

G. Weibrich¹ · S.-H. Gnoth¹ · M. Otto² · T. E. Reichert¹ · W. Wagner¹

¹Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinik Mainz

²Institut für Pathologie, Universitätsklinik Mainz

Wachstumsstimulation von humanen osteoblastenähnlichen Zellen durch Thrombozytenkonzentrate in vitro

Zusammenfassung

Fragestellung: Thrombozyten enthalten verschiedene Wachstumsfaktoren, deren möglicher Nutzen zur Beschleunigung der Knochenregeneration aktuell diskutiert wird. Basisdaten zur biologischen Wirkung von Thrombozytenkonzentraten (platelet-rich plasma: PRP) stehen derzeit noch weitgehend aus. Daher wurde in dieser Studie der In-vitro-Effekt von PRP auf die Proliferationsrate von humanen osteoblastenähnlichen Zellen untersucht (OLC: osteoblast-like cells).
Material und Methode: Aus humaner Beckenkamm-spongiosa in Zellkultur etablierte OLC wurden mit Thrombozyten (Thr) in verschiedenen Verdünnungslösungen (0–1.700.000 Thr/ μ l) stimuliert. Nach 3 Tagen erfolgte ein WST-1-Test (Roche Diagnostics) zur Quantifizierung der mitochondrialen Synthese bzw. der zellulären Proliferationsrate.

Ergebnisse: Die gemessenen Extinktionen von OLC ließen sich in vitro durch die Zugabe von Thrombozyten konzentrationsabhängig bis zu einem Plateau steigern. Eine Stimulation über diesen Peak hinaus führte zu einem leichten Abfall der Extinktionswerte. Die statistische Analyse der Extinktionskurven nach Brunner und Langer ergab beim paarweisen Vergleich der evaluierten Zellproliferationsraten (nach Stimulation mit unterschiedlich konzentrierten Thrombozytenverdünnungslösungen) signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$). Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich auch hinsichtlich des Zeitverlaufs der Extinktionsmessungen nach 0–5 h ($p < 0,0001$).

Schlussfolgerung: Die Studie zeigt, dass die Proliferationsrate von humanen OLC in vitro

durch PRP konzentrationsabhängig gesteigert werden kann. Dieses In-vitro-Ergebnis stützt damit die aktuell diskutierte Annahme, dass der klinische Einsatz von Thrombozytenkonzentraten die Knochenregeneration beschleunigen könnte.

Schlüsselwörter

In vitro · Platelet-rich-Plasma (PRP) · Thrombozytenkonzentrat · Humane osteoblastenähnliche Zellen · Proliferation

Thrombozyten enthalten verschiedene Wachstumsfaktoren wie

- PDGF (platelet-derived growth factor),
- TGF- β 1 (transforming growth factor β 1)
- TGF- β 2 (transforming growth factor β 2),
- IGF (insulin-like growth factor),
- EGF (epidermal growth factor),
- ECGF (epithelial cell growth factor) sowie
- einen Wachstumsfaktor für Leberzellen [6].

Für die rekombinanten Varianten dieser Wachstumsfaktoren sind Effekte im Zellkulturversuch [7] sowie in der den-toalveolären Chirurgie [2, 4, 9, 10] (vorwiegend im Tierversuch) und im (anderen Regenerationsanforderungen und -bedingungen unterliegenden) parodontal-chirurgischen Bereich [13, 14, 15] in Kombination mit verschiedenen Kno-

chenersatzmaterialien mehrfach positiv diskutiert worden. Ein einziger Bericht zur Anwendung von plättchenreichem Plasma [(plasma rich in growth factors: PRGF; nach der Methode von Anitua hergestelltes PRP (platelet-rich plasma)] am Patienten ($n=10$) findet sich in der Literatur; dieser schildert ebenfalls positive Erfahrungen [1]. Die einzige überzeugende, in der Literatur bisher vorliegende Arbeit zur systematischen Untersuchung des biologischen Effekts von PRP (platelet-rich plasma) stammt von Marx et al. [11] und konnte radiologisch und histologisch einen positiven Effekt von PRP für eine bestimmte Indikation zeigen (Unterkieferrekonstruktion mittels autologem Knochentransplantat bei Zustand nach Unterkieferkontinuitätsresektion). Marx et al. [11] fanden, dass der Zusatz von PRP zu einer Steigerung der Knochendichte im autologen Beckenkammtransplantat nach 6 Monaten führte ($n=44$ Patienten). Als Ursache der Stimulation der Knochenregeneration (Knochendichte und -reifung) wurde von Marx et al. [11] der Gehalt an thrombozytären Wachstumsfaktoren postuliert. Die Quantifizierung einiger Wachstumsfaktoren in solchen Throm-

Online publiziert: 4. April 2002
© Springer-Verlag 2002

Dr. Dr. G. Weibrich
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie,
Universitätsklinik Mainz,
Augustusplatz 2, 55131 Mainz,
E-mail: weibrich@mkg.klinik.uni-mainz.de,
Phone: 06131-173083, Fax: 06131-176602

G. Weibrich · S.-H. Gnoth · M. Otto ·
T. E. Reichert · W. Wagner

Stimulation of the proliferation rate of human osteoblast-like cells by platelet concentrates in vitro

Abstract

Aim of the study: Thrombocytes contain different growth factors. Their potential use for increasing bone regeneration is currently under discussion. Basic data about the biologic effect of platelet concentrates (platelet-rich plasma, PRP) are still lacking. This study analyzes the in vitro effect of PRP on the proliferation rate of human osteoblast-like cells (OLC).

Material and method: Human OLC were stimulated with thrombocytes in different dilutions (0–1,700,000 thrombocytes/ μ l). Three days later a WST test (Roche Diagnostics) was performed to measure the mitochondrial syntheses and cellular proliferation rate.

Results: The proliferation rate of the OLC was (concentration-dependent) increased up to a certain plateau by adding thrombocytes. Further stimulation led to a slight decrease in the proliferation rate. The statistical analysis of the extinction measurements showed significant differences in the cell proliferation rates between mostly all thrombocyte concentration groups ($p < 0.0001$). Moreover, a statistically significant difference was evaluated for the time-dependent change in extinction (0–5 h) ($p < 0.0001$).

Conclusion: This study shows that the proliferation rate of human OLC can be stimulated in vitro by concentration-dependent platelet concentrates. This in vitro result supports the currently discussed assumption that the clinical use of PRP might increase bone regeneration.

Keywords

In vitro · Platelet-rich plasma · Platelet concentrate · Human osteoblast-like cells · Proliferation

bozytenkonzentraten (wie auch von Marx et al. [11] verwendet) zeigte – diese Postulation stützend – hohe Konzentrationen für PDGF-AB (117 ± 63 ng/ml), TGF- β 1 (169 ± 84 ng/ml) sowie IGF-I (84 ± 23 ng/ml), während einige andere Wachstumsfaktoren nur in weit geringeren Konzentrationen nachweisbar waren (PDGF-BB 10 ± 8 ng/ml, TGF- β 2 $0,4 \pm 0,3$ ng/ml) [20]. Unklar ist bisher, ob mit Hilfe dieser Wachstumsfaktorengehalte im Nanogramm-Bereich ähnlich gute Effekte wie unter dem Einsatz hoher Konzentrationen rekombinanter Wachstumsfaktoren ausreichend zuverlässig erzielt werden können.

Die Anwendung von PRP an Patienten erfolgt mittlerweile in zahlreichen zahnärztlich chirurgischen Praxen, obwohl der biologische Effekt von PRP noch nicht ausreichend belegt ist. Daher wurde in dieser Studie der biologische Effekt von PRP im Zellkulturmodell an humanen Zellen ossären Ursprungs überprüft.

Material und Methoden

Thrombozytenkonzentratherstellung mittels diskontinuierlicher Zellseparation

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Thrombozytenkonzentrate wurden mittels diskontinuierlicher Zellseparation (oder auch Thrombozytapherese) unter Verwendung eines Haemonetics Zellseparators (MCS 3p, Haemonetics, München) in der Transfusionszentrale der Johannes-Gutenberg-Universität hergestellt.

Der Zellseparator entnimmt mittels intermittierendem (diskontinuierlichem) Fluss 400–450 ml Vollblut, welches mit Antikoagulanzen versetzt (1 ml Zitratphosphatdextrose auf 5 ml Vollblut) und anschließend in einen rotierenden Zentrifugenbecher überführt wird, in welchem das Blut in 3 Bestandteile aufgeteilt wird:

- Erythrozyten,
- Thrombozyten (enthält auch die Leukozyten) sowie
- die Plasmafraktion (enthält kaum zelluläre Bestandteile).

Ein Teil des Plasmas rezirkuliert erneut in die Zentrifugenkammer, um die Thrombozytenausbeute durch längeren

Aufenthalt in der Zentrifugationskammer zu erhöhen. Nachdem Erythrozytenfraktion und Plasma dem Spender retransfundiert wurden, wird die nächste Teilmenge Vollblut entnommen, bis nach mehreren Separationsschritten das vorher eingestellte Thrombozytenkonzentratvolumen erreicht ist. Die Thrombozytenkonzentrate werden dann routinemäßig in PVC-Beuteln auf bewegten Gitterrosten gelagert.

Nach Vorbereitung der OLC-Kulturen (Etablierung bei 10% FCS, Kultivierung bei 2% FCS, Aussaat in die Mikrotiterplatten bei 2% FCS, s. unten) wurden aus einem frisch hergestellten Thrombozytenkonzentrat (Methode s. oben) nach mehrfachem Waschen mit 10 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem EDTA- $0,5\%$ -PBS-Puffer zur Entfernung von Restplasmaanteilen 8 verschiedene Verdünnungen (und eine Leerkontrolle ohne Thrombozyten) unter Zugabe von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem Puffer (HBSS) hergestellt. Zur Qualitätskontrolle wurde von den verschiedenen Thrombozytenkonzentratverdünnungen automatisiert die Thrombozytenkonzentration bestimmt (MCS+, Haemonetics, München).

Etablierung der humanen osteoblastenähnlichen Zellen

Die Kulturen der osteoblastenähnlichen Zellen wurden aus humanen Knochenproben von Beckenkammpongiosa eines männlichen Spenders im Alter von 20 Jahren gewonnen. Zusätzlich erfolgten 2 analoge Untersuchungen zum Nachweis der Validität der Ergebnisse an Zellen von 2 weiblichen Spenderinnen im Alter von 33 und 43 Jahren.

Die Knochenproben wurden zur Etablierung der Zellkultur in einem Medium aus DMEM, Natriumhydrogencarbonat (3,7 g/500 ml Medium), L-Glutamin, 10% FCS, Antibiotikum (100 IE Penicillin/100 μ g Streptomycin/ml), Ascorbinsäure (1 mmol/l ASC) und Kortikoid (100 nmol/l Dexamethason) bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Der Mediumwechsel zur Kultivierung erfolgte erstmalig nach 4 Tagen.

Bei einer 80%igen Bodenbedeckung mit Zellen wurde die Zellkultur passagiert und in FCS-reduziertem Medium (2% FCS, jedoch alle anderen Zusätze identisch) bis zu einer ausreichenden Bodenbedeckung (80%) kultiviert. Nach Zellzahlbestimmung wurden 5000

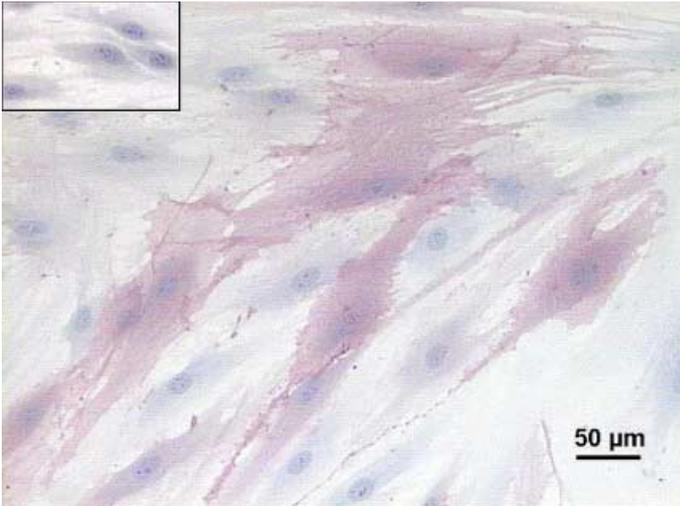


Abb. 1 ▲ Nachweis der alkalischen Phosphatase in den OLC. Im Vergleich dazu ist oben links eine Fibroblastenkultur dargestellt, in deren Zellen keine alkalische Phosphatase nachweisbar ist (Färbung nach Kit-Hersteller-Anweisung)

Zellen in 200 µl FCS-reduziertem Medium in je 1 Loch der 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Insgesamt wurden 9 Spalten mit je 8 Löchern mit Zellen bestückt und für 3 Tage im Brutschrank inkubiert.

Zum Nachweis der ossären Herkunft der in Kultur vermehrten Zellen wurden parallel dazu

- alkalische Phosphatase (Testkit: Fa. Sigma, Katalognr. 86R),
- Osteokalzin (Antikörper Dianova, Hamburg, Bestellnr. M044 und 115-035-003 sowie AEC Substratkit Immunotech, Hamburg, Bestellnr. 1477) sowie
- das Mineralisationsvermögen der Zellen (Van-Kossa-Färbung sowie Transmissionselektronenmikroskopie)

nachgewiesen (Abb. 1, 2, 3, 4).

Messung der OLC-Proliferationsaktivität mittels WST-1-Test

3 Tage nach Aussaat der Zellen in die Lochplatten erfolgte für die Durchführung des Versuchs ein Mediumwechsel [150 µl DMEM-PSN-Medium (0,5 ml PSN auf 50 ml DMEM)], bei welchem zusätzlich von den verschiedenen Thrombozytenlösungen jeweils 50 µl in je 8 Löcher einer der mit OLC gefüllten 9 Spalten der 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Es standen somit für die Kontrolle (ohne Thrombozytenstimulation) und für jede der 8 PRP-Ver-

dünnungen jeweils 8 Löcher der Mikrotiterplatten für Wiederholungsmessungen zur Verfügung.

Um den Leerwert (die „Eigenextinktion“ der Thrombozytenverdünnungslösungen) zu bestimmen, wurden in eine 2. Platte 50 µl der jeweiligen Stimulanzlösung aufgetragen und mit 150 µl des ascorbinsäure- und dexamethasonfreien DMEM-PSN-Mediums aufgefüllt.

Da für die Thrombozyten-„o“-Konzentration nichts aus der Thrombozytenlösung entnommen wurde, wurden die Löcher stattdessen mit 50 µl HBSS gefüllt.

Nach weiteren 3 Tagen Inkubation (6 Tage nach der Aussaat in die 96-Loch-Platten) erfolgte ein WST-Test zur Bestimmung der Proliferationsrate der OLC (Methode nach Herstellerangaben, s. unten).

Für die jeweils 8 gleichen Löcher in einer Spalte der 96-Loch-Platte (Zellen, die mit ein und derselben Thrombozytenkonzentration stimuliert wurden) wurden die Extinktionswerte gemessen. Für die wenigen Extinktionswerte oberhalb des vom Messgerät vorgegebenen Messbereichs wurde jeweils der höchste mögliche Messwert (Extinktion 3350) für die Auswertung verwendet. Von jedem einzelnen Extinktionswert wurde der Mittelwert der parallel gemessenen Thrombozytenlösungseigenextinktion subtrahiert. Die so hinsichtlich der Eigenextinktion der Thrombozytenlösungen korrigierten Extinktionswerte der stimulierten OLC werden im Folgenden dargestellt.

WST-1-Test

Der WST-1-Test ist ein etabliertes Verfahren zur Messung der Proliferationsaktivität einer Zellkultur [5, 8, 17, 18, 19]. Die Messung der mitochondrialen Aktivität für OLC ist in der Literatur ebenfalls beschrieben [12].

Das WST-1-Reagenz (Roche, Bestellnr.: 1644807) ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch zelluläre (mitochondriale) Enzyme in Formazan umgewandelt wird. Durch vermehrte Syntheseakti-

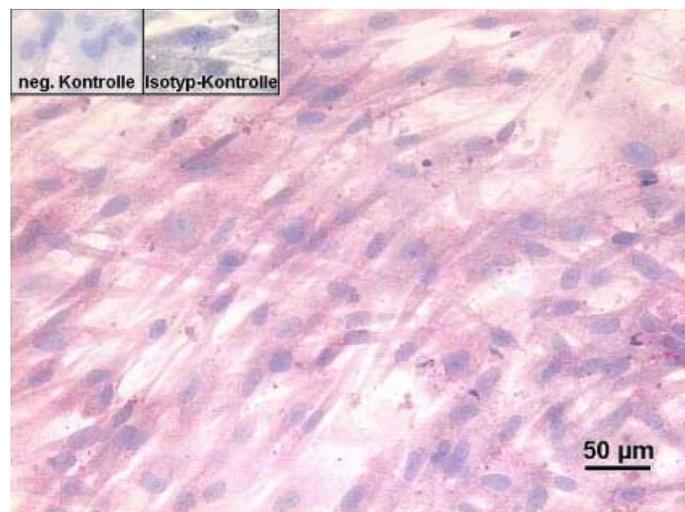


Abb. 2 ▲ Nachweis von Osteokalzin im Zytoplasma der OLC. Inset Negativkontrolle: OLC mit Immunreaktion ohne Osteokalzinantikörper; Isotypkontrolle: Kontrolle der Bindungsspezifität mit einem zum Osteokalzinantikörper korrespondierenden Isotypantikörper (unspezifischer Maus-IgG₁-Antikörper)

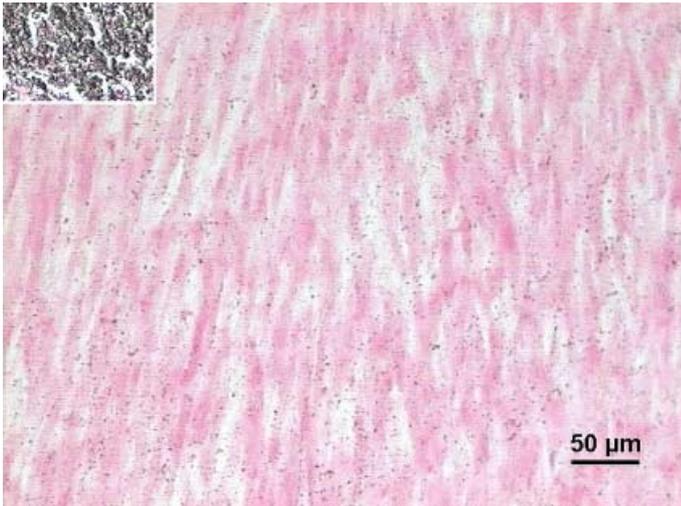


Abb. 3 ▲ Nachweis der Mineralisation der OLC, die 3 Wochen lang mit Mineralisationsmedium kultiviert wurden (Zusatz von β -Glycerolphosphat). Obere linke Ecke Positivkontrolle (kalzifiziertes Bindegewebe) (Kossa-Färbung)

vität oder eine Zunahme von lebenden Zellen in den Löchern der Mikrotiterplatte kommt es zu einer Zunahme der mitochondrialen Dehydrogenase. Die Zunahme der Enzymaktivität führt zu einer Zunahme der Menge an farbigem Formazan, welche direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen in der Kultur ist. Das farbige Formazan wird in einem Scanning-Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader, Biorad 550, Fa. Biorad, USA) durch Messen der Extinktion bei 450 nm quantifiziert.

Zur Messung der Extinktion im ELISA-Reader wurden in jedes zu testende Loch 20 μ l des WST-Reagenz pipettiert und die 96-Loch-Platte dann in den ELISA-Reader eingebracht. Vor einer Messung erfolgte für 5 s ein Schütteln der Mikrotiterplatte durch das Gerät. Die Extinktion wurde bei 415 nm und durch den Referenzfilter bei 615 nm gemessen.

Die Messungen erfolgten vor der Zugabe des WST-Reagenz und 1/2, 1, 2, 3, 4 und (falls im Messspektrum noch möglich) 5 h nach Zugabe des WST-Reagenz.

Statistische Methoden

Zur Auswertung der Unterschiede zwischen den Konzentrationen im Zeitverlauf konnte keine Normalverteilung angenommen werden. Die Analyse erfolgte daher mittels der Methode zur nicht-parametrischen Analyse longitudinaler Daten nach Brunner u. Langer [3]. Ver-

wendet wurden das Modell „F₁-LD-F₁“ mit dem entsprechenden Makro in SAS, Version 6.12., sowie der von den Autoren benannte „Test vom Anova-Typ“, da er – laut Autoren – auch für kleine Stichprobenumfänge anwendbar ist.

Ergebnisse

Insgesamt zeigte sich beim Auftragen der verschiedenen Messzeitpunkte über



Abb. 4 ▲ Ablagerungen von nadelförmig vernetzten Kalziumdeposits (schwarze Kristalle mit weißem Rand Pfeile) im Interzellularraum der OLC, die 3 Wochen lang mit Mineralisationsmedium kultiviert wurden (Zusatz von β -Glycerolphosphat). Vergr. 4300:1, Inset Detailvergr. 5200:1

der Thrombozytenkonzentration für die zugegebenen niedrigen Thrombozytenkonzentrationen nur eine geringe Steigerung der mitochondrialen Syntheserate, welche dann jedoch bis zu einem Plateau (bei 58.900 Thr/ μ l) deutlich zunahm. Danach sank die Proliferationsrate wieder ab (Abb. 5, 6).

Auffallend war, dass bereits 3 h nach der WST-Zugabe eine der 8 Parallelmessungen für die Thrombozytenkonzentration 318.000/ μ l einen Extinktionswert oberhalb des Messbereichs (maximal bis 3350) aufwies. Bei der gleichen Thrombozytenkonzentration waren bei der 4-h-Messung 2 und bei der 5-h-Messung 4 Extinktionswerte oberhalb des Messbereichs. Bei der 5-h-Messung fanden sich zusätzlich je eine Überschreitung bei 51.300 und 58.900 Thr/ μ l sowie 2 Überschreitungen bei 149.000 Thr/ μ l.

Bei der höchsten Thrombozytenkonzentration kam es zu einer Koagulation des zugegebenen Thrombozytenkonzentrats, die Extinktion (nach Abzug der Extinktion der Kontrollmessung der Thrombozytenlösung) änderte sich über den gemessenen Zeitraum nahezu nicht.

Bei grafischer Darstellung der verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen über den Messzeitpunkten (Abb. 6) ließ sich mit zunehmender Zeit nach Zugabe des WST-Reagenz (mit Ausnah-

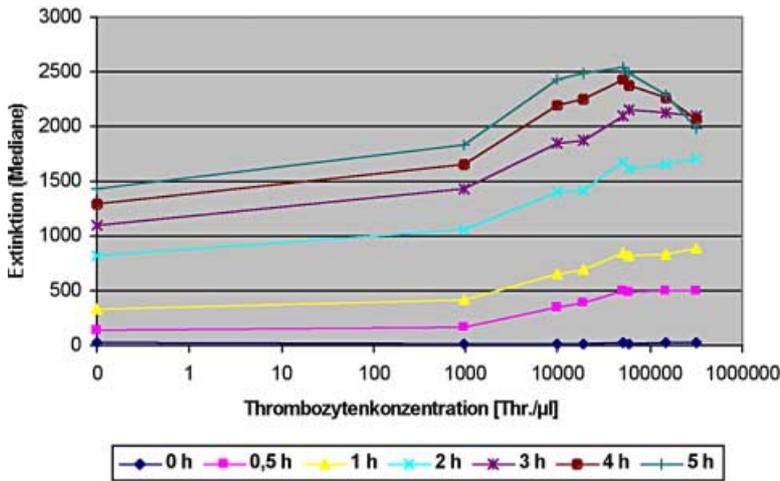


Abb. 5 ▲ Extinktionsmessungen vor, 1/2 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h nach Zugabe des WST-Salzes, Stimulation mit je 50 µl der Stimulanzlösung mit verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen/µl. Die Werte für die Stimulation mit den 1,7 Mio. Thr/µl wurden nicht dargestellt (systematischer Artefakt). Darstellung der korrigierten Mediane

me der höchsten Konzentration mit Koagulation) bei allen Thrombozytenverdünnungen eine Zunahme der Extinktionswerte erkennen. Im unteren Verdünnungsbereich führte eine Steigerung der Thrombozytenkonzentration im Stimulanz zu einer früheren und höheren Gesamttextinktion (bis 51.300 Thr/µl). Eine über dieses Niveau hinausgehende Steigerung der Thrombozytenkonzentration zeigte dann für die Stimulation mit Thrombozytenkonzentrationen von 149.000 und 318.000 Thr/µl bei den 4- und 5-h-Messungen deutliche Rückgänge der in Abb. 6 dargestellten Extinktionsmediane. Bei Stimulation mit der höchsten Konzentration mit folgender Koagulation des Mediums blieb der Extinktionswert über den gesamten Zeitverlauf im Prinzip unverändert.

Bei der statistischen Analyse wurden die Messergebnisse der Probe, die mit 50 µl der 1,7 Mio. Thr/µl enthaltenden Lösung stimuliert wurde und makroskopisch kontrollierbar koagulierte, ausgeschlossen, da sie einen systematischen klinischen Artefakt aufweist.

Bei der statistischen Untersuchung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den meisten der verschiedenen Thrombozytenkonzentrationsgruppen ($p < 0,0001$). Bei den nachfolgenden paarweisen Vergleichen unterschieden sich bei Verwendung einer p -Wert-Korrektur nach Bonferroni-Holm nur die Gruppen mit den Thrombozytenkonzentrationen 9910–19.100, 9910–318.000, 19.100–318.000, 51.300–58.900, 58.900–

149.000 und 149.000–318.000/µl nicht signifikant in der Höhe ihrer Extinktionswerte über den gesamten Zeitraum (statistischer Vergleich der Kurvenverläufe in Abb. 6).

Bei der statistischen Analyse der zeitlichen Veränderung der Extinktionen ergab sich ein signifikanter Unterschied im Zeitverlauf aller Thrombozytenkonzentrationsgruppen ($p < 0,0001$) (statistischer Vergleich der Kurvenverläufe in Abb. 5).

Die durchgeführten Mehrfachmessungen (im oben beschriebenen Versuch jeweils 8 Einzelmessungen der jeweils 8 einzeln angesetzten identischen Kombinationen) zeigten nur geringe Unterschiede (Median und Mittelwert lagen

nah zusammen). Die doppelt durchgeführten Kontrollversuche (mit osteoblastenähnlichen Zellen und Thrombozyten anderer Spender) zeigten analoge Ergebnisse.

Diskussion

Die Menge an in die Mikrotiterplatte ausgesäten Zellen wurde nach Vorversuchen zur Sicherstellung optimierter Versuchsbedingungen festgelegt. In Vorversuchen zeigte sich, dass bei Kultivierung der Zellen in der Mikrotiterplatte mit 10%iger Kälberserum(FCS)-Konzentration keine weitere Stimulation durch Zugabe der Thrombozyten mehr möglich war. Die Zellen waren jedoch auch in Zellkulturmedium mit vermindertem FCS-Gehalt sicher zu kultivieren. Auch musste auf die Zugabe von Dexamethason und Ascorbinsäure verzichtet werden, da diese eine Interaktion mit dem WST-Reagenz zeigten. Dies ist möglich, da bei der kurzen Dauer der Versuchsreihe nach Zugabe von dexamethason- und askorbinsäurefreiem Medium (3 Tage) die Zellkultur nicht durch Fibroblasten überwuchert wird.

Die Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikante Zunahme der Extinktionsrate unter Stimulation mit Thrombozyten; dies kann als Nachweis einer entsprechend erhöhten Proliferationsrate der osteoblastenähnlichen Zellen durch Stimulation mit Thrombozytenkonzentraten in vitro gelten.

Die in den Grafiken dargestellte Zunahme der Proliferationsrate mit steigender Thrombozytenkonzentration

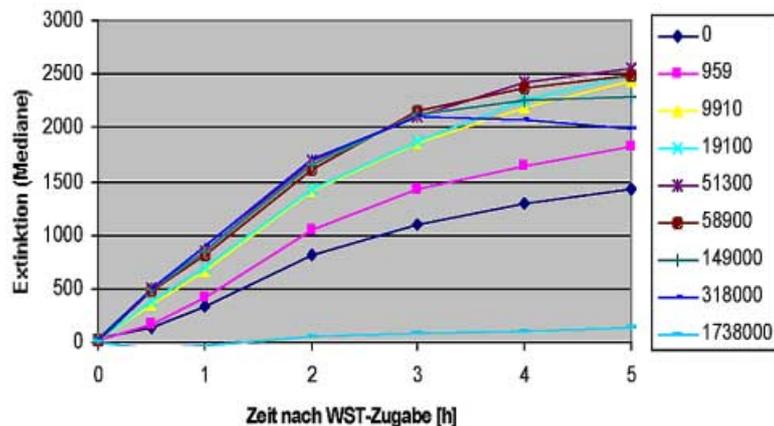


Abb. 6 ▲ Extinktionsmessung 0–5 h nach Zugabe des WST-Reagenz bei Stimulation mit 50 µl der verschieden konzentrierten Thrombozytenlösungen (0–1.738.000 Thr/µl). Darstellung der korrigierten Mediane

des Stimulanz lässt einen linearen Zusammenhang zwischen Thrombozytenkonzentration und resultierender Proliferationsrate mit anschließender Plateaubildung vermuten. Die Proliferationsrate der OLC lässt sich nicht unbegrenzt steigern; bei Ankopplung der thrombozytären Wachstumsfaktoren an alle entsprechenden Oberflächenrezeptoren der OLC lässt sich keine weitere Erhöhung der Proliferationsrate erzielen.

Bei der Interpretation des Kurvenverlaufs der Extinktionsmittelwerte ist zu berücksichtigen, dass für die 51.300-, die 58.900- und die 149.000-Thr/ μ l-Stimulationslösungen 1 bzw. 2 Messwerte oberhalb des Extinktionsmessbereichs lagen und bei der Berechnung der in den Grafiken abgebildeten Mittelwerte nur approximativ korrigiert berücksichtigt werden konnten. Gleiches gilt auch für 1 bzw. 2 der 3- bzw. 4-h-Messungen sowie für 4 der 5-h-Messungen nach Stimulation mit 50 μ l der 318.000-Thr/ μ l-Lösung. Dies erklärt den Abfall der Extinktionsmittelwerte der mit 149.000-Thr/ μ l-Lösung und den größeren Extinktionsrückgang der mit 318.000-Thr/ μ l-Lösung stimulierten Zellen allerdings nur z. T.

Eine darüber hinausgehende Stimulation zeigte eine dann wieder verminderte Wachstumsstimulation, möglicherweise aufgrund eines zytotoxischen Effekts dermaßen hoher Thrombozyten- bzw. Wachstumsfaktorkonzentrationen (Abb. 5). So ist beispielsweise für TGF- β in vitro ein biphasischer Effekt beschrieben:

- Bei niedrigeren Konzentrationen (10 ng/ml TGF- β 1) weist TGF- β in vitro einen Proliferationsrate steigernden Effekt auf.
- Bei hohen Konzentrationen (100 ng/ml TGF- β 1) bewirkt TGF- β in vitro nur eine verminderte Proliferationssteigerung. Bei dieser Dosis ist der chemotaktische Effekt von TGF- β 1 maximal gesteigert [7].

Die Stimulation mit 1.738.000 Thr/ μ l zeigte niedrigere, korrigierte Extinktionswerte als die Zellkultur ohne Stimulation mit Thrombozytenkonzentrat, wobei klinisch ein systematischer Artefakt (vollständige Koagulation des Nährmediums) auftrat. Aufgrund der Koagulation des Mediums ist eine valide Mes-

sung nicht sichergestellt, sodass auf die Interpretation dieser Daten verzichtet werden muss.

Eine Übertragung der hier in vitro verwendeten Thrombozytenkonzentrationen auf die In-vivo-Situation ist aufgrund des komplexen In-vivo-Systems (Blutzirkulation usw.) jedoch nur begrenzt möglich. Das Prinzip der mit der verwendeten Thrombozytenkonzentration bis zu einem Plateau steigerbaren Proliferationsrate (mit evtl. danach abfallender Wachstumsrate durch zytotoxische Effekte bei Überstimulation) sollte jedoch auch im komplexen biologischen System gelten. Unklar ist weiterhin, wie lange die Stimulation in vivo bei einmaliger Stimulation mit Thrombozyten bestehen bleibt.

In der Literatur findet sich bisher nur eine Arbeit zur biologischen Wirkung von Thrombozyten in der Zellkultur. Sekido et al. [16] verglichen den Effekt von frischen und (gefroren) gelagerten Thrombozyten und konnten an Rattenfibroblasten zeigen, dass sich die Steigerungsraten des DNA-Gehalts der Fibroblasten bei Stimulation durch die beiden jeweiligen Thrombozytenpräparationen nicht wesentlich unterscheiden.

In der Literatur finden sich bisher keine Arbeiten zum In-vitro-Effekt von Thrombozytenkonzentraten auf humane osteoblastenähnliche Zellen.

Solche Untersuchungen werden derzeit ebenfalls (unter Verwendung anderer Techniken) an den Universitäten Mannheim (Dr. Dugrillon, transfusionsmedizinische Abteilung) sowie Wien (Dr. R. Gruber, Abteilung für orale Chirurgie) durchgeführt. Die noch nicht publizierten Ergebnisse scheinen ebenfalls auf eine konzentrationsabhängige Steigerung der Wachstumsrate (Dr. Dugrillon) bzw. der Mitoserate (Thymidineinbau) (Dr. Gruber) von humanen osteoblastenähnlichen Zellen hinzuweisen (persönliche Mitteilung).

Schlussfolgerungen

Die Steigerung der Proliferationsrate von humanen Zellen ossärer Herkunft scheint in vitro durch die Zugabe von Thrombozyten konzentrationsabhängig bis zu einem Plateau realisierbar. Eine Übertragung der hier in vitro verwendeten Thrombozytenkonzentrationen auf die In-vivo-Situation ist nur be-

grenzt möglich. Das Prinzip der durch Zugabe von Thrombozyten bis zu einem Plateau steigerbaren Proliferationsrate sollte jedoch auch im komplexen biologischen System gelten. Dieses In-vitro-Ergebnis stützt damit die aktuell diskutierte Annahme, dass der klinische Einsatz von Thrombozytenkonzentraten die Knochenregeneration beschleunigen könnte.

Danksagung · Die Autoren danken dem Leiter der Transfusionszentrale der Universität Mainz, Dr. Hitzler, für die Bereitstellung von Thrombozytenkonzentratproben und Frau Victor, Institut für medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Mainz, für die statistische Datenanalyse sowie Priv.-Doz. Dr. Dr. H. Terheyden und Priv.-Doz. Dr. Y. Acil, Kiel, für die Anleitung zur Etablierung und Kultivierung von osteoblastenähnlichen Zellen im September 1999, ohne die diese Untersuchung nicht möglich gewesen wäre.

Literatur

1. Anitua E (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implant* 14: 529–535
2. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, Sanchez R (1992) A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol* 63: 929–940
3. Brunner E, Langer F (1999) Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten. Oldenbourg, München Wien
4. Cho MI, Lin WL, Genco RJ (1995) Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 66: 522–530
5. Iwaki T, Iwaki A, Fukumaki Y, Tateishi J (1995) Alpha B-crystallin in C6 glioma cells supports their survival in elevated extracellular K⁺: the implication of a protective role of alpha B-crystallin accumulation in reactive glia. *Brain Res* 673: 47–52
6. Kiuru J, Viinikka L, Myllyla G, Pesonen K, Perheentupa J (1991) Cytoskeleton-dependent release of human platelet epidermal growth factor. *Life Sci* 49: 1997–2003
7. Lind M (1998) Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 283: 2–37
8. Liu SQ, Saijo K, Todoroki T, Ohno T (1995) Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumor sections. *Nat Med* 1: 267–271

9. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC (1991) Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 62:710–716
10. Lynch SE, De Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN (1991) The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 62:458–467
11. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998) Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:638–646
12. Nakamura K, Kido H, Morimoto Y, Morimoto H, Kobayashi S, Morikawa M, Haneji T (1999) Pilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth* 46:476–482
13. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, Cho MI (1995) Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 66:462–477
14. Rutherford RB, Niekraash CE, Kennedy JE, Charette MF (1992) Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodont Res* 27:285–290
15. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF (1993) Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 20:537–544
16. Sekido Y, Morishima Y, Ohya K (1987) Activity of platelet-derived growth factor (PDGF) in platelet concentrates and cryopreserved platelets determined by PDGF bioassay. *Vox Sang* 52:27–30
17. Shirahata S, Watanabe J, Teruya K, Yano T, Osada K, Ohashi H, Tachibana H, Kim EH, Murakami H (1995) E1A and ras oncogenes synergistically enhance recombinant protein production under control of the cytomegalovirus promoter in BHK-21 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:345–347
18. Takenouchi T, Munekata E (1995) Trophic effects of substance P and beta-amyloid peptide on dibutyryl cyclic AMP-differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Life Sci* 56:L479–L484
19. Teruya K, Yano T, Shirahata S, Watanabe J, Osada K, Ohashi H, Tachibana H, Kim EH, Murakami H (1995) Ras amplification in BHK-21 cells produces a host cell line for further rapid establishment of recombinant protein hyper-producing cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:341–344
20. Weibrich G, Kleis W, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W (in press) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Cranio Maxillofac Surg* in press