ***p ≤ 0,005

Die Stimulation mit 1 IE/ml Thrombin verdoppelte die Proliferation erwartungsgemäß signifikant auf 202 ± 17 %. Durch alleinige Stimulation mit dem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase des PDGF-Rezeptors, Tyrphostin AG 1296 (10 µM), wurde die basale Proliferation nicht signifikant beeinflusst (116 ± 8 %). Auf den Thrombineffekt hatte AG 1296 (10 µM) keinen Einfluss (205 ± 12 %). Eine signifikante Proliferationssteigerung (p < 0,0001) auf 604 ± 40 % ließ sich jedoch durch Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit dem stark mitogen wirkenden PDGF-BB (300 ng/ml) beobachten.

Wurden die Zellen allerdings 10 Minuten mit AG 1296 (10 μ M) vorinkubiert und erfolgte dann die Stimulation mit PDGF-BB (300 ng/ml) war erkennbar, dass der gesamte mitogene PDGF-Effekt gehemmt wurde und die Proliferation wieder ein annähernd basales Level erreichte (122 ± 13 %). Damit war AG 1296 als potenter Inhibitor der mitogenen PDGF-Wirkung identifiziert. In weiteren Untersuchungen sollte der Effekt von geringeren PDGF-Konzentrationen in Kombination mit Thrombin und Tyrphostin AG 1296 herausgefunden werden.

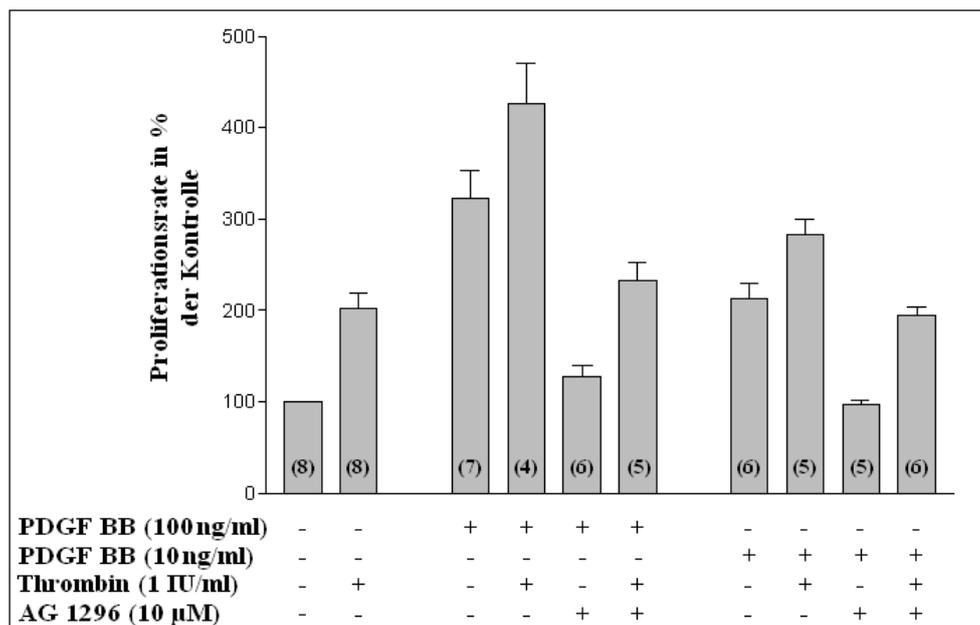


Abb.12: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit PDGF BB (100 ng/ml und 10 ng/ml), 1 IE/ml Thrombin und AG 1296 (10 μ M)

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), PDGF BB (100 ng/ml und 10 ng/ml), Thrombin (1 IE/ml) sowie AG 1296 (10 μ M) in verschiedenen Kombinationen inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit AG 1296 vorinkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=4-8$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test (siehe Tabelle 3)

Wie in den vorausgegangenen Versuchsanordnungen, wurden die Zellen wieder mit 1 IE/ml Thrombin stimuliert. Die Proliferation steigerte sich daraufhin erwartungsgemäß auf 202 ± 17 %. Die Stimulation mit 100 ng/ml PDGF-BB steigerte die Proliferation signifikant (siehe Tabelle 3) auf 322 ± 31 %. Eine zusätzliche, nicht signifikante Proliferationssteigerung auf 425 ± 45 % ließ sich durch gemeinsame Inkubation mit Thrombin (1 IE/ml) registrieren.

Tab.3: Signifikanztabelle zu Abbildung 12

p- Werte	Kontrolle	Thr	PDGF 100	PDGF 100 + Thr	PDGF 100 + AG	PDGF 100 + Thr + AG	PDGF 10	PDGF 10 + Thr	PDGF 10 + AG
Kontrolle									
Thr	*** p < 0,0001								
PDGF 100	*** p < 0,0001	** p = 0,0037							
PDGF 100 + Thr	*** p = 0,0004	*** p = 0,0002	n.s. p = 0,0811						
PDGF 100 + AG	n.s. p = 0,0642	** p = 0,0069	*** p = 0,0002	*** p < 0,0001					
PDGF 100 + Thr + AG	*** p = 0,0001	n.s. p = 0,2733	n.s. p = 0,0511	** p = 0,0039	** p = 0,0012				
PDGF 10	*** p < 0,0001	n.s. p = 0,6962	* p = 0,0129	*** p = 0,0010	** p = 0,0032	n.s. p = 0,4508			
PDGF 10 + Thr	*** p < 0,0001	** p = 0,0090	n.s. p = 0,3466	* p = 0,0141	*** p < 0,0001	n.s. p = 0,0872	* p = 0,0184		
PDGF 10 + AG	n.s. p = 0,6420	*** p = 0,0007	*** p = 0,0001	*** p < 0,0001	n.s. p = 0,0819	*** p = 0,0002	*** p = 0,0003	*** p < 0,0001	
PDGF 10 + Thr + AG	*** p < 0,0001	n.s. p = 0,7418	** p = 0,0034	*** p = 0,0003	** p = 0,0017	n.s. p = 0,0937	n.s. p = 0,4053	*** p = 0,0009	*** p < 0,0001

Begriffserklärung: Thr = Thrombin (1 IE/ml); PDGF 100 = PDGF-BB (100 ng/ml); PDGF 10 = PDGF-BB (10 ng/ml); AG = Tyrphostin AG 1296 (10 µM); n.s. = nicht signifikant; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,005

AG 1296 (10µM) war in der Lage, den mitogenen PDGF-Effekt (100 ng/ml) signifikant zu inhibieren und die Proliferation auf ein annähernd basales Niveau (127 ± 13%) zu senken. Allerdings, war auch hier bei zeitgleicher Stimulation durch PDGF-BB (100 ng/ml), Thrombin (1 IE/ml) und AG 1296 (10 µM) der Thrombineffekt nicht hemmbar (233 ± 20 %) und es bestanden keine signifikanten Unterschiede zur alleinigen Thrombinstimulation. Die Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml PDGF-BB steigerte die Proliferation signifikant auf 213 ± 18 %. Zudem war eine zusätzliche signifikante Proliferationssteigerung auf 284 ± 17 % bei gleichzeitiger Stimulation mit 1 IE/ml Thrombin zu beobachten. Wie erwartet, war AG 1296 (10µM) bei gleichzeitiger Inkubation mit PDGF-BB (10 ng/ml) in der Lage, die Proliferation auf einem basalen Niveau zu stabilisieren (98 ± 5 %).

Wie auch bei höheren PDGF-Konzentrationen beobachtet, war der Thrombineffekt (195 ± 9 %) bei zeitgleicher Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/ml) und AG 1296 (10 μ M) nicht zu hemmen.

4.5 Einfluss von Tyrphostin AG 1478 auf den proliferativen Effekt von Thrombin und PDGF

Im Rahmen weiterer Versuchsreihen wurde auch Tyrphostin AG 1478 (10 μ M) als möglicher Inhibitor der PDGF-Rezeptortyrosinkinase identifiziert.

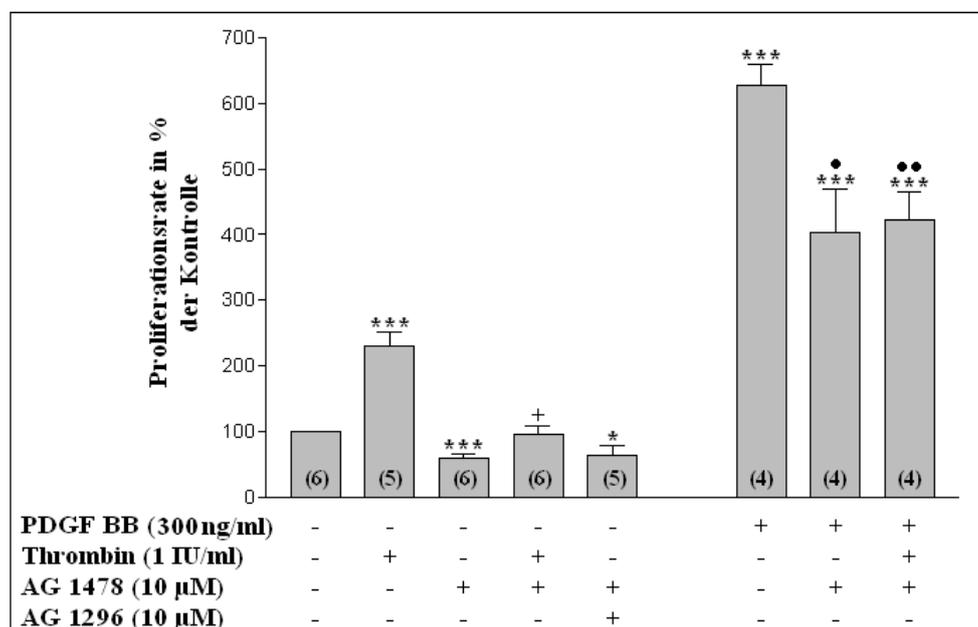


Abb.13: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit PDGF BB (300 ng/ml), 1 IE/ml Thrombin, AG 1296 (10 μ M) und AG 1478 (10 μ M)

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), PDGF BB (300 ng/ml), Thrombin (1 IE/ml), AG 1296 (10 μ M) sowie AG 1478 (10 μ M) in verschiedenen Kombinationen inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit AG 1296 bzw. AG 1478 vorinkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=4-6$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test im Vergleich zur Kontrolle * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,005$ und im Vergleich zur Stimulation mit PDGF BB (300 ng/ml) ● $p \leq 0,05$; ●● $p \leq 0,01$ sowie im Vergleich zur Stimulation mit AG 1478 (10 μ M) + $p \leq 0,05$

Die Stimulation mit 1 IE/ml Thrombin steigerte die Proliferation der MC3T3-E1 Zellen signifikant auf 230 ± 21 %.

Eine signifikante Hemmung der Proliferation auf $60 \pm 6 \%$ wurde bei alleiniger Stimulation der Zellen mit AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) registriert. Bei gemeinsamer Inkubation von AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) mit 1 IE/ml Thrombin wurde die Proliferation der Zellen gegenüber der alleinigen Hemmung durch AG 1478 signifikant auf $96 \pm 12 \%$ gesteigert. Demnach war allerdings auch ersichtlich, dass der sonst zuverlässig induzierbare, mitogene Thrombineffekt durch AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) deutlich gehemmt wird. Auch die gemeinsame Inkubation der Zellen mit AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) und AG 1296 ($10 \mu\text{M}$) senkte die Proliferation signifikant ($p = 0,0377$) gegenüber dem basalen Kontrollwert auf $64 \pm 14 \%$. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zur alleinigen Hemmung durch AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) registriert. Daher wurde dieser erneute, hemmende Effekt auf die Wirkungsweise von AG 1478 zurückgeführt, da AG 1296 allein keine proliferative Wirkung auf die Zellen ausübte (Vergleich Abb. 11).

Wie in den vorhergehenden Versuchen wirkte PDGF-BB stark mitogen. Eine signifikante Proliferationssteigerung auf $627 \pm 32 \%$ wurde durch Stimulation mit 300 ng/ml PDGF-BB beobachtet. Die zeitgleiche Inkubation mit AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) bewirkte allerdings eine signifikante Hemmung ($p = 0,023$) der Proliferation auf nur noch $403 \pm 66 \%$. Diese war jedoch deutlich geringer als bei vergleichbaren Konzentrationen von AG 1296 ausgeprägt, da das Kontrollniveau wie aus Abb. 12 ersichtlich, nicht erreicht wurde. Auch der zeitgleiche Zusatz von Thrombin (1 IE/ml) beeinflusste das Ausmaß der Hemmung durch AG 1478 ($10 \mu\text{M}$) nicht signifikant ($422 \pm 42 \%$). Daher wurden weitere Versuche mit variierenden PDGF- und Thrombinkonzentrationen durchgeführt, um die durch AG 1478 hervorgerufenen, zellulären Effekte besser beurteilen zu können.

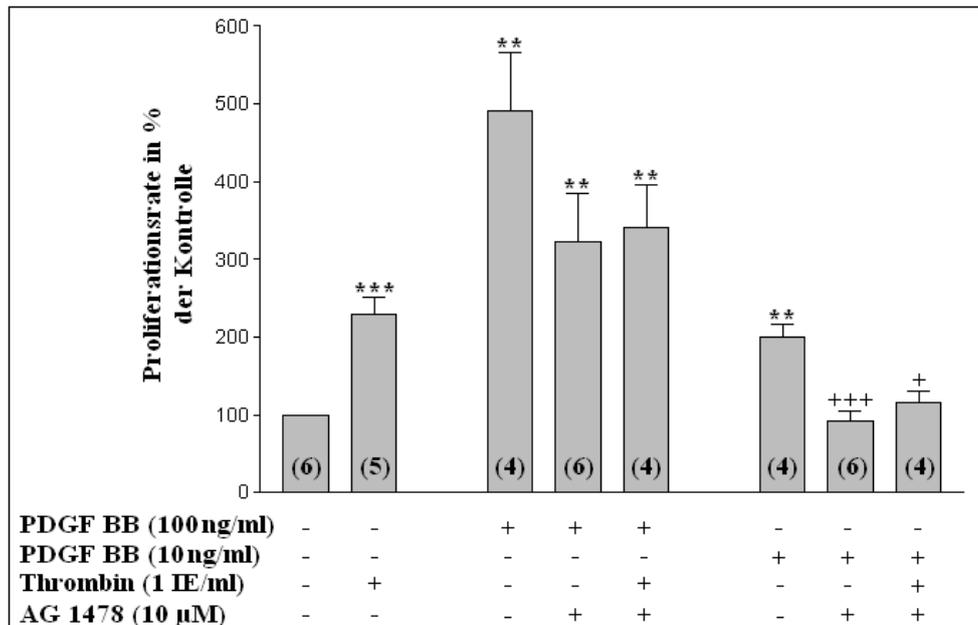


Abb.14: Bestimmung der Proliferationsrate der MC3T3-E1 Zellen nach Inkubation mit PDGF BB (100 ng/ml und 10 ng/ml), 1 IE/ml Thrombin und AG 1478 (10 µM)

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle), PDGF BB (100 ng/ml und 10 ng/ml), Thrombin (1 IE/ml) und AG 1478 (10 µM) in verschiedenen Kombinationen inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit AG 1478 vorinkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [H^3]-Thymidin (0,5 µCi/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente ist in Klammern angegeben. $n=4-6$, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t -Test im Vergleich zur Kontrolle $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,005$ sowie im Vergleich zur Stimulation mit PDGF BB (10 ng/ml) $+p \leq 0,05$; $+++p \leq 0,005$

Eine erwartete, signifikante Proliferationssteigerung auf 230 ± 21 % wurde bei der Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit 1 IE/ml Thrombin registriert. Nach Stimulation mit 100 ng/ml PDGF-BB steigerte sich die Proliferation signifikant auf 492 ± 73 %. Nach Vorinkubation mit AG 1478 (10 µM) wurde dieser Proliferationswert nicht signifikant auf 322 ± 62 % gehemmt und nach zusätzlicher Stimulation mit 1 IE/ml Thrombin veränderte sich die Proliferation kaum (340 ± 56 %). Durch Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-BB stieg die Proliferation signifikant auf 200 ± 18 %. Nach Vorinkubieren der Zellen mit AG 1478 (10 µM) war eine signifikante Hemmung der Proliferation auf 93 ± 12 % ($p = 0,0008$) bei gleichzeitiger Stimulation mit PDGF-BB (10 ng/ml) zu beobachten. Erneut war nicht zu beobachten, dass durch Zugabe von Thrombin (1 IE/ml) die Proliferation signifikant gesteigert wurde (116 ± 15 %). Aus den Ergebnissen ließ sich ableiten, dass AG 1478 (10 µM) sowohl in der Lage ist, die basale als auch die mitogen induzierte Proliferation der MC3T3-E1 Zellen teilweise zu inhibieren.

4.6 Einfluss löslicher Bestandteile verschiedener Schulte-Koagula auf die Proliferation von MC3T3-E1 Zellen

Um den exakten Anteil der PDGF-induzierten proliferativen Wirkung des Schulte-Koagulums bestimmen zu können, wurden in vitro miniaturisierte Schulte-Koagula gemäß 3.2.4 angefertigt. So wurden 1 cm³ große, kubische Gelatineschwammstücke entweder mit thrombinstimuliertem (Endkonzentration 1 IE/ml) oder unstimuliertem, frischem Vollblut benetzt und nach fünfminütiger Inkubationszeit in physiologische NaCl-Lösung (0,9 %) überführt. Während der ersten und den darauffolgenden (5 min, 30 min, 60 min) Inkubationszeiten konnten Thrombozyten neben anderen Wachstumsfaktoren auch PDGF (Platelet-derived growth factor) aus den α -Granula freisetzen. Die MC3T3-E1 Zellen wurden 10 min vor Stimulation mit dem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase des PDGF-Rezeptors, AG 1296 (10 μ M), vorinkubiert, um den mitogenen PDGF-Effekt ermitteln zu können.

Tab.4: Zeitabhängiger Einfluss löslicher Bestandteile variierender SCHULTE-Koagula auf die Proliferation der MC3T3-E1 Zellen in % der Kontrolle

Überstände von:	5 min	30 min	60 min
Koagulum	264 \pm 45	348 \pm 44	251 \pm 39
Koagulum + Thrombin (1IE/ml)	267 \pm 56	433 \pm 46	419 \pm 76
Koagulum + AG 1296 (10 μM)	153 \pm 18	171 \pm 40	174 \pm 37
Koagulum + Thrombin (1IE/ml) + AG 1296 (10μM)	145 \pm 20	196 \pm 56	318 \pm 97

Die vorbereiteten MC3T3-E1 Zellen wurden nach 24 Stunden mit serumfreiem Medium (Kontrolle, nicht dargestellt) oder den Überständen der Koagula mit oder ohne Thrombin (1 IE/ml) und Tyrphostin AG 1296 (10 μ M) inkubiert. Die Zellen wurden 10 min mit AG 1296 vorinkubiert. Nach 9 Stunden wurde der Marker [³H]-Thymidin (0,5 μ Ci/ml) zugegeben und dessen Einbau in die DNS 18 Stunden später gestoppt. Alle Messwerte waren als Triplikate angelegt. Die Anzahl der Einzelerperimente beträgt n=4, arithmetische Mittelwerte \pm SEM, Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test (siehe Tabelle 5)

Tab.5: Signifikanztabelle zu Tabelle 4

p- Werte	Koagulum (5 min)	Koag + Thr (5 min)	Koag + AG (5 min)	Koag + Thr + AG (5 min)	Koagulum (30 min)	Koag + Thr (30 min)	Koag + AG (30 min)	Koag + Thr + AG (30 min)	Koagulum (60 min)	Koag + Thr (60 min)	Koag + AG (60 min)
Koagulum (5 min)											
Koag + Thr (5 min)	n.s. p = 0,9605										
Koag + AG (5 min)	n.s. p = 0,0609	n.s. p = 0,0984									
Koag + Thr + AG (5 min)	n.s. p = 0,0512	n.s. p = 0,0834	n.s. p = 0,7538								
Koagulum (30 min)	n.s. p = 0,2236	n.s. p = 0,2954	** p = 0,0061	** p = 0,0056							
Koag + Thr (30 min)	* p = 0,0380	n.s. p = 0,0608	** p = 0,0013	** p = 0,0012	n.s. p = 0,2285						
Koag + AG (30 min)	n.s. p = 0,1730	n.s. p = 0,2094	n.s. p = 0,6986	n.s. p = 0,5752	* p = 0,0243	** p = 0,0051					
Koag + Thr + AG (30 min)	n.s. p = 0,3804	n.s. p = 0,4004	n.s. p = 0,4927	n.s. p = 0,4188	n.s. p = 0,0752	* p = 0,0168	n.s. p = 0,7283				
Koagulum (60 min)	n.s. p = 0,8361	n.s. p = 0,8164	n.s. p = 0,0639	n.s. p = 0,0531	n.s. p = 0,1479	* p = 0,0234	n.s. p = 0,2044	n.s. p = 0,4527			
Koag + Thr (60 min)	n.s. p = 0,1269	n.s. p = 0,1569	* p = 0,0141	* p = 0,0127	n.s. p = 0,4494	n.s. p = 0,8746	* p = 0,0273	n.s. p = 0,0552	n.s. p = 0,0956		
Koag + AG (60 min)	n.s. p = 0,1706	n.s. p = 0,2097	n.s. p = 0,6365	n.s. p = 0,5147	* p = 0,0224	** p = 0,0045	n.s. p = 0,9639	n.s. p = 0,7488	n.s. p = 0,2016	* p = 0,0267	
Koag + Thr + AG (60 min)	n.s. p = 0,6282	n.s. p = 0,6655	n.s. p = 0,1467	n.s. p = 0,1314	n.s. p = 0,7874	n.s. p = 0,3257	n.s. p = 0,2115	n.s. p = 0,3180	n.s. p = 0,5443	n.s. p = 0,4450	n.s. p = 0,2142

Begriffserklärung: Koag = Koagulum (Gelatineschwamm und Vollblut); Thr = Thrombin (1 IE/ml); AG = AG 1296 (10 µM); Signifikanzprüfung mit gepaartem t-Test: n.s. = nicht signifikant; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$

Wie zu erwarten, steigerte die Stimulation mit 1 IE/ml Thrombin die Proliferation auf 239 ± 30 % und bei zeitgleicher Inkubation von 10 ng/ml PDGF-BB und AG 1296 (10 µM) wurde ein Proliferationswert von 101 ± 11 % gemessen (Ergebnisse nicht in Tab. 4 und 5 angezeigt). Bei Analyse der Signifikanzunterschiede für die ermittelten Werte nach fünfminütiger Vorinkubation wurde deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der Stimulation mit Überständen aus „Koagulum“ (264 ± 45 %) und „Koagulum + Thrombin“ (267 ± 56 %) bestehen. Auch zwischen den Werten „Koagulum“ (264 ± 45 %) und „Koagulum + AG 1296“ (153 ± 18 %) sowie „Koagulum + Thrombin“ (267 ± 56 %) und „Koagulum + Thrombin + AG 1296“ (145 ± 20 %) war kein signifikanter Unterschied feststellbar. Ebenfalls nicht signifikant waren die Vergleiche zwischen den 5- und 30-Minuten- Werten für „Schwamm + Koagulum“ (264 ± 45 % und 348 ± 44 %) und „Schwamm + Koagulum + Thrombin“ (267 ± 56 % und 433 ± 46 %).

Einzig zwischen den Werten „Koagulum- 5 min“ ($264 \pm 45 \%$) und „Koagulum + Thrombin- 30 min“ ($433 \pm 46 \%$) ist eine signifikante Proliferationszunahme ($p = 0,0380$) registriert worden.

Bei der Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit den 30-Minuten-Überständen, war Tyrphostin AG 1296 ($10 \mu\text{M}$) in der Lage, die Proliferation signifikant zu beeinflussen. So wurde ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0243$) sowohl zwischen den Überständen „Koagulum“ ($348 \pm 44 \%$) und „Koagulum + AG 1296“ ($171 \pm 40 \%$) sowie zwischen den Überständen „Koagulum + Thrombin“ ($433 \pm 46 \%$) und „Koagulum + Thrombin + AG 1296“ ($196 \pm 56 \%$) ermittelt ($p = 0,0168$). Die Proliferationserhöhung von $348 \pm 44 \%$ auf $433 \pm 46 \%$, die durch Thrombinzusatz zum Koagulum resultierte, war nicht signifikant.

Ein Vergleich der 30- und 60-Minuten-Werte für „Koagulum“ ($348 \pm 44 \%$ und $251 \pm 39 \%$) und „Koagulum + Thrombin“ ($433 \pm 46 \%$ und $419 \pm 76 \%$) zeigt zwar eine deutliche, dennoch nicht signifikante Abnahme der Proliferation.

Betrachtet man die 60-Minuten-Werte isoliert, sind erneut keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Weder zwischen „Koagulum“ ($251 \pm 39 \%$) und „Koagulum + Thrombin“ ($419 \pm 76 \%$) noch zwischen den einzelnen Werten mit und ohne Zusatz von Tyrphostin AG 1296 ($10 \mu\text{M}$). Betrachtet man die Ergebnisse der miniaturisierten Schulte-Koagula und den durch PDGF genierten, proliferativen Effekt, ist auffällig, dass ein zeitabhängiges Maximum an zellproliferationsfördernder Wirkung nach 30 Minuten besteht. Zudem wird die proliferative Wirkung der Schulte-Koagula durch Thrombinzusatz (1 IE/ml) erhöht, allerdings nicht signifikant. Durch Tryphostin AG 1296 ($10 \mu\text{M}$) ist ein Großteil der registrierten Proliferation teilweise signifikant hemmbar, was bedeutet, dass insbesondere nach Stimulation mit den 30-Minuten-Überständen ein Hauptteil der Proliferationssteigerung auf PDGF aus aktivierten Thrombozyten zurückzuführen ist. Besonders auffällig kommt dieser Effekt nach Stimulation mit den thrombinstimulierten 30-Minuten-Überständen zu Geltung, wo mehr als die Hälfte an proliferativer Wirkung PDGF-abhängig ist ($433 \pm 46 \%$ auf $196 \pm 56 \%$; $p = 0,0168$). In Kombination mit den von Linß erzielten Ergebnissen (Linß, 2006) lässt sich postulieren, dass die zellbiologische Wirkung des Schulte-Koagulums in erster Linie von PDGF und nur sekundär von Thrombin abhängig ist.

5. Diskussion

In den von Linß durchgeführten Untersuchungen wird das Schulte-Koagulum als „geeignetes Verfahren zur Förderung der Knochenregeneration“ beschrieben, da es sich „als einfache, nebenwirkungsarme und nicht zuletzt kostengünstige, biologisch optimale Alternative zu den aktuell propagierten Knochenersatzverfahren“ erweist (Linß, 2006).

In diesen, als Ausgangspunkt für die vorgelegte Untersuchung dienenden Experimenten, war das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des Schulte-Koagulums bezüglich ihrer proliferativen Wirkung mittels eines [H^3]-Thymidin-Assays untersucht worden. So konnte für Thrombin eine, die Proliferation stark fördernde Wirkung ermittelt werden, die mit 300 % ihr Maximum bei Verwendung von 10 IE/ml Thrombin hatte. Dagegen starben unter Stimulation mit 10^5 IE/ml Penizillin alle Zellen ab. Wurden jedoch geringere Penizillinkonzentrationen (10^3 und 10^2 IE/ml) verwendet, war die Proliferation gegenüber unstimulierten Kontrollzellen kaum beeinträchtigt (92 ± 4 % und 89 ± 14 %). Die penizillinbedingte Proliferationshemmung unter höheren Wirkstoffkonzentrationen (wenigstens bei 10^3 und 10^2 IE/ml Penizillin) konnte durch 1 IE/ml Thrombin fast vollständig aufgehoben werden, nicht jedoch bei 10^5 IE/ml Penizillin.

In der eigenen Untersuchung stellte sich heraus, dass selbst immens hohe Thrombinkonzentrationen (bis 100 IE/ml) den Zelltod der Zelllinie MC3T3-E1 bei gleichzeitiger Inkubation mit 10^5 IE/ml Penizillin nicht verhindern konnten (siehe Abb. 2). Dabei war eine pH-Wert-abhängige Proliferationsminderung ausgeschlossen worden. Bei geringeren Penizillinkonzentrationen (10^3 und 10^2 IE/ml Penizillin) zeigte sich wie in den Versuchen von Linß ein Überleben von Zellen, allerdings auf einem gegenüber dem basalen Wert niedrigeren Niveau (76 ± 7 % und 85 ± 9 %) (siehe Abb. 4 und Abb. 5). Diese mäßige Beeinträchtigung war im Gegensatz zu hohen Penizillinkonzentrationen (10^5 IE/ml) aber durch die Zugabe von Thrombin kompensierbar. Aus den Ergebnissen (Abb. 3-5) ist ersichtlich, dass Thrombin in der Lage ist, den konzentrationsabhängigen negativen Proliferationseffekt von Penizillin zu mildern oder gar zu kompensieren.

Das Schulte-Koagulum wird in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg aus 5 ml venösen, autologem Blut des Patienten und meist der geringsten lieferbaren Einheit von 1 Million Einheiten Penizillin hergestellt. Durch Verwendung solcher hoher Penizillinkonzentrationen ist davon auszugehen, dass nicht nur durch eine pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich ein proliferationshemmender Effekt auf das umliegende Gewebe ausgeübt wird. Daher scheint nach Übertragung der gewonnenen, zellbiologischen Erkenntnisse auf die klinische Situation, eine Reduktion der Penizillinkonzentration im Schulte-Koagulum überlegenswert oder gar angebracht. Zumal auch in anderen Studien der proliferationshemmende Effekt von Penizillin G, in diesem Fall auf LEC (Lymphendothelzellen) nachgewiesen worden ist (Hünerbein, 2010). Es scheint also dringend geraten, sich an die originalen Dosierungsempfehlungen von Schulte (Schulte, 1960b) zu halten, der offensichtlich empirisch mit seiner Überlegung pro verwendetem Milliliter venösem Vollblut je 10.000 Einheiten Penizillin zu verwenden, die richtigere Wahl getroffen hatte.

Allerdings muss in diesem Zusammenhang auf die besonderen chirurgischen Verhältnisse in der Mundhöhle eingegangen werden. Der Nahtverschluss, welcher die mit dem Schulte-Koagulum gefüllte Knochenkavität primär verschließt, ist zumeist nicht als absolut speicheldicht anzusehen. Daher kann neben löslichen Bestandteilen des Vollblutgerinnsels auch Penizillin aus der Wunde transportiert werden, womit die Penizillinkonzentration innerhalb der Knochenwunde verringert wird. Ein Auswaschen von Thrombin aus dem Koagulum aus gleichem Grund ist im Übrigen als unbedeutend anzusehen, da Thrombin als hochaktive Protease seinen Rezeptor bereits initial irreversibel aktiviert hat.

Auch in den Jahren nach Entwicklung des Schulte-Koagulums (1959) wurde die Verwendung lokaler Antibiotika zur Infektionsprophylaxe bei chirurgischen Knocheneingriffen empfohlen (Marks et al., 1976; Wahlig und Dingeldein, 1980). Allerdings waren dies meist mit Gentamycin versetzte Polymethylmethacrylat- (PMMA) Kügelchen, die zu einem späteren Zeitpunkt wieder aus dem Knochen entfernt werden mussten. Daher hat man sich den biologisch resorbierbaren Materialien mit Zusatz anderer Antibiotika wie z.B. Kollagen-Gentamycin-Schwämmen, Hydroxylapatitblöcken mit Vancomycin, Ciprofloxacin und Gentamycin oder Polylaktatpolymeren mit Chinolonen zugewendet (Kanellakopoulou und Giamarellos-Bourboulis, 2000; Chai et al., 2007).

Vorteile dieser lokalen Antibiose, wie sie auch im Schulte-Koagulum umgesetzt wird, ist die initial bessere Wirksamkeit durch höhere Wirkstoffkonzentration oberhalb der minimalen Hemmkonzentration. Zudem stellt sie eine geringe systemische Körperbelastung dar. Auch die kontrollierte Patientencompliance ist positiv zu werten. Negativ sind mögliche Risiken wie Allergisierung oder Resistenzbildung gegen das verwendete lokale Antibiotikum. Eine langanhaltende Wirkung des antibiotischen Depots ist zumindest beim Schulte-Koagulum nicht gegeben, da die Halbwertszeit von Benzylpenizillin bei lediglich 30 Minuten liegt und eine zeitlich verzögerte Abgabe aus einem Reservoir nicht stattfindet.

Bei dentalen Infektionen handelt es sich bekanntlich zumeist um eine aerob-anaerobe Mischinfektion mit durchschnittlich drei bis vier Erregern (Eckert, 2003). Die dominierenden Keime sind *Prevotella sp.*, *Peptostreptococcus sp.* und *Propionibacterium sp.*, wobei 87 % der an einer Infektion beteiligten Keime gegenüber Penizillin ausreichend empfindlich sind (Al-Nawas und Mäurer, 2008). Im Patientengut der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden in den Jahren 1999-2002 Resistenzquoten gegenüber Penizillin G/V von 4,5 % bei aeroben Spezies und 8,1 % bei anaeroben Spezies ermittelt (Eckert, 2003; Eckert et al., 2005). Daher bleibt Penizillin G ein potentes Therapeutikum gegen odontogene Infektionen und dessen Einsatz im Schulte-Koagulum auch weiterhin gerechtfertigt.

Einige Autoren empfehlen zur Therapie schwerer odontogener Infektionen, gleichzeitig die Gabe von Clindamycin, da es sich durch hohe orale Absorption, signifikante Gewebepenetration und stimulierende Effekte auf das Immunsystem auszeichnet (Brook et al., 2005). Anhand einer retrospektiven Studie des eigenen stationären Patientengutes aus den Jahren 1990-1999 fanden Maurer et al. zwar eine 85 %-ige Primärheilung der mit dem Schulte-Koagulum behandelten Knochendefekte, allerdings wurde bei 5,2 % der Fälle aufgrund einer Wundinfektion eine chirurgische Revision nötig (Maurer et al., 2002), wobei gegebenenfalls der Einsatz weiterer Antibiotika, wie Clindamycin gerechtfertigt gewesen wäre. Trotzdem muss gewissenhaft und streng nach Indikation gehandelt werden, da Clindamycin von allen Antibiotika bei oraler Anwendung am häufigsten eine Antibiotika-assoziierte Enterocolitis auslöst (Bartlett, 2008). Letztlich handelt es sich bei der topischen Applikation von Penizillin im Schulte-Koagulum um eine prophylaktische Gabe, die nicht unbedingt mit den Regeln der Antibiotikatherapie vergleichbar ist (keine primäre Infektion, keine Erreger- und Resistenzbestimmung usw.).

Fasst man alle Fakten zusammen, ist ein Austausch des Antibiotikums im Schulte-Koagulum wenig sinnvoll, da auch für andere Antibiotika ähnlich zelltoxische Eigenschaften wie für Penizillin bekannt sind. Betrachtet man z. B. die Wirkung anderer Hemmstoffe der Zellwandsynthese wie das Glykopeptid Vancomycin oder das Cephalosporin Cefazolin wird deutlich, dass beide Wirkstoffe ab einer Konzentration von 10^4 µg/ml den Zelltod der osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG 63 bedingen (Edin et al., 1996). Zudem wird auch für Tobramycin (Aminoglykosid) eine deutliche Reduktion der Zellzahl sowie induzierte Membranschäden bei verwendeten Konzentrationen über der MHK (Minimalen Hemmkonzentration) (Ehanire et al., 2007) und der Zelltod der untersuchten MG 63 Zellen bei Konzentrationen über 10^4 µg/ml beobachtet (Miclau et al., 1995). Auch der Gyrase-Hemmstoff Ciprofloxacin (40 µg/ml) induziert nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Abnahme der Proliferation von MG 63 Zellen (Miclau et al., 1998). Daher ist der Einsatz von Penizillin im Schulte-Koagulum trotz der beobachteten Zelltoxizität (Abb. 2-5) aufgrund sehr guter Wirksamkeit, nur geringer bakterieller Resistenzen und fehlender Alternativen gerechtfertigt.

Das im Schulte-Koagulum verwendete JMI[®]-Thrombin ist bovinen Ursprungs und zurzeit das einzige nicht-menschliche Thrombin im klinischen Einsatz (Packungsbeilage King Pharmaceuticals Inc., 2007). Bovines Thrombin wurde erstmals in den 1940er Jahren als topisches Hämostyptikum eingesetzt (Lawson, 2006; Kessler und Ortel, 2009) und auch aktuell wird Rinderthrombin zur Blutgerinnung bei chirurgischen Eingriffen an Herz, Thorax, Gefäßen oder im Kopf-Hals-Bereich verwendet (Lawson, 2006). Allerdings wird es immer wieder mit einem erhöhten Risiko für Anaphylaxie, Thrombose und immunvermittelter Koagulopathie in Verbindung gebracht (Rothenberg und Moy, 1993; Christie et al., 1997; Sands et al., 2000), eine Erfahrung, die an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im jahrzehntelangen Einsatz nie gemacht werden musste (Schubert, pers. Mitt.). Vermutlich sind die erwähnten Komplikationen auf sekundär gebildete Faktor V- und Antithrombin-III-Antikörper zurückzuführen (Spero, 1993; Dorion et al., 1998).

Der tatsächliche Thrombingehalt von JMI[®]-Thrombin beläuft sich auf 81 % bis 96 % (Dunn et al., 2009) und trotz der seit 2008 sehr niedrigen Faktor V-Konzentration von weniger als 92 ng/ml (Terrab et al., 2008) ist es weiterhin nicht auszuschließen, dass potentiell schädliche Proteine in JMI[®]-Thrombin enthalten sind.

Daher besteht das Risiko der Übertragung von Spezies-spezifischen, pathogenen Viren und Prionen, da Screening und Eliminierung dieser Krankheitserreger nicht zu 100 % effektiv sind (DeVeau et al., 2004). Um die Möglichkeit einer Infektion zu minimieren, wird bovines Thrombin nicht von Rindern aus Ländern mit dokumentierten BSE-Fällen gewonnen (Richtlinie der FDA- Food and Drug Administration, 2002). Allerdings gibt es trotz fortgeschrittener Fraktionstechniken und Nanofiltration zurzeit keine Möglichkeit das Risiko einer Übertragung von Prionen durch Plasmaprodukte auszuschließen (Burnouf und Padilla, 2006). Zudem deuten Tierversuche darauf hin, dass eine Übertragung theoretisch tatsächlich möglich ist. Es gibt jedoch keine dokumentierten Fälle einer Übertragung von Prionen durch bovines Thrombin (Cordier et al., 2006; Nonno et al., 2006).

Unter anderem aus den potentiellen Gefahren heraus wurde in der vorliegenden Arbeit der Ersatz von bovinem Thrombin durch synthetisch hergestellte Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide im Zellkulturmodell getestet. Diese Peptide imitieren den Aminoterminus der Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR-1, PAR-3 und PAR-4) und können diese ebenfalls, wenn auch nicht irreversibel, aktivieren. Die in den Untersuchungen verwendeten MC3T3-E1 Zellen exprimieren PAR-1 sowie PAR-3 und zusätzlich nach Thrombinstimulation PAR-4 (Bluteau et al., 2006). PAR-2 wird durch Trypsin aktiviert (Nystedt et al., 1994) und wurde deshalb nicht untersucht.

Überraschenderweise konnte nach Stimulation der Zellen durch PAR-1 Peptid, PAR-3 Peptid und PAR-4 Peptid (100 μ M) keine Proliferationsveränderung gegenüber der unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. Auch die Kombination der Peptide untereinander veränderte die Proliferationswerte der Zellen nicht nennenswert (siehe Abb. 6). Anders als Thrombin, induzieren die Peptide demnach allein keine DNS-Synthese in MC3T3-E1 Zellen. Da nicht getestet wurde, ob Peptid-haltiges Kulturmedium auch nach 27 Stunden eine Plättchenaggregation auslöst, ist es allerdings möglich, dass zellmembranständige Peptidasen die verwendeten Peptide während der langen Stimulationszeit abgebaut haben. Es ist jedoch bekannt, dass die alleinige Stimulation mit PAR-1 und PAR-4 Peptid auch bei anderen Zelllinien (BCA-SMC) keine mitogene Wirkung zur Folge hat (Richter, 2002). Andere Untersuchungen mit osteoblastenähnlichen Zellen aus der Calvaria von Ratten hatten allerdings gezeigt, dass zumindest das PAR-1 Peptid (Aminosäuresequenz: SFFLRN) (100 μ M) in der Lage ist, die Zellvermehrung zu stimulieren. In diesem Fall hatte die Proliferationssteigerung ca. 58 % betragen.

Geringere Peptidkonzentrationen als 100 μ M beeinflussten die basale Proliferation nicht (Abraham und Mackie, 1999). An humanen Osteoblasten konnte beobachtet werden, dass Thrombin (10 IE/ml) die Proliferation ungefähr verdoppelte, was auch mit den Werten dieser Arbeit korreliert. Das Peptid mit der Aminosäuresequenz SFLLRN (100 μ M), welches auch in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde, bedingte sogar eine fünffache Proliferationssteigerung der humanen Osteoblasten und wirkte somit stark mitogen (Frost et al., 1999). In den eigenen Untersuchungen konnte nach Stimulation der MC3T3-E1 Zellen durch PAR-1 Peptid (SFLLRN) lediglich zusammen mit geringen Thrombinkonzentrationen ein positiver Effekt nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich für Thrombinkonzentrationen von 0,03 IE/ml und 0,1 IE/ml nachweisen. Der Proliferationswert stieg durch gemeinsame Inkubation mit dem PAR-1 Peptid (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Ab einer Konzentration von 1 IE/ml Thrombin ist ein kooperativer Effekt nicht mehr nachzuweisen (siehe Abb. 10). Für Fibroblasten ist bekannt, dass das mitogene Thrombin-Signal durch die Aktivierung der p44/42-MAPK vermittelt wird. Aus den vorliegenden Ergebnissen ist daher anzunehmen, dass die p44/42-MAPK-Aktivierung für die DNS-Synthese essentiell ist, allein aber nicht ausreicht, da auch das PAR-1 Peptid in der Lage ist, diese spezielle Kinase zu aktivieren (Vouret-Craviari et al., 1993) trotz allem aber keine DNS-Synthese in den MC3T3-E1 Zellen induziert. Die Signaltransduktion von Thrombin muss neben der p44/42 MAPK noch weitere Komponenten beinhalten, die weder durch das PAR-3 noch PAR-4 Peptid und nur in geringem Maß durch das PAR-1 Peptid beeinflusst werden. Dieser Einfluss ist jedoch so gering, dass das dezente mitogene Signal in Kombination mit höheren Thrombinkonzentrationen (1 IE/ml) kaschiert wird.

Anhand dieser eigenen Untersuchungsergebnisse kann man leider nicht ableiten, dass sich aus zellbiologischer Sicht konkrete Hinweise ergeben hätten, das im Schulte-Koagulum enthaltene Thrombin gegen Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide austauschen zu können. 1960 hatte bekanntlich Schulte die Anwendung von Thrombin primär zur „Verhütung der penicillinbedingten Gerinnungsstörung“ (Schulte, 1960b) empfohlen. Dementsprechend hat das Thrombin im Schulte-Koagulum neben den positiven Effekten auf die Proliferation von Knochenzellen primär die Aufgabe das enthaltene Blut zu koagulieren.

Zudem ist Thrombin der stärkste physiologische Thrombozytenstimulator und da Blutplättchen thrombinabhängig den Inhalt ihrer Granulae freisetzen und aggregieren, lag es nahe, den Einfluss des Wachstumsfaktors PDGF auf die Proliferation zu untersuchen.

Der Platelet-derived growth factor (PDGF), ursprünglich in den sekretorischen α -Granula von Blutplättchen gefunden, gehört zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren (Ross et al., 1974) und beschreibt eine Familie von homo- bzw. heterodimeren Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (Ross et al., 1986). Es existieren fünf PDGF-Isoformen: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD (Heldin und Westermark, 1999; Gilbertson et al., 2001; LaRoche et al., 2001). Die zellulären Effekte der 5 PDGF-Isoformen werden durch zwei homodimere Rezeptoren und einen heterodimeren Rezeptor vermittelt. Diese gehören zu den transmembranalen Tyrosinkinasen (Claesson-Welsh, 1996). Die verschiedenen Isoformen der PDGF-Liganden (AA, BB, CC, DD, AB) weisen allerdings unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Isoformen der Rezeptoren ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$) auf (siehe Abb. 15). Nur PDGF-BB ist in der Lage an alle PDGF-Rezeptoren zu binden (Westermark et al., 1989). Daher wurde bei den vorliegenden Untersuchungen ausschließlich PDGF-BB verwendet. Nach Bindung eines Liganden bilden sich Rezeptordimere aus und es folgt eine Autophosphorylierung der Rezeptormoleküle (Ullrich und Schlessinger, 1990; Kazlauskas et al., 1991). Intrazellulär können sich verschiedene Signaltransduktionssysteme, wie z.B. PI3K, PLC γ , Ras oder Src anschließen.

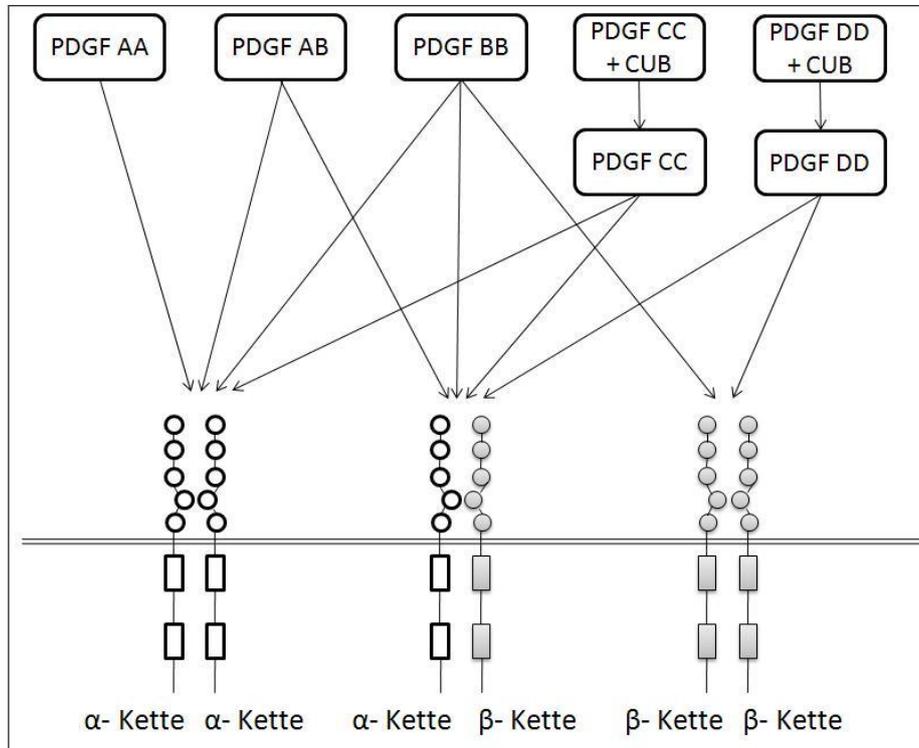


Abb.15:Die fünf unterschiedlichen PDGF-Liganden und ihre spezifischen homo- bzw. heterodimeren PDGF-Rezeptoren

Die physiologischen PDGF-Wirkungsweisen sind pleiotrop. Sie erstrecken sich von der Regulation der embryonalen Entwicklungsvorgänge (Levéen et al., 1994; Boström et al., 1996) über eine tragende Rolle im vaskulären System, insbesondere der bei Angiogenese (Battegay et al., 1994) bis hin zur Aufrechterhaltung und Regulation des interstitiellen Gewebedruckes (Heuchel et al., 1999). Zudem wirkt PDGF stark mitogen, wobei PDGF-BB und PDGF-AB als systemische Wachstumsfaktoren und PDGF-AA als lokaler Wachstumsfaktor im Knochen fungiert. PDGF wird von Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen synthetisiert und stimuliert die Zellteilung, Chemotaxis von Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten und ist in der Lage, die DNS- und Kollagensynthese in Knochenzellkulturen zu erhöhen (Canalis et al., 1989). PDGF trägt somit entscheidend zur Wundheilung bei. Allerdings ist PDGF auch ein Mediator für autokrines Tumorwachstum, wobei die PDGF-Isoformen (v-sis) einen transformierenden Effekt auf Zellen ausüben (Doolittle et al., 1983).

Da sich das Schulte-Koagulum neben Gelatineschwamm, Thrombin und Penizillin zu großen Teilen aus patienteneigenem Vollblut zusammensetzt, sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von PDGF-BB auf die Proliferation von immortalisierten osteoblastenartigen Mäusefibroblasten (MC3T3-E1) untersucht werden. Im Schulte-Koagulum wird PDGF aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt. Nach Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit 300 ng/ml PDGF-BB wurde ein deutlich vermehrter Einbau des radioaktiven Markers [H^3]-Thymidin auf 604 ± 40 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle registriert (siehe Abb. 11). Bei 100 ng/ml und 10 ng/ml wurde eine Steigerung der Proliferation auf 322 ± 31 % bzw. 213 ± 18 % beobachtet (siehe Abb. 12). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit einer Studie von Canalis et al., bei der ebenfalls PDGF-BB Konzentrationen zwischen 10 – 100 ng/ml verwendet wurden und eine bis zu sechsfache Proliferationssteigerung von Fibroblasten und Knochenvorläuferzellen aus dem Periost mittels [H^3]-Thymidin-Assays quantifiziert wurde. Zudem wurden eine erhöhte DNS- und Kollagensynthese sowie ein vermehrter Einbau von Prolin in das Kollagen nachgewiesen (Canalis et al., 1989).

In den eigenen Untersuchungen konnte zudem ein additiver Proliferationseffekt bei der gemeinsamen Stimulation der MC3T3-E1 Zellen mit PDGF-BB und Thrombin beobachtet werden (siehe Abb. 12).

Die mitogene Wirkung von PDGF wurde schon sehr früh beschrieben. So haben Hock und Canalis beobachtet, dass der „Platelet-derived growth factor“ in der Lage ist, die Anzahl von Knochenzellen zu erhöhen (Hock und Canalis, 1994). Sandy et al. haben beschrieben, dass PDGF die Inositolphosphat-Konzentration in MG63-Zellen und in menschlichen Osteoblasten erheblich anhebt und somit proliferationsfördernd wirkt (Sandy et al., 1998). Lee et al. konnten in histologischen Untersuchungen eine deutliche Förderung der Wundheilung von Knochendefekten in Rattencalvariae nach Implantation von PDGF-BB beschickten Trikalziumphosphat-Grundmatrices gegenüber nicht-beschickter Trikalziumphosphat-Grundmatrices nachweisen (Lee et al., 2000). Zudem konnte bewiesen werden, dass PDGF-BB neben BMP-2 und BMP-4 die chemotaktische Migration von mesenchymalen Progenitorzellen fördert (Fiedler et al., 2002). In einer späteren Studie von Mehrotra et al. wurde das gesteigerte Migrations- und Proliferationsverhalten von osteoblastenähnlichen MC3T3-E1 Zellen nach Stimulation durch PDGF bestätigt. So wurde nach Stimulation mit 10 ng/ml PDGF ein zehnfacher Anstieg des [H^3]-Thymidin-Einbaus in die Zellen beobachtet. Zudem wurden in dieser Untersuchung der p38 MAP-Kinase Signalweg durch SB 203580 und SB 202190 sowie der ERK-Signalweg durch PD 98059 und U0126 inhibiert. Die Hemmung der p38 MAP-Kinase blockierte die PDGF-abhängige Migration, hatte aber keinen Effekt auf die Proliferation. Bei Hemmung des ERK-Signalweges wurde die Proliferation, nicht aber die Migration inhibiert. Die p38 MAP-Kinase ist demnach überwiegend an der Migration und der ERK-Signalweg mehr an der Proliferation beteiligt (Mehrotra et al., 2004).

Dementsprechend ist der Platelet-derived growth factor aus aktivierten Thrombozyten im Schulte-Koagulum nicht nur an der Proliferation von Knochen- und Knochenvorläuferzellen sondern auch an deren lokalen Migration in das Wundgebiet beteiligt und damit essentiell für die hohe primäre Knochenheilungsrate von 85 % (Maurer, 2002). Daher ist nach der Herstellung des Schulte-Koagulums darauf zu achten, dass es möglichst zügig in die Knochenwunde transferiert wird, da PDGF eine Halbwertszeit von lediglich 2 Minuten besitzt. Ein verzögertes Einbringen des Koagulums in den knöchernen Defekt geht daher immer mit einem Verlust an potentieller Proliferationsförderung einher. Zudem kann auch der beschriebene Effekt der Migration zusätzlicher mesenchymaler Progenitorzellen deutlich geringer ausfallen.

Um bei verschiedenen Versuchsanordnungen, wie zum Beispiel der Verwendung von Überständen aus miniaturisierten Schulte-Koagula, einen mitogenen PDGF-Effekt ausschließen zu können, wurde der PDGF-Rezeptor durch Einsatz von Tyrphostin AG 1296 (10 μ M), einem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität der katalytischen Domäne des PDGF-Rezeptor-Proteins (Gazit et al., 1996) inhibiert (siehe Abb. 15).

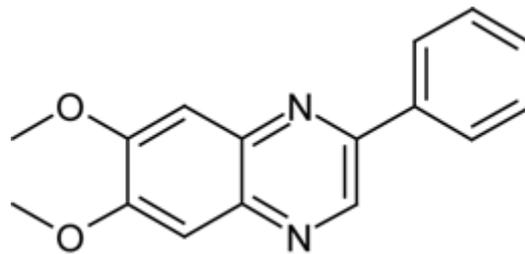


Abb.16: Strukturformel Tyrphostin AG 1296

Die Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors ist essentiell für die Weiterleitung des mitogenen Signals in der Zelle (Escobedo et al., 1988), diese wird durch AG 1296 sowohl für den PDGFR- α als auch PDGFR- β blockiert (Kovalenko et al., 1994). Entsprechend den Untersuchungen an Swiss 3T3 Zellen wurde bei der vorliegenden Arbeit eine AG 1296 Konzentration von 10 μ M gewählt, um eine Autophosphorylierung an Tyrosinresten effektiv zu verhindern (Kovalenko et al., 1994).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist nachvollziehbar, dass Tyrphostin AG 1296 (10 μ M) in der Lage ist, ausschließlich die PDGF-vermittelte Proliferationssteigerung von MC3T3-E1 Zellen effektiv zu inhibieren. Das mitogene Thrombinsignal hingegen wird nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Zudem ist ersichtlich, dass ein gegenüber der singulären Stimulation mit Thrombin oder PDGF-BB ein zum Teil signifikant höherer Proliferationszuwachs registriert wird, wenn die Zellen mit Thrombin und PDGF-BB zusammen inkubiert werden, was für unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege spricht.

In Zuge dieser Erkenntnisse sollte das Zusammenwirken und die Bedeutung der einzelnen Komponenten des Schulte-Koagulums neu bewertet werden. Anhand von „miniaturisierten“ Schulte-Koagula sollte der zeitlich proliferative Einfluss von PDGF am positiven Gesamteffekt des Vollblutgerinnsels ermittelt werden.

Hierzu wurden, wie in Punkt 3.2.4 beschrieben, ca. 1 cm³ große, kubische Gelatineschwämme mit 900 µl frisch entnommenem, venösem Vollblut benetzt und anschließend entweder mit Thrombin (Endkonzentration 1 IE/ml) oder physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) stimuliert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit erfolgte der Transfer der Minikoagula in 1,1 ml physiologische NaCl-Lösung. Nachdem der Ansatz zum Lösen der Bestandteile gerührt worden war, erfolgte nach 5, 30 und 60 Minuten die Abnahme von jeweils 800 µl Überstand. Es schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 200 g an. Vom dem nunmehr klaren Überstand wurden jeweils 100 µl abgenommen und als Stimulus auf die vorbereiteten Zellen pipettiert.

Die Stimulation der Zellen mit den 5 min- Überständen der in vitro generierten, miniaturisierten Schulte-Koagula führte zu einer deutlichen Proliferationssteigerung auf 264 ± 45 % gegenüber dem basalen Kontrollwert. Ein nicht signifikanter ($p = 0,2236$) Zuwachs an proliferativer Wirkung auf 348 ± 44 % wurde nach Stimulation mit den 30 min- Überständen ermittelt. Die Proliferationsrate fällt dann zeitabhängig bei Stimulation mit den 60 min- Überständen wieder auf 251 ± 39 %. Der gleiche zeitliche Verlauf zeigte sich auch bei Verwendung von Überständen der thrombinstimulierten, miniaturisierten Schulte-Koagula. Hierbei erhöht sich die Proliferation initial auf 267 ± 56 % um dann nach Stimulation mit den 30 min- Überständen nicht signifikant ($p = 0,0608$) auf 433 ± 46 % zu steigen. Ein nur geringer Verlust an proliferativer Wirkung auf 419 ± 76 % ist nach Stimulation mit den 60 min- Überständen der thrombinstimulierten, miniaturisierten Schulte-Koagula zu beobachten.

Bezieht man diese in vitro gewonnenen Erkenntnisse auf die klinische Situation muss, wie bereits beschrieben, stets darauf geachtet werden, dass das Schulte-Koagulum nach erfolgreicher Entfernung von Zysten, benignen Tumoren oder retinierten Weisheitszähnen aus frisch entnommenem, venösem Vollblut hergestellt und möglichst schnell in die Knochenwunde transferiert wird. Nur so kann ein Maximum an proliferativer Wirkung auf das umliegende Gewebe erreicht werden. Ein verzögertes Einbringen des Vollblutgerinnsels in den knöchernen Defekt geht mit einem deutlichen Verlust an knochenregenerativer Potenz einher, da vermutlich mitogene Faktoren wie PDGF oder Thrombin ungenutzt zersetzt werden.

Nachdem bei den MC3T3-E1 Zellen durch zehnmünütige Vorinkubation mit Tyrphostin AG 1296 (10 μM) die Tyrosinkinaseaktivität der PDGF-Rezeptoren inhibiert wurde, konnte zum Teil eine signifikante Abnahme der Proliferation nach entsprechender Stimulation ermittelt werden. Sowohl für die Stimulation mit den 5-, 30- und auch 60- min Überständen für das nicht-thrombinstimulierten Koagulum als auch das thrombinstimulierten Koagulum gilt, dass eine deutliche, zum Teil signifikante Verminderung der Proliferation besteht, wenn PDGF nicht zum proliferativen Gesamteffekt beitragen kann (siehe Tab. 4 und Tab. 5).

Daraus lässt sich ableiten, dass ein Großteil der proliferativen Wirkung des Schulte-Koagulums durch PDGF aus aktivierten Thrombozyten generiert wird. Zudem ist dieser proliferationsfördernde PDGF-Effekt nach 30 min am Höchsten. Gruber et al. haben ebenfalls mittels eines [H^3]-Thymidin-Assays einen 50-fach erhöhten DNS-Einbau in Knochenzellen festgestellt, die in Gegenwart von Thrombozyten kultiviert wurden. Ein immerhin noch um den Faktor 20 gesteigerter DNS-Einbau wurde in Gegenwart von Thrombozytenüberständen ermittelt. Durch Einsatz von Anti-PDGF-Antikörpern konnte dieses mitogene Potential unterdrückt werden (Gruber et al., 2002).

Wie aus den eigenen Untersuchungen deutlich wird, ist PDGF in der Lage, die Proliferation von osteoblastenartigen Fibroblasten effektiv zu steigern. Im Gegensatz dazu, ist PDGF nicht in der Lage Differenzierungsvorgänge in mesenchymalen Vorläuferzellen anzuregen (Kumar et al., 2010). Daher muss möglichst vor Anwendung des Schulte-Koagulums zur Füllung von Kieferknochendefekten festgestellt oder beurteilt werden, ob ausreichend vitale und differenzierte Zellen im Wundgebiet vorhanden sind, damit PDGF aus dem Koagulum maximal proliferationsfördernd wirken kann.

Bei den eigenen Versuchen ist trotz Hemmung des PDGF-Rezeptors durch AG 1296 die Proliferation nach Stimulation mit Überständen aus miniaturisierten Schulte-Koagula nicht bis auf den Basalwert gesunken (siehe Tab. 4). Dies lässt sich einerseits mit dem positiv proliferativen Effekt des endogenen entstandenen oder des hinzugefügten Thrombins erklären. Andererseits ist ein proliferationsfördernder Effekt durch sogenannte Mikropartikel denkbar. Mikropartikel sind kleine (unter 1 μm), insbesondere von Thrombozyten nach Aktivierung und Zelltod freigesetzte Membranvesikel. Diese Mikropartikel dienen in erster Linie als Speicher- und Transportvesikel für bioaktive Substanzen (Tissue Factor, P-Selektin, Entzündungsmediatoren) (Morel et al., 2004).

Gruber et al. haben nachgewiesen, dass diese Mikropartikel ebenfalls in der Lage sind, die Knochenzellproliferation zu steigern (Gruber et al., 2002). Darüber hinaus sind Mikropartikel in der Lage, die Proliferation, Adhäsion, Chemotaxis und das Überleben von hämatopoetischen Zellen zu stimulieren (Baj-Krzyworzeka et al., 2002). Weitere durch Thrombozyten freigesetzte Mediatoren, wie zum Beispiel ADP oder Serotonin aus den elektronendichten Granula beeinflussen die Proliferation der MC3T3- E1 Zellen nicht (Linß, 2006). Allerdings werden aus den α -Granula der Thrombozyten neben PDGF weitere Wachstumsfaktoren sezerniert. Hierzu gehören neben TGF β_1 , TGF β_2 , (transforming growth factor 1 und 2), IGF (insulin-like growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) auch EGF (epidermal growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor). Für die knöcherne Regeneration sind insbesondere TGF β_{1+2} und, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, PDGF verantwortlich. Der positive Effekt für TGF β ist dabei allerdings äußerst konzentrationsabhängig (Weibrich et al., 2002).

Im Zuge der Entstehung dieser Arbeit wurde auch Tyrphostin AG 1478, ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität der katalytischen Domäne des EGF-Rezeptors (siehe Abb. 16) und dessen Wirkung auf das proliferative Verhalten der verwendeten MC3T3- E1 Zelllinie untersucht.

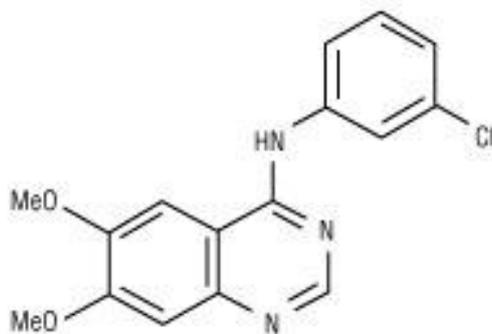


Abb.17: Strukturformel Tyrphostin AG 1478

Wurden die Zellen mit Tyrphostin AG 1478 (10 μ M) vorinkubiert, reduzierte sich sowohl die basale Proliferationsrate (60 ± 6 %) der Zellen als auch der durch Thrombin (1 IE/ml) zuverlässig induzierte (96 ± 12 %) Proliferationszuwachs (siehe Abb. 13). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Tyrphostin AG 1478 nicht nur selektiv die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors inhibiert, sondern auch intrazellulär weitere Enzyme in ihrer Aktivität hemmt und damit mitogen wirksame Signalkaskaden hemmt.

Zu diesem Schluss kommt auch eine andere Studie, in der herausgefunden wurde, dass bei MC3T3-E1 Zellen auf proliferative Reize, in diesem Fall mechanische Beanspruchung, ERK-2 und Shc phosphoryliert sowie ERK 1/2 aktiviert werden. Wurden die Zellen allerdings mit AG 1478 inkubiert, erfolgte weder eine Phosphorylierung noch eine Aktivierung von ERK (Ogata, 2000). Wie aber bereits beschrieben, ist der ERK-Signalweg für die Proliferation der MC3T3-E1 Zellen von entscheidender Bedeutung (Mehrotra et al., 2004). So ist es nicht verwunderlich, dass eine durchweg verminderte Proliferation nach Vorinkubation der Zellen mit Tyrphostin AG 1478 (10 μ M) beobachtet wurde. Dementsprechend muss ERK auch an der ständigen, basalen Proliferation der Zellen beteiligt sein, da diese ebenfalls durch AG 1478 (10 μ M) auf 60 ± 6 % gehemmt wurde.

Bei den eigenen Untersuchungen wurde ebenfalls die durch PDGF hervorgerufene Proliferationssteigerung teilweise unterdrückt. So konnte bei alleiniger Stimulation mit 300 ng/ml PDGF-BB ein Proliferationszuwachs auf 627 ± 32 % registriert werden. Dieser fiel nach Vorinkubation der Zellen mit AG 1478 (10 μ M) signifikant ($p = 0,023$) auf 403 ± 66 % ab. Eine zusätzliche Stimulation durch Thrombin (1 IE/ml) erhöhte die Proliferation nicht nennenswert (siehe Abb. 13). Die gleichen Beobachtungen konnten auch bei geringeren PDGF-Konzentrationen getroffen werden (siehe Abb. 14). Eine andere Möglichkeit wäre demnach auch eine Hemmung der PDGF-Rezeptortyrosinkinase durch AG 1478 mit einer geringeren Potenz als AG 1296.

Es hat ebenso den Anschein, als wäre die proliferationshemmende Wirkung von Tyrphostin AG 1478 (10 μ M) gerade bei geringeren PDGF-Konzentrationen am höchsten. Beziehungsweise sind hohe Konzentrationen an mitogenen Faktoren, wie PDGF oder Thrombin erforderlich um die deutliche Proliferationshemmung, initiiert durch AG 1478 (10 μ M), auszugleichen. Anscheinend wird durch AG 1478 neben der Hemmung der Autophosphorylierung der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors tatsächlich auch intrazelluläre Enzyme, wie ERK, die für die Zellvermehrung eine zentrale Bedeutung haben nicht phosphoryliert und damit inhibiert. Im Gegensatz dazu haben Rice et al. AG 1478 als selektiven EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor an Myofibroblasten identifiziert. In den Untersuchungen wurde durch einen [H^3]-Thymidin-Assay festgestellt, dass PDGF-AB auch nach Vorinkubation der Zellen mit AG 1478 (100 μ mol/L) weiterhin mitogen wirkt, die EGF-induzierte Proliferation allerdings vollständig gehemmt wird (Rice et al., 1999).

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Schulte-Koagulum wurde primär entwickelt, um kleine bis mittelgroße, intraorale Knochendefekte wie z. B. nach Zystektomie, Entfernung von retinierten Weisheitszähnen oder intraossären, benignen Tumoren chirurgisch zu versorgen (Schulte, 1959). Es hat sich über die Jahre als kostengünstiges, sicheres und nebenwirkungsarmes Verfahren bewährt. Im Gegensatz zur Anwendung von alloplastischen Materialien (Knochenersatzstoffe) besticht die biologische Wertigkeit der Methode, die in vorliegender Untersuchung mit modernen Methoden auf der Basis aktueller Erkenntnisse zur Wundheilung bzw. Gerinnungsfunktion nachgewiesen worden ist. Schulte begründete den Erfolg seiner Methode mit der Retraktionsstabilität des Koagulums, hervorgerufen durch Gelatineschwamm und Thrombinzusatz (Schulte, 1964). Das in den knöchernen Defekt eingebrachte, wandständige Koagulum kann so von allen Seiten her organisiert und knöchern durchsetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellbiologischen Effekte des Schulte-Koagulums mittels eines [H^3]-Thymidin-Assays untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Zusammenspiel von Penizillin und Thrombin auf die Proliferation der verwendeten osteoblastenartigen Mäusefibroblasten (MC3T3-E1) gelegt. Zudem wurden zelluläre Effekte von Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden untersucht, um Abschätzen zu können, ob es zellbiologisch sinnvoll ist, das im Schulte-Koagulum verwendete bovine Thrombin gegen die genannten Peptide auszutauschen. Auch die zentrale Rolle von PDGF für die klinische Wirksamkeit des Schulte-Koagulums sollte im Detail beleuchtet werden.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich die Thrombin- und Penizillinkomponente des Schulte-Koagulums gegenseitig beeinflussen. Der durch Thrombin hervorgerufene, deutliche mitogene Effekt wird durch geringe Penizillinkonzentrationen (100 – 10.000 IE/ml Penizillin) teilweise gehemmt. Ab einer Penizillinkonzentration von 100.000 IE/ml starben die untersuchten MC3T3-E1 Zellen, trotz einer Stabilisierung des pH-Wertes bei 7,4 durch HEPES-Puffer (40 mM) ab. Überraschenderweise hatten die verwendeten Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptide (PAR-1, PAR-3, PAR-4) allein und untereinander kombiniert keinerlei Einfluss auf die Proliferation der MC3T3-E1 Zellen. Allerdings wurde ein positiv-proliferativer Effekt in Kombination mit geringen Thrombinkonzentrationen (0,03 und 0,1 IE/ml Thrombin) beobachtet.

Das aus den α -Granula von Thrombozyten freigesetzte PDGF hat einen stark mitogenen Einfluss auf die Proliferation der verwendeten osteoblastenartigen Mäusefibroblasten. So wurde eine Proliferationssteigerung auf $604 \pm 40 \%$ durch Stimulation mit 300 ng/ml PDGF-BB beobachtet. Geringere PDGF-Konzentrationen steigerten die Proliferation ebenfalls deutlich. Durch Tyrphostin AG 1296 (10 μ M), einem selektiven PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor ließ sich die PDGF-Wirkung auf die Zellen sicher und effektiv hemmen. Teilweise war diese Hemmung ebenfalls durch den EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Tyrphostin AG 1478 (10 μ M) zu erreichen.

In Versuchen mit miniaturisierten Schulte-Koagula konnte belegt werden, dass ein Großteil der proliferativen Wirkung des Schulte-Koagulums von PDGF aus aktivierten Thrombozyten ausgeht. So wurden die Zellen zeitlich versetzt mit Überständen der in vitro hergestellten miniaturisierten Schulte-Koagula stimuliert, wobei vorher selektiv die PDGF-Rezeptortyrosinkinaseaktivität durch AG 1296 (10 μ M) gehemmt wurde. Ein Maximum an proliferativer Wirkung wurde nach Stimulation der Zellen mit den 30 min-Überständen des thrombinstimulierten Gerinnsels beobachtet ($433 \pm 46 \%$). Ein deutlicher Verlust an proliferativer Wirkung wurde nach vorheriger Blockade der Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG 1296 (10 μ M) beobachtet. Allerdings senkte sich die Proliferation der Zellen nicht bis auf den basalen Level, was neben der Wirkung von PDGF auch auf einen erwarteten Effekt von Thrombin und andere Faktoren wie zum Beispiel TGF- β und Mikropartikeln schließen lässt.

Zusammenfassend betrachtet, ist das Schulte-Koagulum ein geeignetes, osteoinduktives Verfahren zur Versorgung intraoraler Knochendefekte. Neben dem bereits bekannten mitogenen Thrombineffekt (Linß, 2006) ist in besonderem Maße PDGF an der proliferativen und damit knochenregenerativen Wirkung des Schulte-Koagulums beteiligt. Aus zellbiologischer Sicht macht es jedoch keinen Sinn Thrombin gegen Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide auszutauschen, da keine erhöhte proliferative Wirkung in vitro zu beobachten war. Allerdings sollte eine Reduktion der verwendeten Penizillinmenge in Betracht gezogen werden, um den beobachteten zytotoxischen Penizillineffekt minimieren zu können. Es muss zudem darauf geachtet werden, dass das intraoperativ angefertigte Vollblutgerinnsel möglichst schnell in die Knochenwunde platziert wird, um ein Maximum an proliferativer Wirkung zu erreichen.

Das Schulte-Koagulum stellt daher eine kostengünstige, biologisch quantifizierte und vor allen Dingen einfache Methode dar, um intraorale Knochendefekte schnell zu versorgen.

Es erweist sich also im Nachhinein, dass das von Schulte rein empirisch und vorwiegend auf Basis mechanischer Überlegungen (Retraktionsstabilität) entwickelte Verfahren zur Auffüllung von Knochenhöhlräumen aus heutiger Sicht eine hocheffektive biologische „Verplombung“ darstellt. Es initiiert, unterstützt, beschleunigt und wiederholt die natürlichen Vorgänge der knöchernen Wundheilung und ist deshalb als physiologischste Variante der Auffüllung von Knochenhöhlräumen neben der Verwendung körpereigener Spongiosa zu betrachten. So gesehen war Schulte seiner Zeit um ein halbes Jahrhundert voraus, und sein Verfahren verdient im Vergleich (und in Konkurrenz) zu den heute breit propagierten Methoden mit Verwendung alloplastischer Materialien einen wesentlich höheren Stellenwert als gegenwärtig. Durch die eigenen Untersuchungen ergeben sich darüber hinaus weitere Anstöße für eine Verbesserung des Verfahrens und Erweiterung seiner Indikationen.

7. Literatur

Abraham LA, MacKie EJ (1999) Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1. *J Bone Miner Res* 14:1320-1329

Al-Nawas B, Mäurer M (2008) Serve versus Local Odontogenic Bacterial Infections: Comparison of Microbial Isolates. *Eur Surg Res* 40:220-224

Bahou WF: Thrombin receptors. In: Michelson AD (ed): *Platelets*. Elsevier, Amsterdam, 2007, pp.179-200

Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ (2002) Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30:450-459

Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W, Vlodaysky I (1992) Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:123-130

Bartlett JG (2008) Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection. *Clin Infect Dis* 46:4-11

Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M (1994) PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 125:917-928

Bechstein WO, Strey C (2007) Möglichkeiten der lokalen und systemischen Blutstillung bei chirurgischen Eingriffen. *Chirurg* 78:95-100

Bluteau G, Pilet P, Bourges X, Bilban M, Spaethe R, Daculsi G, Guicheux J (2006) The modulation of gene expression in osteoblasts by thrombin coated on biphasic calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 27:2934-43

Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J (1989) The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* 8:3467-3475

Boskey AL, Posner AS (1984) Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am* 15:597-612

Boström H, Willetts K, Pekny M, Levéen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellström M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C (1996) PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85:863-873

Brook I, Lewis MA, Sándor GK, Jeffcoat M, Samaranayake LP, Vera Rojas J (2005) Clindamycin in dentistry: More than just effective prophylaxis for endocarditis? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:550-558

Buddecke E: *Grundriss der Biochemie*. 9.Auflage. Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York, 1994, S. 519-524

Burnouf T, Padilla A (2006) Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives. *Transfus Clin Biol* 13: 320–328

Canalis E, McCarthy TL, Centrella M (1989) Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 140:530-537

Cazenave JP, Packham MA, Guccione MA, Mustard JF (1973) Effects of penicillin G on platelet aggregation, release, and adherence to collagen. *Proc Soc Biol Med* 142:159-166

Chai F, Hornez JC, Blanchemain N, Neut C, Descamps M, Hildebrand HF (2007) Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics. *Biomol Eng* 24:510-514

Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22:233-241

Christie RJ, Carrington L, Alving B (1997) Postoperative bleeding induced by topical bovine thrombin: report of two cases. *Surgery* 121:708–710

Claesson-Welsh L (1996) Mechanism of action of platelet-derived growth factor. *Int J Biochem Cell Biol* 28:373-385

Clohisy DR, Erdmann JM, Wilner GD (1990) Thrombin binds to murine bone marrow-derived macrophages and enhances colony-stimulating factor-1-driven mitogenesis. *J Biol Chem* 265:7729-7732

Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M (2008) Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 19:796-803

Cordier C, Bencsik A, Philippe S, Bétemps D, Rozon F, Calavas D, Crozet C, Baron T (2006) Transmission and characterization of bovine spongiform encephalopathy sources in two ovine transgenic mouse lines (TgOvPrP4 and TgOvPrP59). *J Gen Virol* 87: 3763–3771

Coughlin SR (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11023-11027

Cupit LD, Schmidt VA, Bahou WF (1999) Proteolytically activated receptor-3: a member of an emerging gene family of protease receptors expressed on vascular endothelial cells and platelets. *Trends Cardiovasc Med* 9:42-48

Davis HE, Rao RR, He J, Leach JK (2009) Biomimetic scaffolds fabricated from apatite-coated polymer microspheres. *J Biomed Mater Res A* 90:1021-1031

Degen SJ, MacGillivray RT, Davie EW (1983) Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry* 22:2087-2097

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274:1429-1452

DeVeau I, Dabbah R, Sutton S (2004) The USP perspective to minimize the potential risk of TSE infectivity in bone-derived article used in the manufacture of medical products. *Pharmacopeial Forum* 30:1911-1921

Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E (2008) Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov* 92:161-168

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392-1404

Döri F, Kovacs V, Arweiler NB, Huszár T, Gera I, Nikolidakis D, Sculean A (2009) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral: a pilot study. *J Periodontol* 80:1599-1605

Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood, LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221:275-277

Dorion RP, Hamati HF, Landis B, Frey C, Heydt D, Carey D (1998) Risk and clinical significance of developing antibodies induced by topical thrombin preparations. *Arch Pathol Lab Med* 122:887-894

Ducy P, Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57:2207-2214

Dunn BL, Uber WE, Ikonomidis JS (2009) Topical thrombin preparations and their use in cardiac surgery. *Open Access Surgery* 2:15-34

Eckert AW: Erregerspektrum und Resistenzsituation bei Infektionen im mund-, kiefer- und gesichtschirurgischem Bereich. Dissertationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003, S. 23-39

Eckert AW, Höhne C, Schubert J (2000) Erregerspektrum und Resistenzsituation bei rein anaeroben odontogenen Infektionen. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4:153-158

Eckert AW, Maurer P, Wilhelms D, Schubert J (2005) Keimspektren und Antibiotika bei odontogenen Infektionen. *Renaissance der Penicilline? Mund Kiefer Gesichtschir* 9:377-83

Edin ML, Miclau T, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE (1996) Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 333:245-251

Ehanire I, Tucci M, Franklin L, Russell G, Benghuzzi H (2007) The effects of tobramycin on MG 63 cell viability and function. *Biomed Sci Instrum* 43:182-187

Escobedo JA, Barr PJ, Williams LT (1988) Role of tyrosine kinase and membrane-spanning domains in signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 8:5126-5131

Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P (2008) Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 29:1177-1188

Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE (2002) BMP-2, BMP-4 and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87:305-312

Fleming A, Fish EW (1947) Influence of penicillin on coagulation of blood with especial reference to certain dental operations. *Br Med J* 2:242-243

Frenken JW, Bouwman WF, Bravenboer N, Zijdeveld SA, Schulten EA, ten Bruggenkate CM (2010) The use of Straumann Bone Ceramic in a maxillary sinus floor elevation procedure: a clinical, radiological, histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period. *Clin Oral Implants Res* 21:201-208

Frost A, Jonsson KB, Ridefelt P, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren Ö (1999) Thrombin, but not bradykinin, stimulates proliferation in isolated human osteoblasts, via mechanism not dependent on endogenous prostaglandin formation. *Acta Orthop Scand* 70:497-503

Fu YC, Nie H, Ho ML, Wang CK, Wang CH (2008) Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2. *Biotechnol Bioeng* 99:996-1006

Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, Sanroman F, Watzek G (2003) Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 14:500-508

Gandossi E, Lunven C, Berry CN (2000) Role of clot-associated (-derived) thrombin in cell proliferation induced by fibrin clots in vitro. *Brit J Pharmacol* 129:1021-1027

Gazit A, App H, McMahon G, Chen J, Levitzki A, Bohmer FD (1996) Tyrphostins. 5. potent inhibitors of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase: structure-activity relationships in quinoxalines, quinolines, and indole tyrphostins. *J Med Chem* 39:2170-2177

Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Hofstrand PD, Gao Z, Shoemaker K, Bukowski TR, Moore M, Feldhaus AL, Humes JM, Palmer TE, Hart CE (2001) Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem* 276:27406-27414

Glowacki J, Zhou S, Mizuno S (2009) Mechanisms of osteoinduction/chondroinduction by demineralized bone. *J Craniofac Surg* 20:634-638

Graham DJ, Alexander JJ (1990) The effects of thrombin on bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 11:307-313

Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW (1996) Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 313:353-368

Gross R, Matis P (1952) Retraction of the blood clot; its disturbances; studies on retraction time. *Z Klin Med* 150:13-27

Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G (2002) Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet- derived growth factor, microparticles and membranes. Clin Oral Implants Res 13:529-535

Grundmann L: Einführung in die Allgemeine Pathologie. 9.Auflage. Urban Fischer Verlag, München Jena, 1994, S. 144 f.

Habibovic P, Kruyt MC, Juhl MV, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, Theilgaard N, van Blitterswijk CA (2008) Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. J Orthop Res 26:1363-1370

Hämmerle CHF, Jung RE, Yaman D, Lang NP (2008) Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. Clin Oral Implants Res 19:19-25

Harnack L, Boedeker RH, Kurtulus I, Boehm S, Gonzales J, Meyle J (2009) Use of platelet-rich plasma in periodontal surgery- a prospective randomised double blind clinical trial. Clin Oral Investig 13:179-187

Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C (2002) Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. Neurosurg 50:510-516

Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol Rev 79:1283-1316

Heuchel R, Berg A, Tallquist M, Ahlén K, Reed RK, Rubin K, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Soriano P (1999) Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 96:11410-11415

Hock JM, Canalis E (1994) Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. Endocrinology 134:1423-1428

Höhne C, Schubert J, Eckert A (1997) Spectrum of anaerobes found in materials from intraoral abscesses yielding only anaerobes. *Rev Medical Microbiol* 8:19

Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A (2006) Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35:708-713

Hünerbein I: Untersuchung toxikologischer Effekte von Penicillin G auf das initiale Lymphgefäßsystem und auf die Epithelregeneration der humanen Haut, Dissertationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2010, S. 36-65

Isaac J, Loty S, Hamdan A, Kokubo T, Kim HM, Berdal A, Sautier JM (2009) Bone-like tissue formation on a biomimetic titanium surface in an explant model of osteoconduction. *J Biomed Mater Res A* 89:585-593

Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386:502-506

Jelkmann W: Blut. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 509-537

Jones GL, Walton R, Czernuszka J, Griffiths SL, El Haj AJ, Cartmell SH (2010) Primary human osteoblast culture on 3D porous collagen- hydroxyapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 94:1244-1250

Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeug D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694

Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ (2000) Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 59:1223-1232

Kappe T, Cakir B, Mattes T, Reichel H, Flören M (2010) Infections after bone allograft surgery: a prospective study by a hospital bone bank using frozen femoral heads from living donors. *Cell Tissue Bank* 11:253-259

Kazlauskas A, Durden DL, Cooper JA (1991) Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regul* 2:413-425

Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJ (2009) Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30:2816-2825

Kessler CM, Ortel TL (2009) Recent developments in topical thrombins. *Thromb Haemost* 102:15-24

Klammt J: Praxis der Zahntfernung. 2. Auflage. Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden am Taunus, 2004, S. 122-129

Kloss FR, Schlegel KA, Felszeghy E, Falk S, Wiltfang J (2004) Anwendung eines osteoinduktiven Proteinkomplexes zur Regeneration knöcherner Defekte. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8:12-17

Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M (2008) Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials* 29:2249-2258

Kobbe P, Tarkin IS, Frink M, Pape HC (2008) Gewinnung großvolumiger Spongiosamengen zur autologen Knochentransplantation aus dem femoralen Markraum. *Unfallchirurg* 111:469-472

Kodama I, Amagai Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S (1981) Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol* 23:899-901

Kovalenko M, Gazit A, Böhmer A, Rorsman C, Rönstrand L, Heldin CH, Waltenberger J, Böhmer FD, Levitzki A (1994) Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer Res* 54:6106-6114

Kroczek A, Park J, Birkholz T, Neukam FW, Wiltfang J, Kessler P (2010) Effects of osteoinduction on bone regeneration in distraction: results of a pilot study. *J Craniomaxillofac Surg* 38:334-344

Kühnel W: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2002, S. 146-157

Kumar A, Salimath BP, Stark GB, Finkenzeller G (2010) Platelet-derived growth factor receptor signaling is not involved in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 16:983-993

LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, Sullivan C, Boldog F, Yang M, Vernet C, Burgess CE, Fernandes E, Deegler LL, Rittman B, Shimkets J, Shimkets RA, Rothberg JM, Lichtenstein HS (2001) PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature Cell Biology* 3:517-521

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF (2006) Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3:49-57

Lawson JH (2006) The clinical use and immunologic impact of thrombin in surgery. *Semin Thromb Hemost* 32:98-110

Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP (2000) The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 71:418-424

Levéen P, Pekney M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C (1994) Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8:1875-1887

Li S, Tu Q, Zhang J, Stein G, Lian J, Yang PS, Chen J (2008) Systemically transplanted bone marrow stromal cells contributing to bone tissue regeneration. *J Cell Physiol* 215:204-209

Linß C: Die Eigenblutfüllung von Knochenhöhlräumen nach SCHULTE – neue Erkenntnisse. Dissertationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2006, S. 11-17; 18-27

Lüllmann-Rauch R: Histologie. 1. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart New York, 2003, S. 122-140

Lutz D (1975) Spurenelementgehalt in Leber, Knochen und Ovar: Altersabhängigkeit, biologische und mathematisch-statische Beziehungen. *Zeitschrift für Gerontologie* 8:28-37

Lv Q, Nair L, Laurencin CT (2009) Fabrication, characterization, and in vitro evaluation of poly(lactic and glycolic acid)/ nano-hydroxyapatite composite microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering in rotating bioreactors. *J Biomed Mater Res A* 91:679-691

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245-282

Marks KE, Nelson CL, Lautenschlager EP (1976) Antibiotic-impregnated acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg Am* 58:358-364

Maurer P, Goldbecher C, Eckert AW, Schubert J (2002) Auffüllung von Knochendefekten der Kiefer durch das stabilisierte Eigenblutkoagulum nach Schulte. *Quintessenz* 53:803-806

Mazock JB, Schow SR, Triplett RG (2003) Posterior iliac crest bone harvest: review of technique, complications, and use of an epidural catheter for postoperative pain control. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1497-1503

Mehrotra M, Krane SM, Walters K, Pilbeam C (2004) Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 93:741-752

Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE (1995) Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *J Orthop Trauma* 9:401-406

Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE (1998) Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG 63 human osteosarcoma cells in vitro. *J Orthop Res* 16:509-512

Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Braas LF (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272:4043-4049

Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM (2004) Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 11:156-164

Nair PN, Luder HU, Maspero FA, Fischer JH, Schug J (2006) Biocompatibility of Beta-tricalcium phosphate root replicas in porcine tooth extraction sockets- a correlative histological, ultrastructural, and x-ray microanalytical pilot study. *J Biomater Appl* 20:307-324

Naldini A, Carney DH, Bocci V, Klimpel KD, Asuncion M, Soares LE, Klimpel GR (1993) Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production. *Cell Immunol* 147:367-377

Natelson EA, Brown CH, Bradshaw MW, Alfrey CP Jr, Williams TW Jr (1976) Influence of cephalosporin antibiotics on blood coagulation and platelet function. *Antimicrob Agents Chemother* 9:91-93

Niedhart C, Pingsmann A, Jurgens C, Marr A, Blatt R, Niethart FU (2003) Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm – eine prospektive, kontrollierte Studie. *Z Orthop Grenzgeb* 141:481-486

Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM (1997) Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11:1-22

Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, Dell'Omo G, Cartoni C, Ingrosso L, Boyle A, Galeno R, Sbriccoli M, Lipp HP, Bruce M, Pocchiari M, Agrimi U (2006) Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* 2: e12

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9208-9212

Ogata T (2000) Fluid flow-induced tyrosine phosphorylation and participation of growth factor signaling pathway in osteoblast-like cells. *J Cell Biochem* 76:529-538

Parfitt AM (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55:273-286

Pastakia KB, Terle D, Prodonz KN (1993) Penicillin-induced dysfunction of platelet membrane glycoproteins. *J Lab Clin Med* 121:546-554

Rahn R, Knothe H (1991) Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis. *Zahnärztl Mitt* 23:2384 – 2388

Reichl FX, Mohr K, Hein L, Hickel R: Taschenatlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner. 1. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2007, S. 146-149

Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, Bonner JC (1999) Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am J Pathol* 155:213-221

Richter IG: Einfluss von Thrombin und Thrombinrezeptor-aktivierenden Peptiden (TRAP) auf die Mitogenese von Gefäßmuskelzellen: Untersuchungen zur Signaltransduktion, Dissertationsschrift, Philipps-Universität Marburg, 2002, S. 35-62

Roosa SM, Kempainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ (2010) The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *J Biomed Mater Res A* 92:359-368

Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1207-1210

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46:155-169

Rothenberg DM, Moy JN (1993) Anaphylactic reaction to topical bovine thrombin. *Anesthesiology* 78:779–782

Sadler TW: *Medizinische Embryologie*. 10. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, 2003, S. 77-84

Sancho-Puchades M, Herraiz-Vilas JM, Berini-Aytes L, Gay-Escoda C (2009) Antibiotic prophylaxis to prevent local infection in Oral Surgery: use or abuse? *Med Oral Patol Cir Bucal* 14:28-33

Sands JJ, Nudo SA, Ashford RG, Moore KD, Ortel TL (2000) Antibodies to topical bovine thrombin correlate with access thrombosis. *Am J Kidney Dis* 35:796–801

Sandy J, Davies M, Prime S, Farndale R (1998) Signal pathways that transduce growth factor-stimulated mitogenesis in bone cells. *Bone* 23:17-26

Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, Wheaton VI, Turck CW, Coughlin SR (1992) Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem* 267:13146-13149

Schiebler TH, Schmidt W: *Anatomie*. 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2002, S. 65-70, 133-137

Schlegel KA, Neukam FW: Augmentationen, Knochenersatzmaterialien, Membranen. In: Reichart PA (Hrsg): *Curriculum Zahnärztliche Chirurgie Band I*. Quintessenz-Verlag, Berlin, 2002, S. 434-459

Schlegel KA, Kloss FR, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Wiltfang J (2003) Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Kombination von autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien. Mund Kiefer GesichtsChir 7:112-118

Schmidt VA, Niermann WC, Maglott DR, Cupit LD, Moskowitz KA, Wainer JA, Bahou WF (1998) The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets. J Biol Chem 273:15061-15068

Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ (2003) Knochenersatzwerkstoffe. Orthopäde 32:2-10

Schulte W (1959) Über den primären Nahtverschluß nach intraoralen Eingriffen am Kieferknochen und die Defektversorgung mit Gelatineschwamm, Penizillin und Thrombin. Dtsch Zahnärztl Z 6:456-471

Schulte W (1960a) Die Hemmung der Blutgerinnung bei lokaler Penizillin- Anwendung und ihre Verhütung. Dtsch Zahn Mund Kieferhkl 3-6:147-165

Schulte W (1960b) Die Eigenblutfüllung: eine neue Methode zur Versorgung größerer Knochendefekte nach intraoralen Eingriffen. Dtsch Zahnärztl Z 15:910-914

Schulte W: Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung für die primäre Heilung von Kieferknochendefekten. Habilitationsschrift. Carl Hanser Verlag, München, 1964, S. 9-16

Sittitavornwong S, Gutta R (2010) Bone graft harvesting from regional sites. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 22:317-330

Stürmer KM (1996) Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. Orthopäde 25:386-393

Spero JA (1993) Bovine thrombin-induced inhibitor of factor V and bleeding risk in postoperative neurosurgical patients: Report of three cases. J Neurosurg 78:817-820

Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96:191-198

Teitelbaum SL (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 170:427-435

Terheyden H, Jepsen S (1999) Hartgeweberegeneration durch Wachstumsfaktoren und morphogene Proteine. Grundlagen und klinische Anwendung. *Implant* 4:359-378

Terheyden H (2001) Wachstumsfaktoren und osteoinduktive Proteine in der zahnärztlichen Implantologie. *Dtsch Zahn Mund Kieferhkl* 17:476-485

Terrab A, Pawlak D, Spaay P, Hoppensteadt D, Fareed J (2008) Further removal of factor V related antigen from bovine thrombin by utilizing a membrane-filtration step. *Clin Appl Thromb Hemost* 14:135–140

Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosin kinase activity. *Cell* 20:203-212

Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967) The bone induction principle. *Clin Ortop Relat Res* 53:243-283

Vouret-Craviari V, Van Obberghen-Schilling E, Rasmussen UB, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J (1992) Synthetic alpha-thrombin receptor peptides activate G protein-coupled signaling pathways but are unable to induce mitogenesis. *Mol Biol Cell* 3:95-102

Vouret-Craviari V, Van Obberghen-Schilling E, Scimeca JC, Van Obberghen E, Pouyssegur J (1993) Differential activation of p44mapk (ERK1) by alpha-thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem J* 289: 209-214

Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991a) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068

Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR (1991b) Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353:674-677

Wahlig H, Dingeldein E (1980) Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 51:49-56

Weibrich G, Gnoth SH, Otto M, Reichert T, Wagner W (2002) Wachstumsstimulation von humanen Osteoblast-like cells durch Thrombozytenkonzentrate in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir* 6:168-174

Westermarck B, Claesson-Welsh L, Heldin CH (1989) Structural and functional aspects of the receptors for platelet-derived growth factor. *Prog Growth Factor Res* 1:253-266

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA (2004) Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* 15:187-193

Wintermantel E, Ha SW: *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen, Implantate für Medizin und Umwelt*. 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998

Wolff KD, Swaid S, Nolte D, Böckmann RA, Hölzle F, Müller-Mai C (2004) Degradable injectable bone cement in maxillofacial surgery: indications and clinical experience in 27 patients. *J Craniomaxillofac Surg* 32:71-79

Xu C, Su P, Wang Y, Cheng X, Meg Y, Liu C, Yu X, Yang X, Yu W, Zhang X, Xiang AP (2010) A novel biomimetic composite scaffold hybridized with mesenchymal stem cells in repair of rat bone defects models. *J Biomed Mater Res A* (Epub: 27.07.2010)

Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6642-6646

Zhou X, Zhang Z, Li S, Bai Y, Xu H (2010) Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. Br J Oral Maxillofac Surg 27 (Epub: 27.01.2010)

8. Thesen

1. Das Schulte-Koagulum besteht klassischerweise aus venösem Vollblut, Thrombin, Benzylpenizillin und einem Gelatineschwamm und dient zur Auffüllung von Knochendefekten über Kirschgröße im Kieferbereich. Durch Verwendung des Gelatineschwamms wird eine Retraktionsstabilität des Koagulums erreicht, Penizillin dient als Infektionsprophylaxe und Thrombin hebt die durch das Antibiotikum bedingte Blutgerinnungshemmung auf.
2. Das Verfahren wurde von Schulte auf Grund seiner mechanischen Stabilität im Vergleich zum natürlichen Blutkoagulum entwickelt, um die in größeren Knochenhöhlen einsetzende Retraktion und damit Infektionsgefahr zu verhindern.
3. Im Licht moderner biologischer Erkenntnisse ergeben sich folgende neue Aspekte, die in einer Zellkultur mit osteoblastenartigen Mäusefibroblasten (MC3T3-E1) gewonnen wurden:
 1. Thrombin wirkt mitogen und aktiviert Thrombozyten, welche selbst Wachstumsfaktoren wie den „Platelet-derived growth factor“ sezernieren.
 2. Hohe Dosen von 100.000 IE/ml Penizillin führen zum Absterben der Zellkulturlinie. Dieser Effekt kann auch durch die Kombination mit hohen Thrombinkonzentrationen (bis 100 IE/ml) nicht verhindert werden.
 3. Eine niedrige Dosierung von Penizillin (ab 10.000 IE/ml bis 100 IE/ml) bedingt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation.
 4. Diese kann durch Kombination mit Thrombin vollständig aufgehoben werden.
 5. Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide (PAR-1, PAR-3, PAR-4) haben in der Konzentration von 100 μ M dagegen keinen Einfluss auf die Zellproliferation.
 6. Gering dosiertes PAR-1 Peptid in Kombination mit Thrombin steigert die Zellproliferation signifikant gegenüber dem alleinigen Thrombinstimulus.

7. PDGF wirkt stark mitogen und ist in der Lage, konzentrationsabhängig die Proliferation gegenüber dem Basalwert bis auf 600 % zu erhöhen.
 8. Diese Zunahme kann durch den PDGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor AG 1296 (10 μ M) vollständig gehemmt werden.
 9. Die im Überstand von Schulte-Koagula enthaltenen biologisch aktiven Stoffe stimulieren vergleichbar und zeitabhängig die Zellproliferation. Hierbei wird nach 30 Minuten nach Induktion der Koagula in vitro ein Maximalwert beobachtet.
 10. Etwa die Hälfte dieser Proliferationssteigerung ist durch PDGF hervorgerufen, da sie durch AG 1296 (10 μ M) gehemmt werden kann.
4. Die Untersuchungen beweisen die hohe biologische Wertigkeit des Verfahrens von Schulte über die reine koagulumstabilisierende Wirkung hinaus, das nach heutigem Kenntnisstand eine stimulierte physiologische Knochenheilung in Gang setzt und als innovative Leistung des Inaugurators bezeichnet werden kann.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Krause
Vorname: Sebastian
Geburtstag: 04.04.1983
Geburtsort: Apolda
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989-1993 Grundschule „Am Nussberg“, Apolda
1993-1999 Sportgymnasium „Johan Christoph Friedrich GutsMuths“, Jena
1999-2002 Eliteschule des Sports, Halle; Abitur

Grundwehrdienst:

2002 Sanitätsausbildungszentrum SÜD, Feldkirchen
2003 Sanitätszentrum Weißenfels, Weißenfels

Hochschulbildung:

2003-2008 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg; Staatsexamen
2008 Approbation als Zahnarzt

Beruflicher Werdegang:

07.01.2009 Wiedereinstellung in die Bundeswehr (Dienstgrad: Stabsarzt)
Sanitätszentrum Münster,
Stellvertretender Leiter Zahnarzttrupp Münster-Handorf
seit 01.07.2009 Leiter Zahnarzttrupp Münster-Handorf

Selbstständigkeitserklärung

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

Telgte, den 07.02.2011

Sebastian Krause

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.

Telgte, den 07.02.2011

Sebastian Krause

Hinweise auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Linß C, Krause S, Schubert J, Presek P (2006) Vortrag auf dem XXIst European Platelet Meeting, Lutherstadt Wittenberg. 12. - 14. Oktober 2006. Effects of components of a blood coagulum according to SCHULTE on proliferation of osteoblast- like cells.

Krause S, Linß C, Schubert J, Presek P (2008) Posterdemonstration auf dem bone-tec 2008 Bone Tissue Engineering Congress, Hannover. 07. - 09. November 2008. Blood Coagulum after Schulte: Effects on the Proliferation of Osteoblast-Like Cells.

Krause S, Linß C, Presek P, Schubert J (2009) Posterdemonstration auf dem 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Wien. 03. - 06. Juni 2009. Mode of Action of Components of the Blood Coagulum after Schulte on Bone Regeneration.

Krause S (2010) Vortrag bei der Fortbildungstagung der Landeszahnärztekammer Sachsen-Anhalt, Halle (Saale). 04. Dezember 2010. Die Wirkung der Bestandteile des autologen Blutkoagulums nach Schulte auf Osteoblasten.

Hinweise auf erhaltene Preise für die Ergebnisse dieser Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit dem „Student Poster Award 2008“ auf dem bone-tec 2008; Bone Tissue Engineering Congress in Hannover ausgezeichnet.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich recht herzlich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas sowie die jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Peter Presek, Leiter der Sektion für Klinische Pharmakologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gilt mein ganz besonderer Dank. Einerseits für die immerwährende, intensive Unterstützung bei der experimentellen Umsetzung der Arbeit sowie die wertvollen Hinweise bei deren Durchführung, andererseits für die Bereitstellung von Laborräumen und Material.

Ebenfalls ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Beatrice Bühligen, Frau Dr. med. Christine Linß, Frau Katrin Vogel, Frau Christine Föhrkolb, Frau Christine Walther sowie Herrn Dr. med. Willi Groß für die Zusammenarbeit, Einarbeitung in Material und Methode sowie deren Kritik bei der Umsetzung der Arbeit.

Für seine Hilfe bei allen Fragen rund um Word und Excel, danke ich Herrn Sascha Klein.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, sowie meiner Schwester Franziska, für den Beistand in allen Lebenslagen, während des Studiums und der Doktorarbeit. Vielen Dank für Euer Verständnis, Eure Geduld und Euer in mich gesetztes Vertrauen. Ohne Eure Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.