universität wien

DIPLOMARBEIT

Förderung der Mitose von Fibroblasten in einer Zellkultur durch ein Gemisch von hochkonzentriertem Fibrin(ogen) und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Florian Braun
Matrikel-Nummer:	9402398
Studienrichtung	A449 Pharmazie
Betreuer:	O. Univ.-Prof. Dipl.Ing. Mag. Dr. Christian Noe O. Univ. Prof. Dr. Dontscho Kerrjaschki

Wien, am 01.10.2008

1 Inhalt

2 Zusammenfassung 5

3 Ziel der Untersuchung 8

4 Einleitung 9

4.1 Biologische Vorgänge der Wundheilung 9

4.2 Wachstumsfaktoren 10

4.3 Wirkungsmechanismus und biochemische Eigenschaften der Wachstumsfaktoren 12

4.4 Der Thrombozyt (Aufbau und Wirkung) 14

4.4.1 Dense Granula 14

4.4.2 Alpha Granula 15

4.4.3 Membran Glykoproteine 16

4.4.4 Lysosomale Granula 16

4.4.5 Rezeptoren für primärer Agonisten 16

4.5 Integrine 16

5 Material und Methodik 19

5.1 Material 19

5.1.1 Wachstumsfaktoren: 19

5.1.2 Antikörper: 19

5.1.3 Thrombozyten-reiche-Lösung aus nativen humanen Thrombozyten: 20

5.1.4 Lyophilisierte, rehydrierte Thrombozyten und ihre Fraktionen: 20

5.2 Methodik (Versuchsanordnungen): 21

5.2.1 Bestimmung der Wachstumsfaktoren und des Integrins GP IIb-IIIa in rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten und ihren Fraktionen Überstand und Zellfraktion: 21

5.2.2 Zell-Kultur von Fibroblasten in 24 well plates mit Filtereinsatz: 21

5.2.3 Zell-Kultur von Fibroblasten in 48 well plates ohne Filtereinsatz: 22

5.2.4 Bestimmung der Wachstumsfaktoren im Medium der Zellkultur 23

5.2.5 Western blot Analyse. 24

5.2.6 Messung der Mitoserate. 24

5.2.7 Statistik 25

6 Ergebnisse 26

6.1 Die Wirkung humaner rehydrierter. lyophilisierter Thrombozyten auf die Mitose humaner Fibroblasten im Vergleich zu nativen humanen Thrombozyten 26

6.1.1 Mitoseraten von Fibroblasten: Vergleich von nativen Thrombozyten mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten. Zellkultur in 24 well plates Kultur 3, 5 und 7 Tage 26

6.1.2 Mitoseraten von Fibroblasten: Vergleich der Mitoserate von nativen Thrombozyten und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten in 24 mit 48 well plates. Kultur drei Tage. 28

6.2 Membranbestandteile in den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten 29

6.3 Wachstumsfaktoren in den einzelnen Präparationen: rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten; Überstand, Zellfraktion. 32

6.4 Untersuchungen zur Wirkung von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, Fibrin(ogen) und Thrombin auf die Mitose von Fibroblasten. 34

6.4.1 Wirkung von Antikörper gegen Wachstumsfaktoren auf die Mitoserate der Fibroblasten 34

6.4.2 Einfluss der Integrins GP IIb-IIIa auf die Mitoserate von Fibroblasten. 39

6.4.3 Einfluss des Integrins GP IIb-IIIa auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren.. 40

7 Diskussion 42

8 Literatur: 52

9 Anhang 58

10 Danksagung: 66

11 Curriculum Vitae 67

2 Zusammenfassung

In einer Zellkultur von Fibroblasten wurde die Mitoserate mittels Einbau von 3^{H}-Thymidin am Tag 3, 5 und 7 der Kultur gemessen. Die Fibroblasten wurden unter verschiedenen Bedingungen gezüchtet, wobei in einer Gruppe dem Nährmedium fetales Kalbserum(FCS) zugesetzt wurde, in den anderen entweder ein Gemisch von Fibrin(ogen), Thrombin und nativen Thrombozyten, oder ein Gemisch von Fibrin(ogen), Thrombin und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, bzw. dem durch Zentrifugieren von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten gewonnenen Überstand, bzw. Zellrest. Die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF-ß, EGF, IGF-I, wurden mittels Western blot in rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, die mit Thrombin inkubiert wurden, sowie im Überstand und Zellrest von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten ohne Inkubation mit Thrombin bestimmt. Weiters wurde das Integrin GP IIb-IIIa im Überstand und Zellrest bestimmt.

Die Mitoserate von Fibroblasten betrug nach drei Tagen Kultur, in der Gruppe, denen im Nährmedium Fibrin(ogen), Thrombin und native Thrombozyten beigegeben wurde 46297,5 +/- 19951,2 cpm/ml. In der Gruppe mit Fibrin(ogen), Thrombin und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten betrug die Mitoserate 32551,7 +/- 17505,8 cpm/ml und war damit um mehr als achtmal so viel wie die Mitoserate in der Kultur mit FCS (3840 +/-1599 cpm/ml). Der Unterschied ist statistisch hoch signifikant. Die Mitoseraten in den Gruppen, denen der Überstand, bzw. der Zellrest von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten zugefügt wurden zeigte keinen Unterschied zur der Gruppe mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten. Nach 5 und 7 Tagen Kultur nahm die Mitoserate in allen Gruppen ab, in der Gruppen mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, und ihren Fraktionen Überstand, bzw. Zellrest signifikant weniger, als in der Gruppe mit nativen Thrombozyten. In der Gruppe, in der der Zellrest von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten zugegeben wurde, war nach 7 Tagen die Mitoserate deutlich geringer als in allen anderen Gruppen. Werden rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten mit Thrombin in einer Konzentration von 5,0 U/ml inkubiert lassen sich alle vier Wachstumsfaktoren

nachweisen, bei einer Thrombinkonzentration von 0,5 U/ml nur PDGF, TGF-ß EGF, nicht aber IGF. Ohne Inkubation mit Thrombin finden sich in CF alle vier Wachstumsfaktoren in S nur PDGF und TGF-ß. In S und CF konnte das Integrin GP IIb-IIIa nachgewiesen werden und zwar in S deutlich mehr, als in CF. Werden dem Medium einer Fibroblasten-Zellkultur mit rehydrierten, lyophilisierten, bzw. mit CF und S, Fibrin(ogen) und Thrombin Antikörper gegen Wachstumsfaktoren beigegeben und die Mitoserate am dritten Tag gemessen, so ist sie gehemmt, wenn Antikörper gegen PDGF alleine, bzw. Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden. Der Zusatz von Antikörper gegen TGF-ß, EGF und IGF alleine zeigt keinen statistisch gesicherten Effekt auf die Mitoserate. Wird der Zellkultur der Fibroblasten mit rehydrierten lyophilisierten Thrombozyten und Thrombin ein Inhibitor von GP IIb-IIIa dazugegeben wird die Mitoserate gehemmt, allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen des Inhibitors. Diese Wirkung ist dosisabhängig. Eine Zellkultur mit Fibrin(ogen), Thrombin, CF und S und zusätzlichem Inhibitor von GP IIb-IIIa in einer Konzentration von 0.1mg/ml enthält nach drei Tagen im Nährmedium ausreichend Wachstumsfaktoren,und zwar in gleicher Verteilung wie im in vitro Versuch ohne Zellkultur.

Durch vorliegende Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten auf die Mitoserate von Fibroblasten die gleiche Wirkung, wie native Thrombozyten haben. Allerdings haben lyophilisierte Thrombozyten den Vorteil, dass sie einer Hitzesterilisation zugeführt werden können, somit für die Anwendung am Menschen besser geeignet sind. Durch die Lyophilisierung werden die Zellstrukturen der Thrombozyten und die Bindungen der Wachstumsfaktoren an Zellstrukturen unterschiedlich zerstört. PDGF und TGF-ß werden durch den Vorgang der Lyophilisierung aus den Granula herausgelöst und befinden dann in S, während EGF und IGF weiters an Zellstrukturen gebunden bleiben, sich in CF nachweisen lassen und erst durch Zusatz von Thrombin in Lösung gehen. Die Bindung von IGF an seine Zellstruktur scheint auch eine stärkere zu sein als bei den anderen Wachstumsfaktoren, da es eine höhere Konzentration von

Thrombin bedarf es aus seiner Bindung zu lösen. Für eine gesteigerte Mitose der Fibroblasten sind zwei Bedingungen notwendig. Einerseits Wachstumsfaktoren, wobei PDGF die stärkste Wirkung hat, anderseits die Verbindung der Fibroblasten entweder miteinander (Zelle an Zelle), oder an ein Matrixprotein wie Fibrin(ogen). Diese Bindungen werden durch das Integrin GP IIb-IIIa vermittelt. Wird das Integrin GP IIb-IIIa gehemmt, ist auch die Wirkung der Wachstumsfaktoren vermindert.

3 Ziel der Untersuchung

Nachdem es offensichtlich ist, dass die bioaktiven Substanzen, die von den in das Wundareal eingewanderten Zellen sezernierten werden, wesentlich zur Wundheilung beitragen, wurde in experimentellen und klinischen Studien einzelne Wachstumsfaktoren lokal auf Wunden aufgebracht (22,23). Das Ergebnis, besonders der klinischen Studien war in den meisten Fällen nicht sehr überzeugend. Dies kann darauf zurückgeführt werde, dass aus dem physiologischen Vorgängen der Wundheilung nur eine bioaktive Substanz, nämlich nur ein Wachstumsfaktor und nicht die Kombination von bioaktiven Substanzen gemeinsam mit der Matrixsubstanz Fibrin(ogen) supplementiert wurden. Gfatter et al. (24) konnten an einer Zellkultur von Fibroblasten zeigen, dass das Gemisch von Fibrin(ogen) mit Blutplättchen die Mitose der Fibroblasten enorm steigert, aber nur dann, wenn die Interaktion zwischen Fibroblasten, Blutplättchen und Fibrin(ogen) erhalten ist. Bei Hemmung der Integrine, die die Interaktion vermitteln bleibt die Mitose der Fibroblasten aus.

Gfatter et al. verwendeten bei ihren Untersuchungen ein hochkonzentriertes humanes Fibrinogenkonzentrat, das lyophilisiert im Handel ist, und ein Thrombozytenkonzentrat, bestehend aus nativen humanen Thrombozyten. Für eine breite Anwendung ist diese Präparation nicht geeignet, da das Thrombozytenkonzentrat schwer zu lagern ist nur eine kurze Verwendungsdauer aufweist (kurze Ablaufzeit) und die nativen Zellen auch nicht zu sterilisieren sind.

Es war daher zu untersuchen:

- Die Wirkung humaner rehydrierter, lyophilisierter Thrombozyten auf die Mitose humaner Fibroblasten im Vergleich zu nativen humanen Thrombozyten
- Membranbestandteile in den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten.
- Wachstumsfaktoren in den einzelnen Präparationen (rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, Überstand, Zellfraktion).
- Welche Mechanismen, eine Steigerung der Mitoserate bewirken könnten.

4 Einleitung

4.1 Biologische Vorgänge der Wundheilung

Die Wundheilung stellt einen mehrstufigen Prozess dar, dessen einzelne Vorgänge vielfach erforscht, in ihrem Zusammenwirken jedoch noch größtenteils unaufgeklärt sind. Nach jeder Gewebsverletzung wird aus körpereigenem Fibrinogen unter Einwirken von Thrombin Fibrin gebildet, das unter Mitwirkung von Blutgerinnungsfaktor XIII quervernetzt wird. (1). Fibrin dichtet verletzte Gefäße ab, bedeckt die Wundfläche und ist so die erste Schutzmaßnahme des Körpers gegen Blut- und Flüssigkeitsverlust. Bei Verletzungen an der Körperoberfläche ist Fibrin auch eine Barriere für Erreger und verhindert ihr Eindringen in das Körperinnere. Fibrin ist aber auch die Matrix von Zellen. Der erste Fibrin-Wundbelag enthält korpuskuläre Blutbestandteile (weiße Blutzellen und Blutplättchen) und es wandern Fibroblasten, Blutendothelzellen und Epithelzellen von den Wundrändern bzw. dem Wundboden in den Fibrinbelag ein. Fibroblasten erzeugen kollagenes Bindegewebe, das die Wunde auffüllt und die Unterlage für die Epithellzellen bildet. Die durch die eingewanderten Blutendothelzellen gebildeten Blutgefäße ernähren das Bindegewebe und die Epithelzellen verschließen letztendlich das Wundareal.

Neben den zur Reparation notwenigen Fibroblasten, Blutendothelzellen und Epithelzellen wandern in das quervernetzte Fibrin außerdem Enzündungszellen, wie weiße Blutzellen und Makrophagen ein. Diese sezernieren gemeinsam mit den Blutplättchen Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Sie sind im Wundareal lokal in hoher Konzentration nachzuweisen (2) und regulieren das Einwandern und die Vermehrung der Bindegwebs-, Blutendothel- und Epithelzellen. So gilt allgemein, dass Entzündungszellen, insbesondere die Makrophagen, die Wundheilung steuern (3). Im Tierversuch an Knockout Mäusen konnte Martin et al. (4) jedoch nachweisen, dass Entzündungszellen, einschließlich der Makrophagen für die Wundheilung nicht notwendig sind. Diese Unterschiede in der Auffassung physiologischer Vorgänge bei der Wundheilung führt Lindblad (5) auf die Verwendung unterschiedlicher Tierspezies bei Tierversuchen zurück.

So haben Nager gegenüber anderen Tieren im zirkulierenden Blut eine höhere Konzentration von Makrophagen, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. So gilt weiterhin die Hypothese, dass die von den Entzündungszellen sezernierten Wachstumsfaktoren die Wundheilung steuern.

4.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren (GF) sind für die zelluläre Phase der Wundheilung wichtig, indem sie die Zellteilung von ruhenden Zellen initiieren und kontinuierlich stimulieren. Damit sind sie im Prozess der Wundheilung für die Vermehrung von Bindegwebszelln, Endothelzellen und Epithelzellen verantwortlich (6, 7,8) Wachstumsfaktoren sind Peptide wovon fünf Gruppen unterschieden werden, die für die Wundheilung von Bedeutung sind (9), siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren, die Bedeutung für die Wundheilung haben:

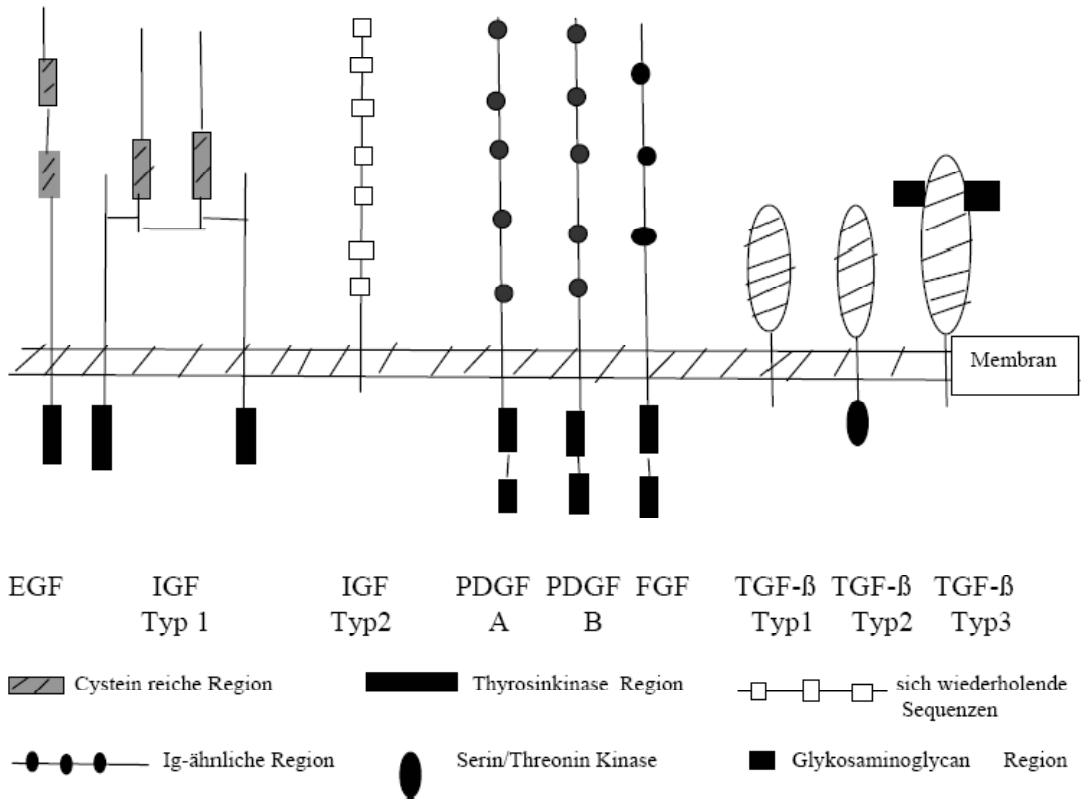
GF	**Molekular Gewicht (kD)**	**Struktur**	**Vorkommen**	**Biologische Wirkung**
1) Die EGF (Epidermal gowth factor)Gruppe :				
EGF	6	monomer	In fast allen Körperflüssigkeiten, **Thrombozyten**	Mitogen für die meisten epithelialen Gewebe, Fibroblasten und Endothelzellen.
TGF (transforming Growth Factor)	5-20	monomer	Makrophagen, Eosinophile, Keratinozyten	Wie EGF, nur bessere angiogenetische Wirkung.
AR (Amphiregulin)	8-9	monomer	Brustkrebszellen, Keratinozyten	Fördert Mitose einiger Zelllinien, andere werden gehemmt.
HBEGF (Heparin binding EGF)	22	monomer	Makrophagen	Mitogen für Fibroblasten und Keratinozyten.

GF	Molekular Gewicht (kD)	Struktur	Vorkommen	Biologische Wirkung
2) Die TGF-β (Transforming growth factor) Gruppe:				
Die TGF-β Gruppe besteht aus TGF-β 1-5, wobei nur TGF-β 1-3 in Säugetierzellen enthalten sind. Sie haben alle eine ähnliche Wirkung und TGF-β1 ist dafür repräsentativ.				
TGF-β 1	25	Dimer aus 2 identen Ketten	Makrophagen, Lymphozyten, **Fibroblasten**, Knochenzellen, Keratinozyten, **Thrombozyten**	Hemmet die Mitose der meisten Zellen wie Keratinozyten, Endothelzellen, Lymphozyten u. Makrophagen, in vitro; hemmet oder stimuliert Fibroblasten
3) Die IGF (Insuline-like growth factor) Gruppe:				
Die IGF Gruppe besteht aus IGF-I und IGF-II. Beide haben ähnliche Struktur und Wirkung. IGF-I ist für diese Gruppe repräsentativ.				
IGF-I	7,5	Monomer	In den meisten Geweben, **Fibroblasten**, Makrophagen	Mitogen für Fibroblasten, Knochenzellen, Nervenzellen, hämatopoetische Zellen, Endothelzellen.
4) Die PDGF (Platelet-derived growth factor) Gruppe:				
PDGF	28-35	Dimer, A und B Kette	Endothelzellen, **Thrombozyten**, Makrophagen, **Fibroblasten**	Mitogen für Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen
VEGF (vascular endothelial g.f.)	45	Dimer, 2 idente Ketten	Zellen der Hypophyse	Mitogen für Endothelzellen
5) Die FGF (Fibroblast growth factor)Gruppe:				
FGF (saures = aFGF basisches = bFGF)	16-18	Monomer	**Fibroblasten**, Astrozyten, Endothelzellen Knochenzellen, glatte Muskelzellen	Mitogen für mesenchymales und neurales Gewebe
KGF (Keratinocyte growth factor)	28	Monomer	**Fibroblasten**	Mitogen für Epitelzellen

4.3 Wirkungsmechanismus und biochemische Eigenschaften der Wachstumsfaktoren

Der Wirkungsmechanismus der Wachstumsfaktoren erfolgt stufenweise: Erst binden sie sich an ein Rezeptorprotein, welches Bestandteil der Plasmamembran der Zielzelle ist (10). Zu ihrem Rezeptor zeigen die GF eine spezifische und hohe Affinität. Die meisten Rezeptoren der GF sind transmembrane Glykoproteine mit drei Regionen: Die extrazelluläre, äußere Region, an der sich der GF bindet, die transmembrane Region und die cytoplasmatische Region, die im Zellinneren liegt (Abb.:1).

Abb.: 1 Biochemische Eigenschaften der Rezeptoren für GF



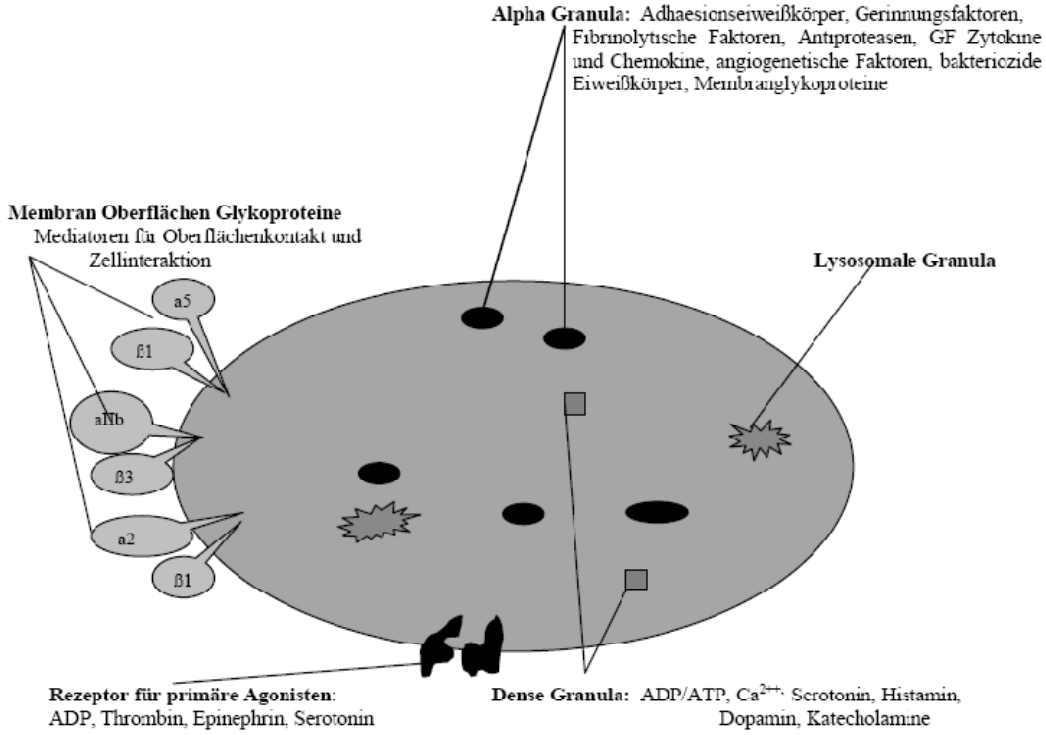
Die zytoplasmatische Region ist bei den meisten GF eine Thyrosinkinase, nur bei TGF-ß Typ 2 eine Serin-Threonin spezifische Kinase. Wenn sich ein GF an der extrazellulären Region seines Rezeptors bindet, verändert sich der Rezeptor und aktiviert an der zytoplasmatischen Region die Thyrosinkinase, bzw. die Serin-Threonin spezifische Kinase. So werden spezifische intrazelluläre Proteine an ihrem Thyrosin, oder Serin-Threonin Ende phosphoriliert und initiieren damit eine Kaskade von Reaktionen, die schließlich

zur Zellteilung führen. Wie in Tabelle 1 hervorgeht sind die meisten GF im Thrombozyten bzw. Fibroblasten gespeichert. Thrombozyten, die wie angeführt, insofern von Bedeutung sind, da sie am Beginn der Wundheilung für die Blutstillung und Fibrin(ogen)bildung eine Rolle spielen, sind damit auch für den weiteren Verlauf wichtig, da sie durch Freisetzung der GF die Vermehrung der Fibroblasten, Kapillarendothelzellen und Epithelzellen verursachen.

4.4 Der Thrombozyt (Aufbau und Wirkung)

Thrombozyten sind kernlose Zellen, die von einer Knochenmarkszelle, dem Megakaryozyten abgeschnürt und in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Ihr Aufbau ist in Abb.2 schematisch dargestellt.

Abb.: 2 Strukturschema eines Thrombozyten:



Die Granula in den Thrombozyten sind Speicherorgane von bioaktiven Substanzen, die nach Aktivierung des Thrombozyten freigesetzt werden.

4.4.1 Dense Granula

enthalten Adenosindiphosphat (ADP), das die Thrombozytenaggregation und Adenosindiphosphat (ADP), das den Gefäßtonus steigert, weiters Ca^{2++}, ein Cofaktor zahlreicher biologischer Prozesse, so z. B. auch für die Thrombozytenaggregation und Fibrinbildung. Ca^{2++} reguliert aber auch die Wundheilung, insofern es die Proliferation und Differenzierung von Kerationozyten fördert (11). Weiters sind in den Dense Granula Serotonin, Histamin, Dopamin und Katecholamine enthalten.

4.4.2 Alpha Granula

Sie speichern eine Vielzahl von Proteinen, die im Folgenden in Gruppen zusammengefasst werden:

- Proteine, welche die Verbindung von Zelle zu Zelle, oder die Verbindung von Zelle mit der extrazellulären Matrix vermitteln, und Proteine, die für die Blutgerinnung eine Rolle spielen (Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, van Willebrand Faktor, Laminin-8 und Thrombospondin-1):
- Proteine, die für die Thrombinproduktion und Blutgerinnung notwendig (Blutgerinnungsfaktor V, Va, und XI, sowie Protein S), bzw. für die Gefäßneubildung von Bedeutung sind (High-molecular wight Kininogen, Antithrombin, Tissue-Factor- Pathway-Inhibitor).
- Faktoren, die die Fibrinolyse, die Plasmin-Produktion und die Gefäßbildung beeinflussen (Plasminogen, Plasminogen-Activator-Inhibitor-Typ 1, Osteonectin- Alpha-2, Antiplasmin, Histidine-riche-Glycoprotein, Thrombin-Activatable Fibrinolysis- Inhibitor, Aslpha-2-Makroglobulin).
- Proteasen und Inhibitoren von Proteasen (Metalloprotease-4, Tissue Inhibitor of metalloprotease -4, Platelet Inhibitor of F IX, Alpha-1-Antitrypsin)
- Wachstumsfaktoren, Cytokine und Chemokine. Neben den in Tabelle 1 angeführten Wachstumsfaktoren sind noch der Hepatocyte-growth-factor und RANTES gespeichert. RANTES ist ein Chemokin, das an entzündlich verändertes Endothel durch einen durch P-Selectin abhängigen Mechanismus angelagert wird und an der Endothelzelle ein Signal bewirkt, das Monozyten bindet (12). Weiters sind noch gespeichert: Interleukin-8, Growht-regulated-Oncogene-alpha, Angiopoetin-1, IGF-binding Protein-3 und Neutrophil-chemoacticve -Protein.
- Basische und andere Proteine. (PF4, ß-Thromboglubin,Platelet basic protein, Connective-tissue-activating-Peptide-2, Condostatin,Chondroitin 4-Sulfat, Albumin, Immunglobuline).

- Thrombocidine, das sind Proteine die gegen Erreger wirken.

4.4.3 Membran Glykoproteine

Membran Glykoproteine sind Rezeptoren durch die die Verbindung des Thrombozyten mit extrazellulärer Matrix erfolgt, oder durch die die Thrombozyten an anderen Zellen, oder anderen Proteine gebunden werden. Unter den Membran Glykoproteinen werden unterschieden: Integrine($Alpha_{IIb}ß_3$, $Alpha_2$-$ß_1$, $Alpha_5$-$ß_1$), der Tissue factor, der den extrinsic pathway der Blutgerinnung initiiert (13,14), der CD40-Ligand verantwortlich für eine Immunantwort (15), das P-Selectin, das die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion vermittelt(16).

4.4.4 Lysosomale Granula

speichern die saure Hydrolase, Kathepsin D und E, Elastase (17).

4.4.5 Rezeptoren für primärer Agonisten

Das sind ADP, Serotonin, Epinephrin und Thrombin.
Binden sich diese primären Agonisten an den für sie spezifischen Rezeptor werden die Thrombozyten aktiviert. Als Antwort ändern sie ihre Gestalt, ballen sich zusammen (aggregieren) und entleeren schließlich ihre Granula. Die Aggregation der Thrombozyten, die der Entleerung der Granula vorausgehen muss, wird durch die Integrine vermittelt.

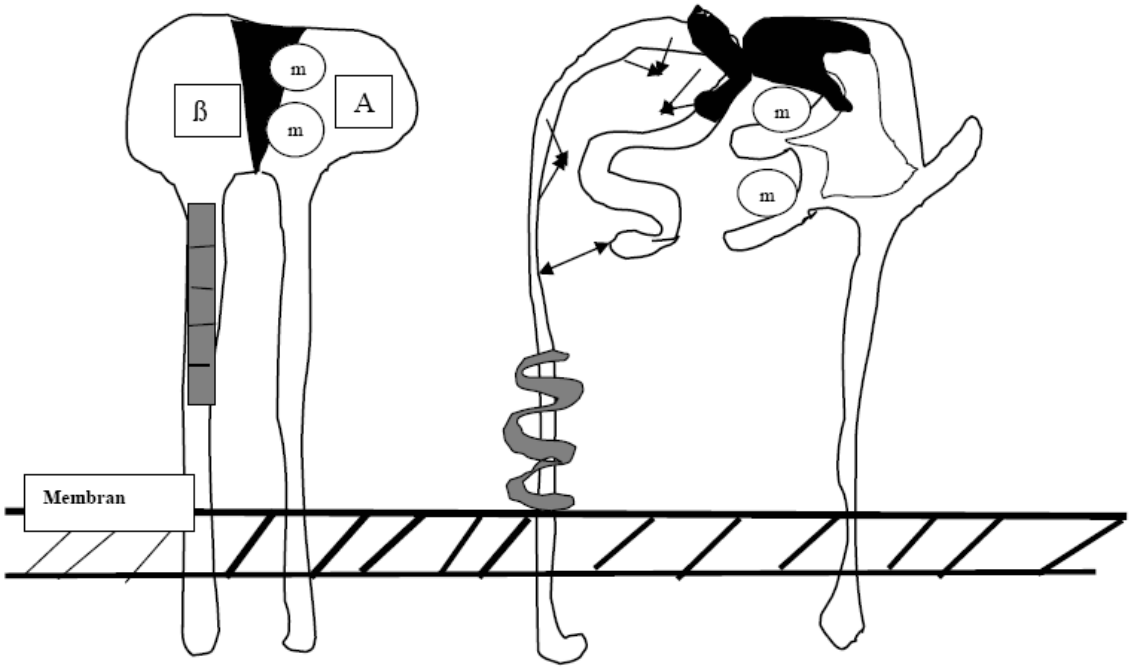
4.5 Integrine

Integrine sind Oberflächenrezeptoren, die die Verbindung der Zelle mit der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagen, Fibrin), oder die Verbindung von einer Zelle mit der anderen vermitteln. Damit sind sie für viele physiologische und pathologische Prozesse wichtig und übertragen Signale von Zelle zu Zelle, bzw. verbinden die Zelle mit extrazellulärer Matrix. (18, 19). Integrine sind Alpha-ß-Heterodimere. Die ß-Untereinheit variiert an Größe zwischen 120 und 180 kDa und ist mit einer Alpha-Untereinheit nicht convalent verbunden. Man kennt 8 unterschiedliche ß-Untereinheiten und 14 unterschiedliche Alpha-Einheiten. Für den Thrombozyten sind drei Integrine von Bedeutung $Alpha_{IIb}$-$ß_3$, $Alpha_2$-$ß_1$ und $Alpha_5$- $ß_1$. $Alpha_{IIb}$-$ß_3$ wird auch als GPIIb-IIIa, $Alpha_2$-$ß_1$ als GPIaIIa und

$Alpha_5$-$ß_1$ als GPIcIIa bezeichnet. $Alpha_{IIb}$-$ß_3$ bindet Fibrinogen, Fibronectin, den von Willebrand Faktor, Vitronectin und Thombospondin, $Alpha_2$-$ß_1$ Kollagen und Laminin, $Alpha_5$-$ß_1$ Fibronectin. In Abb.3 ist ein Integrin schematisch dargestellt. Ähnlich dem Rezeptor für GF werden auch beim Integrin eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Region unterschieden. Während aber beim GF ein Signal von außen in die Zelle erfolgt (outside to inside) erfolgt die Signalübermittlung beim Integrin auf beiden Wegen. Durch Bindung eines primären Agonisten (ADP, Thrombin, Epinephrin, Serotonin) wird das Integrin an seinem intrazellulären Anteil stimuliert und es erfolgt ein Signal an den extrazellulären Rezeptor (inside to outside). Als Folge ändert der extrazelluläre Rezeptor seine Form, er entfaltet sich und bietet die Bindungsstellen dar. Jetzt erst kann sich das entsprechende Eiweiß an den extrazellulären Rezeptor binden. Dadurch erfolgt ein Signal ins Innere der Zelle (outside to inside) was mehrere Reaktionen zur Folge hat wie etwa eine Phosphorilierung des Thyrosins, eine pH-Änderung des Zytoplasmas, eine Aktivierung Proteinkinasen, Sekretion von bioaktiven Substanzen und eine Zelldifferenzierung (20,21). Die Bindung der Integrine von Thrombozyten an ein Eiweiß erfolgt durch die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp, auch RGD benannt. Ist diese Sequenz in einem Protein vorhanden, kann dieses sich an das Integrin binden. Das $Alpha_{IIb}$-$ß_3$ Integrin kann auch noch die Aminosäuresequenz Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, auch KQAGDV benannt binden.

Abb.: 3 Schema eines Integrins. Heterodimer mit einer Alpha und einer ß Untereinheit. Man unterscheidet drei Regionen des Rezeptors, eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre.
Linkes Bild: Integrin in nicht stimuliertem, rechtes in stimuliertem Zustand.

M = Metall-Bindungsstelle der Alpha Einheit
Schwarze Flächen = Bindungsregionen an beiden Untereinheiten
= Disulfidbrücken
= sich wiederholende, Cystin-reiche Regionen der ß Einheit



5 Material und Methodik

5.1 Material

5.1.1 Wachstumsfaktoren:

Humanes- PDGF (Calbiochem-Novabiochem UK), humanes EGF (Becton-Dickinson USA), humanes IGF-I (CLB, Dutch Red Cross, NL), humanes TGF-ß (Sigma, USA).

5.1.2 Antikörper:

a-PDGF. Polyklonale Präparation von Immunglobulin-G der Ziege gegen humanen Platelet derived growth factor. Die biologische Aktivität von 5 ng/ml PDGF in einer Kultur von NIH3T3 Zellen (Becton Dickinson, USA) wird neutralisiert durch 50µg/ml a-PDGF.

a-EGF. Polyklonale Präparation von Immunglobulin-G des Kaninchens gegen humanen Epidermal growth factor. Die biologische Aktivität von 1000ng/ml EGF in einer Kultur von FS 1230 Zellen (Becton, Dickinson USA) wird neutralisiert durch 43,4µg /ml a-EGF.

a-IGF-I. Polyklonale Präparation von Immunglobulin-G des Kaninchens gegen humanen Insulin like growth factor-I. Die biologische Aktivität von 2ng/ml iGF-I in einer Kultur von NIH3T3 Zellen (Becton, Dickinson USA) wird neutralisiert durch 5µg /ml a-IGF-I.

a-TGF-ß. Polyklonale Präparation von Immunglobulin-G des Kaninchens, das gegen ein Peptid gerichtet ist, welches mit einer Aminosäureseqenz eines Vorläufers von humanen TGF-ßI korrespondiert. (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Zell-Adhäsions-Inhibitor. Synthetische Peptid, das aus der Zell-Bindungssequenz H-Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro-OH von Fibronectin basiert. Es verhindert die Bindung von Fibrinogen an seinen Zell-Membran-Rezeptor GP IIb-IIIa. (Calbiochem-Novabiochem, USA).

GP IIb-IIIa. Platelet Membrane Glycoproteins, GP IIb-IIIa, Human Platelets. (Calbiochem- Novabiochem, USA*)*

a-GP IIb-IIIa. Mouse Anti-Human CD41, Platelet IIb-IIIa. Monoklonale Präparation von Immunglobulin-G der Maus, das gegen den Glykoproteinkomplex IIb-IIIa gerichtet ist. (ICN Biomedicals, USA)

5.1.3 Thrombozyten-reiche-Lösung aus nativen humanen Thrombozyten:

Humanes Thrombozytenkonzentrat (von Univ. Prof. Dr. P. Höcker, Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Universität Wien zur Verfügung gestellt) wurde mit 3%igen Natrium Zitrat antikoaguliert, 20 min lang, bei 1000xg/min zentrifugiert und danach Plasma und Erythrozyten verworfen. Der Thrombozyten-reiche Bodensatz wurde mit RPMI Medium dreimal gewaschen und nach dem letzten Waschvorgang als Thrombozyten- reiche – Lösung mittels eines RPMI Medium auf eine Konzentration von $6x10^5$ Thrombozyten/µl eingestellt und als native Thrombozyten weiterverwendet. Sämtliche Vorgänge wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.1.4 Lyophilisierte, rehydrierte Thrombozyten und ihre Fraktionen:

Die Thrombozyten-reiche-Lösung (=native Thrombozyten), eingestellt auf eine Konzentration von $6x10^5$ Thrombozyten/µl mittels RPMI Medium wurde unter sterilen Bedingungen in Glasgefäßen zu je 2ml abgefüllt, mittels Gummistöpsel unter Vakuum verschlossen und anschließend gefriergetrocknet. Zur Rekonstitution der gefriergetrockneten Thrombozyten-reichen-Lösung wurden 2 ml Aqua ad injectionem verwendet. Die so entstandene Lösung kam als rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten in Verwendung. Ein Teil der rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten wurde 20 min lang, bei 1000xg/min zentrifugiert. Es entstand einerseits der Überstand (S), der als solches weiterverwendet wurde und das Zellsediment. Letzteres wurde, nach Entfernung des Überstands, in 1 ml RPMI Medium suspendiert und als Zellfraktion (CF) weiterverwendet.

5.2 Methodik (Versuchsanordnungen):

5.2.1 Bestimmung der Wachstumsfaktoren und des Integrins GP IIb-IIIa in rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten und ihren Fraktionen Überstand und Zellfraktion:

In Eppendorf Röhrchen, die 250µl einer bovinen Thrombinlösung mit 0,5 U/l, bzw. 5,0 U/l enthielten (Immuno, Austria) wurden 500 µl von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten in einer Konzentration von 10^5 Thrombozyten/µl gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Lösung mit 1000xg 20 Minuten lang zentrifugiert und aus dem Überstand mittels Western blot die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF-ß, EGF und IGF bestimmt. Außerdem wurden von den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten eine elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Ohne Thrombin wurde bei gleicher Vorgansweise, wie eben beschrieben in je ein Eppendorf Röhrchen 500µl des Überstands, bzw. 500µl der Zellfraktion gegeben. Die Lösungen wurden mit 1000xg 20 Minuten lang zentrifugiert und aus ihrem Überstand mittels Western blot die Wachstumsfaktoren und das Integrin GP IIb-IIIa bestimmt.

5.2.2 Zell-Kultur von Fibroblasten in 24 well plates mit Filtereinsatz:

Fibroblasten wurden von einer humanen Hautbiopsie gewonnen. Dazu wurde die Biopsie in Zellkulturflaschen (Falcon ^{R}) in einem RPMI 1640 Medium gehalten, dem 10 % (v/v) fetales Rinderserum(FBS), Penizillin (500U/ml), Streptomycin (100µg/ml) und Amphoterizin B (Fungizone, 250 µg/ml) zugefügt wurden (sämtliche Substanzen von Gibco BRL, UK).

Fibroblasten aus der 4.-10. Passage wurden in einer Dichte von $4x10^4$ Zellen/cm^2 auf den Filtereinsatz von 24 well plates versetzt (Falcon $^{R)}$. Die Membran-Poren hatten einen Durchmesser von 8 Mikron, ihre Dichte war $1,0x10^5$ Poren/cm^2). In der Gruppe 1 waren die Filtereinsätze unbeschichtet und das Nährmedium enthielt 10% FBS. In allen anderen Gruppen wurden die Filtereinsätze vor Einsetzen der Fibroblasten mit 150µl einer hoch konzentrierten Fibrinogenlösung beschichtet, die mit 50µl Thrombinlösung (3,2 U Thrombin vom Rind/ml, gelöst in 0,9% NaCl) zur Fällung gebracht wurde. 1ml

der hochkonzentrierten Fibrinogenlösung enthielt 70-110mg Fibrinogen. 2-9mg Fibronectin, 10-15U Blutgerinnungsfaktor XIII und 0,04-0,12 mg Plasminogen und ist als Tissucol^{R} (Immuno, Austria) im Handel. Bevor die hochkonzentrierten Fibrinogenlösung auf die Filtereinsätze aufgebracht wurde, wurden ihr 50µl native Thrombozyten in einer Konzentration von 6x10^{5} Thrombozyten/µl (Gruppe 2), 50µl rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten in einer Konzentration von 6x10^{5} Thrombozyten/µl (Gruppe 3), 50µl ihres Überstands (Gruppe 4) und 50µl ihrer Zellfraktion (Gruppe 5) beigefügt und mit der hochkonzentrierten Fibrinogenlösung gut vermischt. In allen Gruppen wurden die untere und obere Kammer der Kulturplatten mit 500µl, bzw. 200µl RPMI Medium gefüllt, dem zwei Antibiotika und ein Antimykotikum in oben angegebener Konzentrationen beigefügt waren. Die Mitoserate der Zellen wurden am Tag 3, 5 und 7 gemessen.

5.2.3 Zell-Kultur von Fibroblasten in 48 well plates ohne Filtereinsatz:

5.2.3.1 Vergleich der Mitoserate der Fibroblasten bei Kulturen in 24, bzw. 48 well plates.

100 µl der Zellsuspension aus humanen Fibroblasten der 4.-10. Passage wurden in einer Dichte von 4x10^{4} Zellen/cm^{2} auf 48-well plates ohne Filter versetzt. (Falcon^{R}). Korrespondierend zu den Versuchen in 24 well plates war der Boden der wells in der Gruppe 1 unbeschichtet und das Nährmedium mit 10% FBS versetzt. Die anderen wells wurden mit 25µl hochkonzentrierter Fibrinogenlösung gefüllt, die entweder mit 25µl nativen Thrombozyten, in einer Konzentration von 6x10^{5} Thrombozyten/µl (Gruppe 2), oder mit 25µl rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, in einer Konzentration von 6x10^{5} Thrombozyten/µl (Gruppe 3), bzw. mit 25µl des Überstands (Gruppe 4), oder 25µl der Zellfraktion von rehydrieten, lyophilisierten Thrombozyten (Gruppe 5) vermischt wurden. Die hochkonzentrierte Fibrinogenlösung wurde mit 25µl einer Thrombinlösung, wie oben beschrieben, zur Fällung gebracht. Jedes well der Gruppen 2-5 wurde mit 100µl RPMI Medium aufgefüllt. Die Mitoserate der Zellen wurde am Tag 3 gemessen.

5.2.3.2 Einfluss von Antikörper gegen Wachstumsfaktoren und von einem Zell-Adhäsions-Inhibitor auf die Mitoserate von Fibroblasten.

100 µl der Zellsuspension aus humanen Fibroblasten der 4.-10. Passage wurden in einer Dichte von $4x10^4$ Zellen/cm^2 auf 48-well plates ohne Filter versetzt. (Falcon^R). Die wells wurden vorher mit 25µl hochkonzentrierter Fibrinogenlösung gefüllt, die entweder 25µl rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, in einer Konzentration von $6x10^5$ Thrombozyten/µl, oder 25µl des Überstands, bzw. 25µl der Zellfraktion von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten und zusätzlich Antikörper gegen einen der Wachstumsfaktoren, bzw. Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren enthielten. Die Antikörper gegen die Wachstumsfaktoren wurden in einer hohen, bzw. niederen Konzentration beigefügt: 250/1000µg/ml Anti-PDGF; 0,5/5,0 µg/ml Anti-TGF-ß; 2,5/10µg/ml Anti-EGF und 2,5/10µg/ml µg Anti- IGF. Die hochkonzentrierte Fibrinogenlösung wurde mit 25µl einer Thrombinlösung, wie oben beschrieben, zur Fällung gebracht und mit 100µl RPMI Medium aufgefüllt. Die Mitoserate der Zellen wurde am Tag 3 gemessen. In 56 weiteren wells wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben, vorgegangen, nur wurde zu den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, anstatt der Antikörper ein Zell-Adhäsions-Inhibitor in folgenden Konzentrationen gemischt (0,02 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,1mg/ml, 1,0mg/ml, 1,25mg/ml und 2,25mg/ml).

5.2.4 Bestimmung der Wachstumsfaktoren im Medium der Zellkultur

100 µl der Zellsuspension aus humanen Fibroblasten der 4.-10. Passage wurden in einer Dichte von $4x10^4$ Zellen/cm^2 auf 48-well plates ohne Filter versetzt. (Falcon^R). Die wells wurden vorher mit 25µl hochkonzentrierter Fibrinogenlösung und mit 25µl des Überstands, bzw. der Zellfraktion von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten in einer Konzentration von $6x10^5$ Thrombozyten/µl und einem Zell-Adhäsions-Inhibitor in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gefüllt. Die hochkonzentrierte Fibrinogenlösung wurde mit 25µl einer Thrombinlösung, wie oben beschrieben, zur Fällung gebracht und mit 100µl RPMI Medium aufgefüllt. Nach drei Tage Kultur wurde aus dem Medium die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF-ß, EGF und IGF mittels Western blot bestimmt.

5.2.5 Western blot Analyse.

Der Überstand, der mit Thrombin stimulierten rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, bzw. der Überstand und die Zellfraktion von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten sowie das Medium der Zellkultur wurde mit eine Laemmli-Proben Puffer ohne Mercaptoaethanol (1:1 v/v) verdünnt. Die Wachstumsfaktoren, bzw. das Integrin GP IIb-IIIa wurden mittels Elektrophorese (Multiphor II, Pharmacia, LKB, Schweden) auf einen 12,5% SDS-Polyacrylamid-Gel für PDGF und TGF-ß; oder einem 8-18% Polyacrylamid-Gel für EGF, IGF und GPIIb-IIIa bestimmt. Zur Identifizierung wurden die korrespondierenden, gereinigten, humanen Wachstumsfaktoren verdünnt in einem Laemmli-Proben Puffer ohne Mercaptoaethanol so aufgebracht, dass die Konzentrationen für PDGF 5µgml. Für TGF-ß 0,5µg/ml, für EGF 50µg/ml für IGF 25µg/ml und für GP IIa-IIIb 0,02mg/ml betrugen. Die Gels wurden auf einer 0,45µm PVDF Membran (Immobilon, Millipore, USA) aufgebracht und mittels 5% fettloser Milch in TBST blockiert. Die aufgebrachten Membranen wurden mit anti-PDGF, anti-EGF, anti-PDGF, anti -TGF-ß bzw. anti-GP IIb-IIIa in einer 1:1000 (v/v) Lösung in 1% fettfreier Milch inkubiert. Die primären Antikörper wurden mit einem anti-Ziegen, bzw. anti-Kaninchen IgG alkalischen Phosphatase Konjugat (Sigma USA) inkubiert. Die Stellen der Bindung mit der alkalischen Phosphatase wurden durch 5-Brom-4-Clor-3-Indol-Phosphat in Nitroblau-Tetrazolium sichtbar gemacht, indem eine BCIP/NBT gepufferte Substrat Tablette (Sigma, USA) verwendet wurde.

5.2.6 Messung der Mitoserate.

Die Zell-Mitoserate wurde durch die DNA Synthese und dem Einbau von ^{3}H-Thymidin (Amersham, UK) gemessen. Das Medium der Zellkultur wurde in der unter *5.2.3.1 und 5.2.3.2* beschriebenen Versuchsanordnung am Tag 3 und in der unter *5.2.2)* beschriebenen Versuchsanordnung am Tag 3, 5 und 7 mit frischen Medium ersetzt. Nach 24 Stunden wurden zu jeden well 25µCi ^{3}H-Thymidin beigefügt. 12 Stunden später wurde das Medium verworfen und die Zellen zweimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Danach wurden sie mit 10% Triclorazetat gefällt, - Dadurch war der Fibrinklot vollkommen gelöst - zweimal mit Aqua bidest. gewaschen und gelöst in 0,5 ml

einer 1% NaOH-Lösung. Ein Teil der Lösung wurde mit 50µl Eisessig neutralisiert und in 5ml einer Szintillationslösung in einem ß Counter (Beckmann) gezählt. Die Ergebnisse wurden als ^{3}H-Thymidin Aufnahme (cpm/ml) angegeben.

5.2.7 Statistik

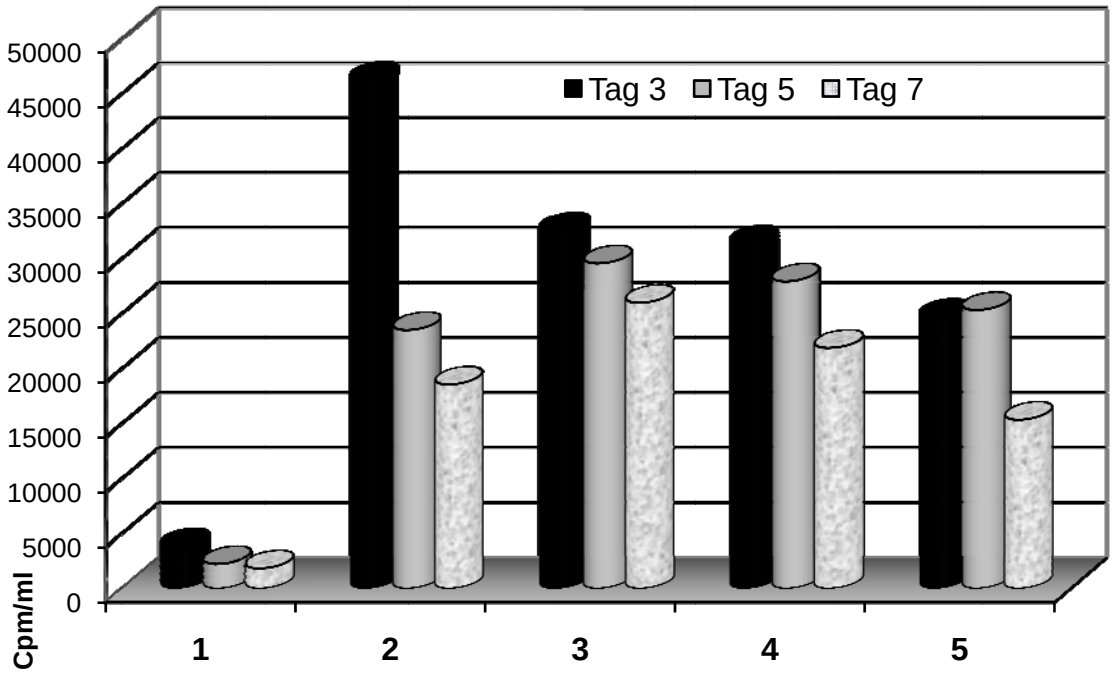
Zur statistischen Überprüfung der Resultate wurde die „Parametric covariance analysis (one-way analysis of variance)“ verwendet. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

6 Ergebnisse

6.1 Die Wirkung humaner rehydrierter. lyophilisierter Thrombozyten auf die Mitose humaner Fibroblasten im Vergleich zu nativen humanen Thrombozyten

6.1.1 Mitoseraten von Fibroblasten: Vergleich von nativen Thrombozyten mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten. Zellkultur in 24 well plates Kultur 3, 5 und 7 Tage

Abb. 4: Mitoserate von humanen Fibroblasten (cpm/ml) gemessen mittels Einbau von ^{3}H-Thymidin in einer Fibroblastenkultur in einem Nährmedium, dem fetales Kalbserum (Gruppe 1) , dem native Thrombozyten, Fibrinogen und Thrombin (Gruppe 2), dem rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, Fibrinogen und Thrombin (Gruppe 3) bzw. deren Fraktionen Überstand (Gruppe 4), oder Zellrest (Gruppe 5), Fibrinogen und Thrombin zugegeben wurde. Die Zellkultur erfolgte in 24 well plates, die Mitoserate wurde nach 3, 5, und 7 Tage gemessen.



In Abb. 4 sind die Mitoseraten der Fibroblasten, die mittels Einbau von ^{3}H-Thymidin gemessen wurden, graphisch und in Anhang Tabellen 1a-c tabellarisch zusammengefasst.

Der ^{3}H-Thymidineinbau wurde am 3., 5. und 7. gemessen und wird als counts pro Milliliter Substrat (cpm/ml) wiedergegeben.

Die Mitoserate, gemessen durch den Einbau von ^{3}H-Thymidin von humanen Fibroblasten, in einer Zellkultur mit einem Nährmedium, dem fetales Kalbserum zugegeben wurde (Gruppe1), beträgt nach drei Tage Kultur 3840 cpm/ml (+/- 1599 cpm/ml), sinkt nach fünf Tage auf 2211,9 cpm/ml (+/- 972,6 cpm/ml) und ist nach sieben Tage nur noch 1819,2 cpm/ml (+/- 623,9 cpm/ml). Werden die humanen Fibroblasten in einem Nährmedium gehalten dem Fibrinogen, native Thrombozyten und Thrombin beigesetzt wurden (Gruppe 2), beträgt die Mitoserate nach drei Tage 46297,5 cpm/ml (+/- 19951,2 cpm/ml) und ist um mehr als das Zehnfache im Vergleich zur Gruppe 1 gesteigert. Der Unterschied ist statistisch hoch signifikant (p =>0,01). Nach fünf Tage sinkt die Mitoserate auf 23493 cpm/ml (+/- 10818 cpm/ml), und nach sieben Tage auf 18644,7 cpm/ml (+/- 8281,8 cpm/ml). Der Unterschied gegenüber der Gruppe 1 ist nach wie vor signifikant (p = <0,05). Werden dem Nährmedium rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten Fibrinogen und Thrombin beigesetzt (Gruppe 3), beträgt die Mitoserate nach drei Tage 32551,7 cpm/ml (+/- 17505,8 cpm/ml. Der Unterschied zur Gruppe 1 ist statistisch hoch (p = <0,01), der zur Gruppe 2 nicht signifikant, obwohl die Mitoserate in der Gruppe 2 größer ist. Nach fünf Tagen sinkt die Mitoserate auf 29557,5 cpm/ml (+/- 7477,6 cpm/ml), nach sieben Tagen auf 21870,1 cpm/ml (+/- 8443,8 cpm/ml) auch in der Gruppe 3, allerdings deutlich weniger (p = < 0,05) als bei Zusatz von nativen Thrombozyten zum Nährmedium. Fügt man zum Nährmedium den Überstand von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten mit Fibrinogen und Thrombin zu (Gruppe 4), so beträgt die Mitoserate der Fibroblasten nach drei Tage der Kultur 31389,2 cpm/ml (+/- 7207,9 cpm/ml), nach fünf Tage 27915,9 cpm/ml (+/- 4907,6 cpm/ml) und nach 7 Tage 21870,1 cpm/ml (+/- 8443,8 cpm/ml). Ist dem Nährmedium der Zellrest von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, mit Fibrinogen und Thrombin beigesetzt (Gruppe 5) war die Mitoserate nach drei Tage der Kultur 24722,3 cpm/ml (+/-7971,4 cpm/ml), nach fünf Tage 25341,8 cpm/ml (+/- 11050 cpm/ml),

nach sieben Tage 15338,2 cpm/ml (+/- 6321,7 cpm/ml). Die statistischen Berechnungen zwischen den Gruppen 3, 4 und 5 ergaben lediglich einen signifikanten Unterschied nach 5 Tagen Zellkultur. Gegenüber den Gruppen 3 und 4 war in der Gruppe 5 die Mitoserate am geringsten.

6.1.2 Mitoseraten von Fibroblasten: Vergleich der Mitoserate von nativen Thrombozyten und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten in 24 mit 48 well plates. Kultur drei Tage.

In der Abb. 5 ist der Vergleich der Mitoseraten von Fibroblasten bei einer Kultur in 24 bzw. 48 well plates graphisch dargestellt. Die Mitoseraten wurden nach drei Tage Kultur durch den Einbau von 3^{H}-Thymidin gemessen. Die Einzeldaten der Fibroblastenkulturen unter den angegebenen Bedingungen sind tabellarisch im Anhang, Tabelle 2 zusammengestellt.

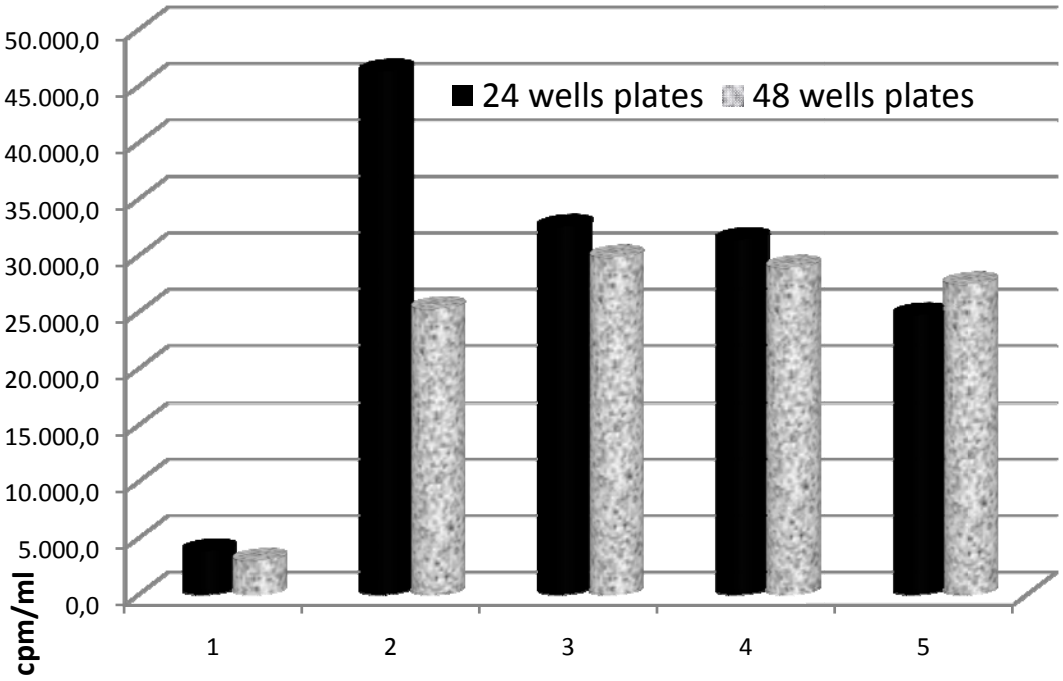


Abb. 5: Mitoserate von humanen Fibroblasten (cpm/ml) gemessen mittels Einbau von ^{3}H-Thymidin in einer Fibroblastenkultur in einem Nährmedium, dem fetales Kalbserum (Gruppe 1), dem native Thrombozyten, Fibrinogen und Thrombin (Gruppe 2), dem rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, Fibrinogen und Thrombin (Gruppe 3) bzw. deren Fraktionen Überstand (Gruppe 4), oder Zellrest (Gruppe 5), Fibrinogen und Thrombin zugegeben wurden. Die

Mitoserate wurde nach drei Tage gemessen. Die Zellkultur erfolgte in 24 (erste Säule), bzw. in 48 (Zweite Säule) well plates.

In der Gruppe 1, bei der FCS dem Nährmedium, und in den Gruppen 3, 4 und 5 bei denen Fibrinogen und rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, bzw. deren Fraktionen Überstand bzw. Zellrest zugefügt wurden zeigte sich bei den Mitoseraten der Fibroblasten kein statistisch nachweisbarer Unterschied beim Wachstum in 24 oder 48 well plates. Lediglich bei der Gruppe 2, wo dem Nährmedium native Thrombozyten, Fibrinogen und Thrombin beigegeben wurden, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Bei einer dreitägigen Kultur in 24 well plates war der 3^H-Thymidineinbau 46297,5 (+/. 19951,2) cpm/ml, während er bei einer dreitägigen Kultur in 48 well plates nur 25272,4 (+/- 6668,1) cpm/ml und damit nur 54% vom Wert in 24 well plates betrug.

6.2 Membranbestandteile in den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten

Abb.: 6a

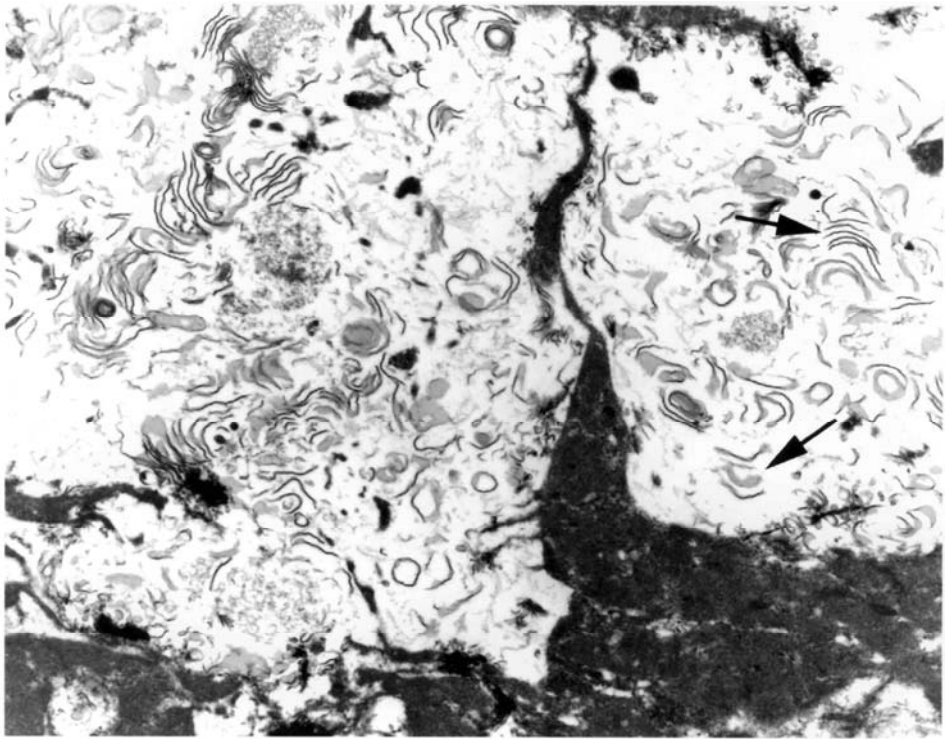
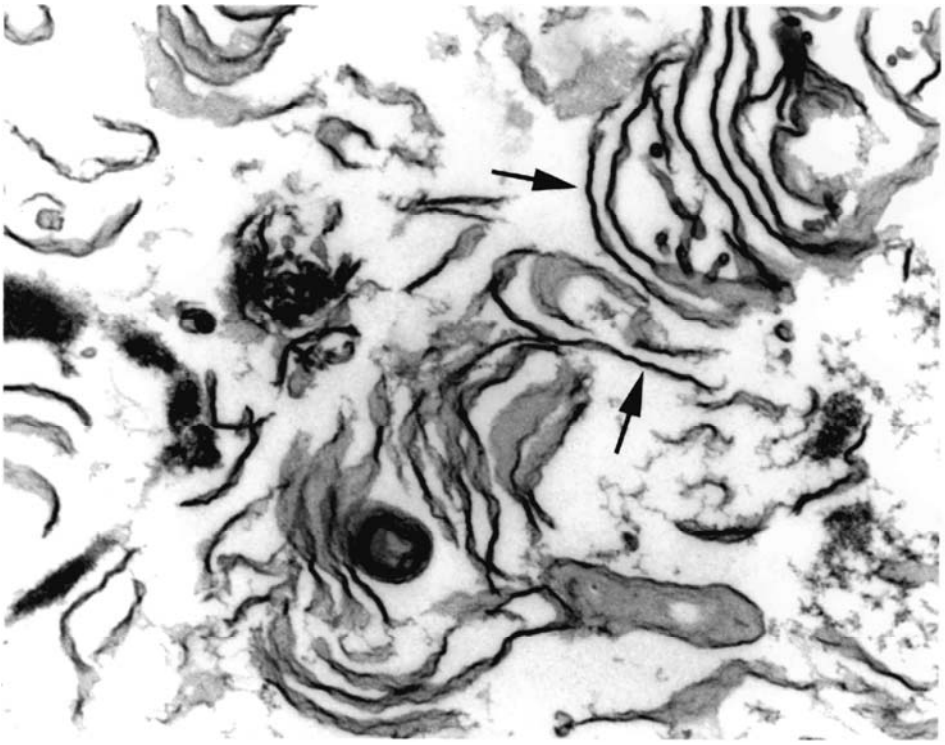


Abb.: 6b

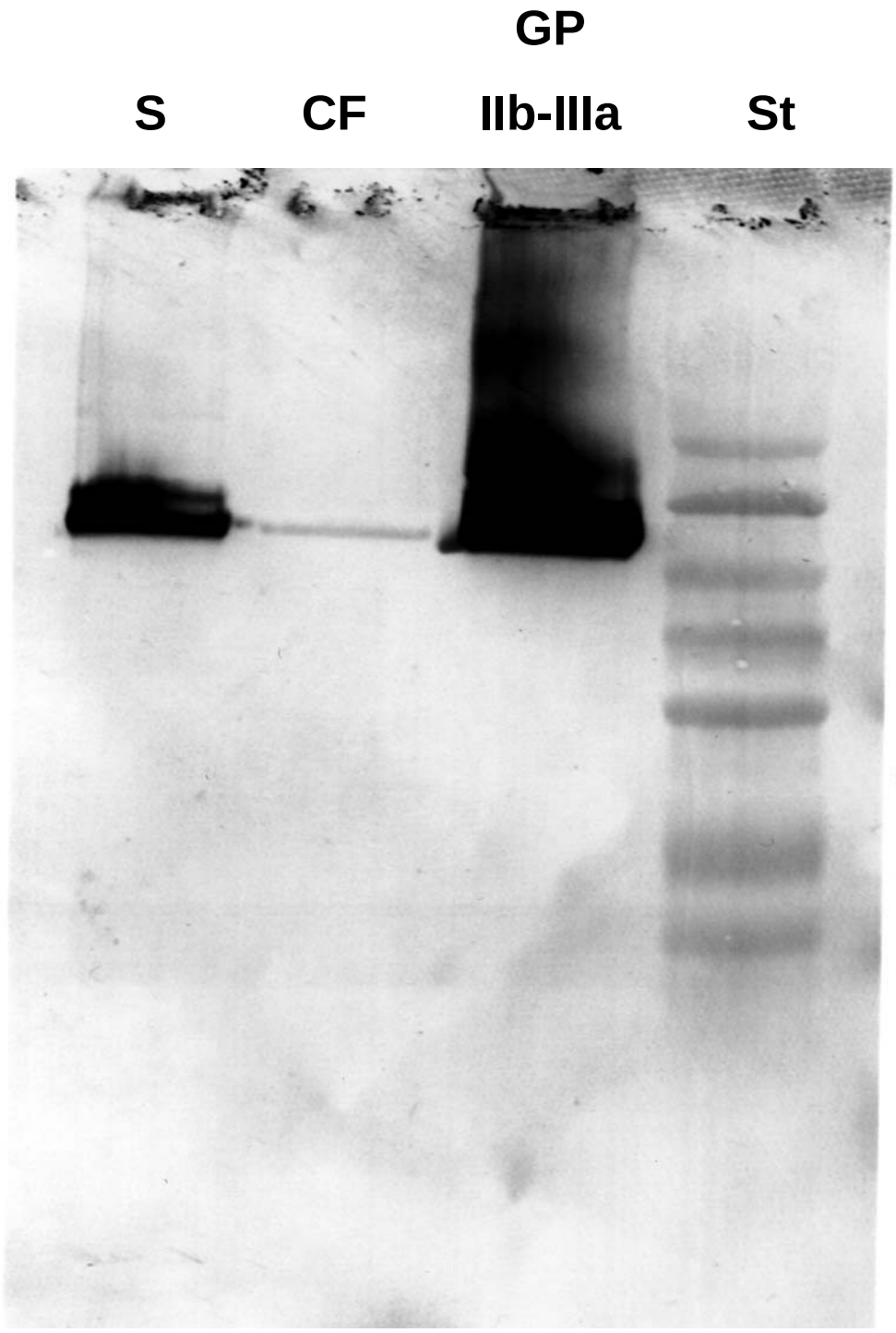


= Membranstrukturen

Abb.: 6a und 6b Rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten. Elektronenoptisches Bild

In der Abb. 6a und 6b zeigt das elektronenoptische Bild von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten neben einen Zelldetritus auch Membranstrukturen. Diese können mittels Western blot als Integrin IIb-IIIa identifiziert werden, wobei im Überstand (S), deutlich mehr nachgewiesen werden konnte, als in der Zellfraktion (CF).

Abb.:7 Fraktionen nach Zentrifugieren der rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten. S = Überstand, CF = Zellfraktion. Western blot von S und CF. GP IIb-IIIa = gereinigtes humanes Integrin in einer Konzentration von 0,5mg/ml St = Molekulargewichtsstandart.

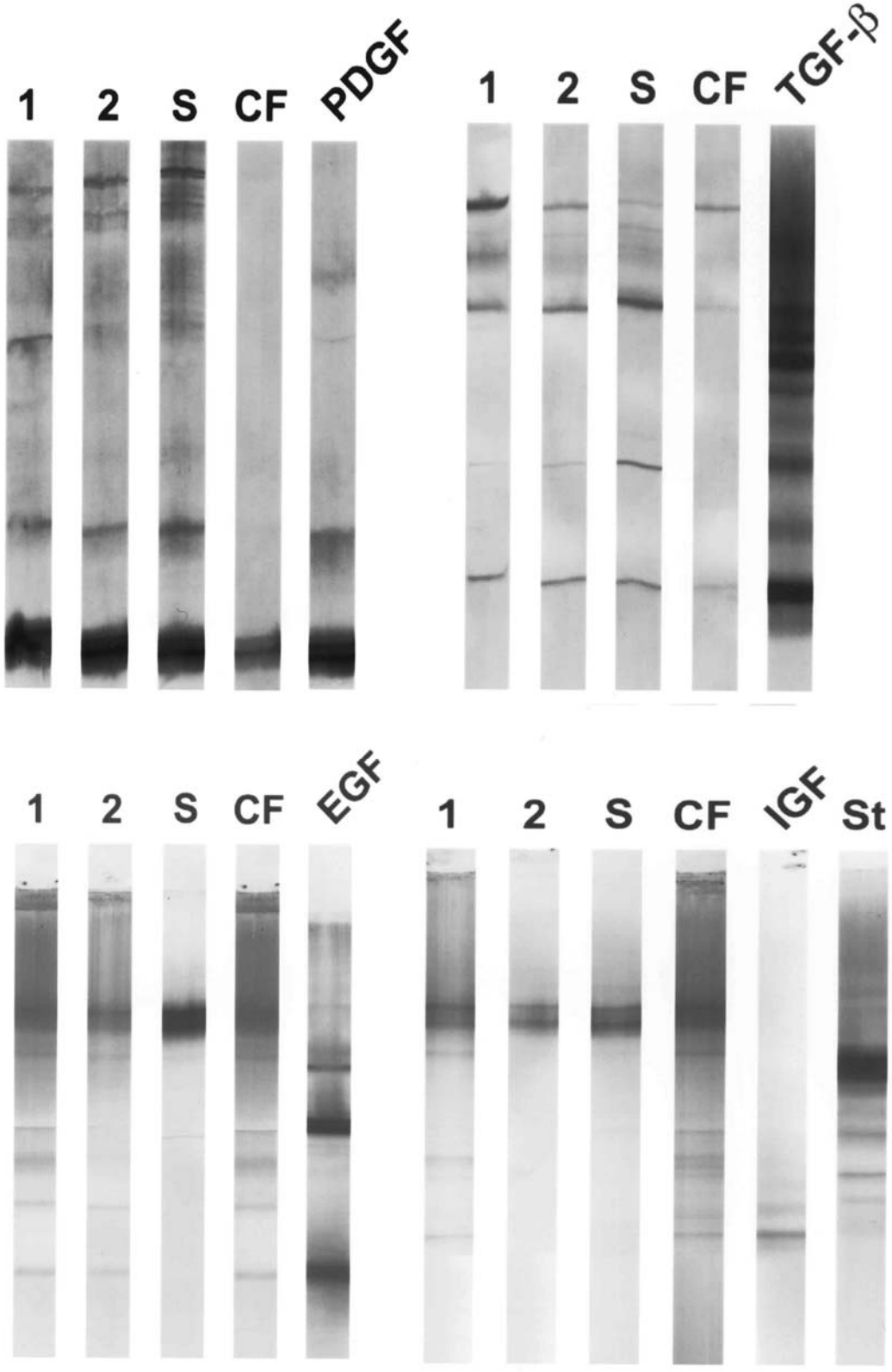


6.3 Wachstumsfaktoren in den einzelnen Präparationen: rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten; Überstand, Zellfraktion.

Werden rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten mit Thrombin inkubiert, lassen sich alle Wachstumsfaktoren, PDGF, TGF-ß, EGF und IGF bestimmen. Und zwar PDGF, TGF-ß und EGF sowohl bei Inkubation mit niedriger (0,5 U/ml, Säule 2), als auch bei hoher (5,0 U/ml, Säule 1) Thrombin Konzentration, IGF dagegen nur dann, wenn mit hoher Thrombin Konzentration inkubiert wurde. Ohne Inkubation mit Thrombin finden sich im Überstand rehydrierter, lyophilisierter Thrombozyten (Säule S) PDGF und TGF-ß nicht aber EGF und IGF, in der Zellfraktion (Säule CF) alle Wachstumsfaktoren, PDGF, TGF-ß, EGF und IGF.

Abb.: 8. Western blot von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten die mit Thrombin in einer Konzentration von 5,0U/ml (Säule 1),bzw. 0,5 U/ml (Säule 2) inkubiert wurden und Western blot aus dem Überstand (Säule S), bzw. aus der Zellfraktion (Säule CF). von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, ohne Inkubation mit Thrombin.

Säule PDGF, TGF-ß. EGF und IGF = gereinigte humane Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von PDGF und TGF-ß = 0,5µg/ml, EGF=50µg/ml und IGF = 25µg/ml. Säule St = Molekulargewichtsstandart.


1
2
S
CF
PDGF
1
2
S
CF
TGF-β
1
2
S
CF
EGF
1
2
S
CF
IGF
St

6.4 Untersuchungen zur Wirkung von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, Fibrin(ogen) und Thrombin auf die Mitose von Fibroblasten.

6.4.1 Wirkung von Antikörper gegen Wachstumsfaktoren auf die Mitoserate der Fibroblasten

Abb.: 9a R*ehydrierte, lyophilisierte, Thrombozyten.* 3 Tage Zellkultur von humanen Fibroblasten in 48 well plates. Der Boden der wells war beschichtet mit hochkonzentriertem Fibrinogen, das mit Thrombin zur Fällung gebracht wurde. Dem hochkonzentriertem Fibrinogen wurden rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, zusätzlich in den Gruppen 2-6 noch Antikörper gegen Wachstumsfaktoren beigemengt. Gruppe 1 diente als Kontrolle ohne Antikörper gegen Wachstumsfaktoren. In den Gruppen 2-6 waren Antikörper gegen Wachstumsfaktoren enthalten: In der Gruppe 2 Antikörper gegen TGF-ß (l = 0,5µg/ml; h = 5µg/ml); in der Gruppe 3 Antikörper gegen EGF (l = 2,5µg/ml; h = 10µg/ml); in der Gruppe 4 Antikörper gegen IGF (l = 2,5µg/ml; h = 10µg/ml); in der Gruppe 5 Antikörper gegen PDGF (l = 250µg/ml; h = 1000µg/ml); in der Gruppe 6 Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren in oben angegebener Konzentrationen. Die Mitoserate wurde mittels Einbau von H^3-Thymidin nach drei Tagen Kultur gemessen (cpm/ml).

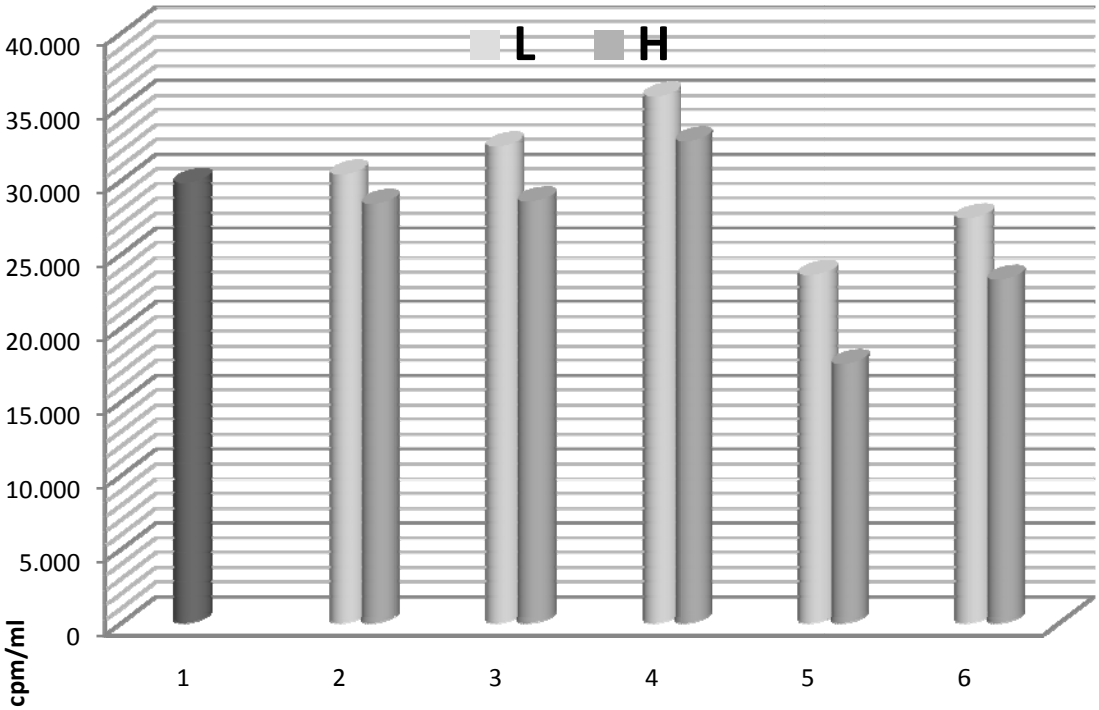


Abb.:9b Überstand von rehydrierten lyophilisierten Thrombozyten,. 3 Tage Zellkultur von humanen Fibroblasten in 48 well plates. Der Boden der wells war beschichtet mit hochkonzentriertem Fibrinogen, das mit Thrombin zur Fällung gebracht wurde. Dem hochkonzentriertem Fibrinogen wurden der Überstand von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, zusätzlich in den Gruppen 2-6 noch Antikörper gegen Wachstumsfaktoren beigemengt. Gruppe 1 diente als Kontrolle ohne Antikörper gegen Wachstumsfaktoren In den Gruppen 2-6 waren Antikörper gegen Wachstumsfaktoren enthalten: In der Gruppe 2 Antikörper gegen TGF-ß (l = 0,5µg/ml; h = 5µg/ml); in der Gruppe 3 Antikörper gegen EGF (l = 2,5µg/ml; h = 10µg/ml); in der Gruppe 4 Antikörper gegen IGF (l = 2,5µg/ml; h = 10µg/ml); in der Gruppe 5 Antikörper gegen PDGF (l = 250µg/ml; h = 1000µg/ml); in der Gruppe 6 Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren in oben angegebener Konzentrationen. Die Mitoserate wurde mittels Einbau von ^{3}H-Thymidin nach drei Tagen Kultur gemessen(cpm/ml).

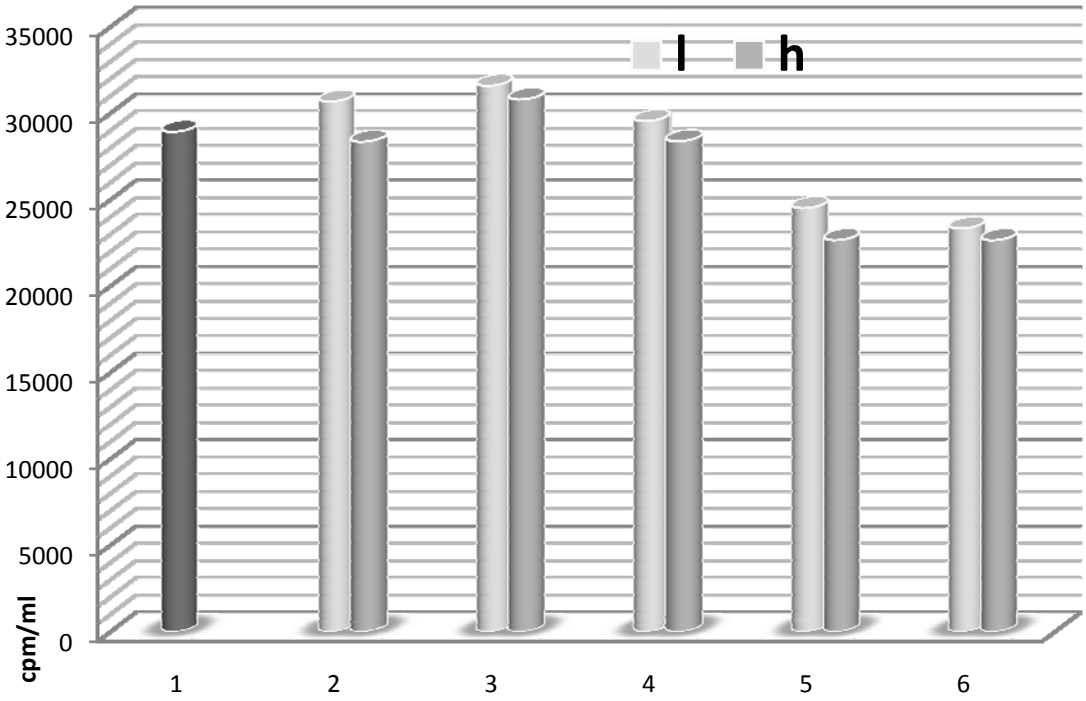
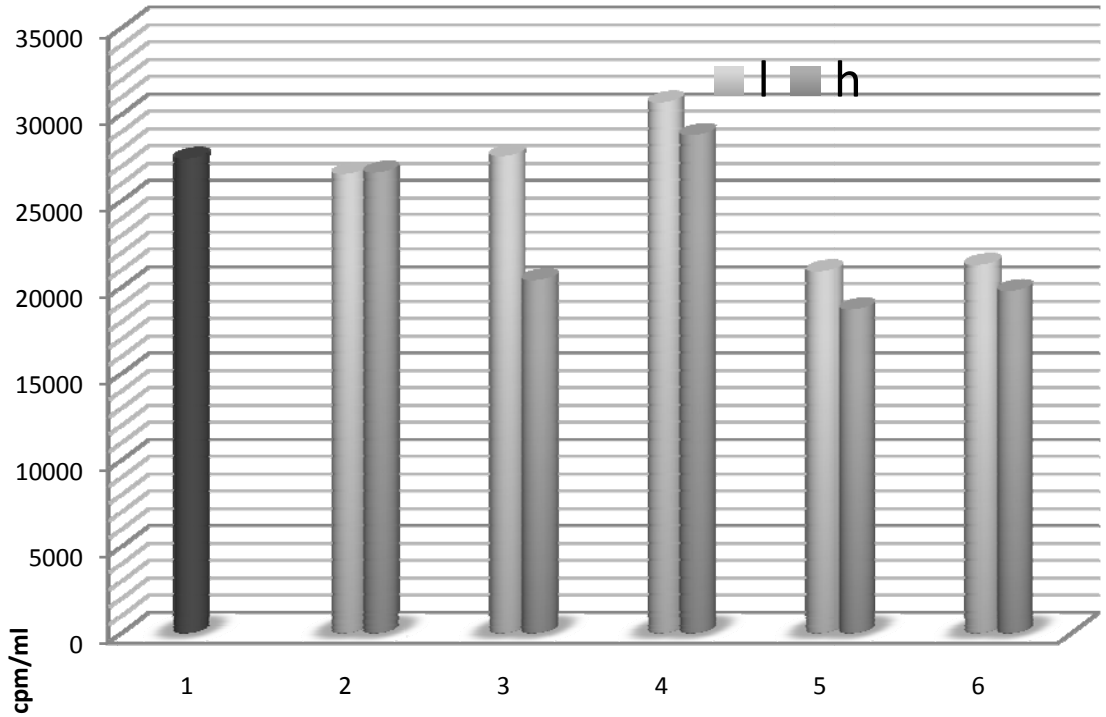


Abb.:9c *Zellrest von rehydrierten lyophilisierten Thrombozyten* 3 Tage Zellkultur von humanen Fibroblasten in 48 well plates. Der Boden der wells war beschichtet mit hochkonzentriertem Fibrinogen, das mit Thrombin zur Fällung gebracht wurde. Dem hochkonzentriertem Fibrinogen wurden der Zellrest von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, zusätzlich in den Gruppen 2-6 noch Antikörper gegen Wachstumsfaktoren beigemengt. Gruppe 1 diente als Kontrolle ohne Antikörper gegen Wachstumsfaktoren In den Gruppen 2-6 waren Antikörper gegen Wachstumsfaktoren enthalten: In der Gruppe 2 Antikörper gegen TGF-ß (l = 0,5µg/ml; h = 5µg/ml); in der Gruppe 3 Antikörper gegen EGF (l = 2,5µg/ml; h = 10µg/ml); in der Gruppe 4 Antikörper gegen IGF (l = 2,5µg/ml; h = 10µg/ml); in der Gruppe 5 Antikörper gegen PDGF (l = 250µg/ml; h = 1000µg/ml); in der Gruppe 6 Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren in oben angegebener Konzentrationen. Die Mitoserate wurde mittels Einbau von ^{3}H-Thymidin nach drei Tagen Kultur gemessen(cpm/ml).



Werden der Zellkultur von Fibroblasten *rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten,* Fibrinogen Thrombin und Antikörper gegen Wachstumsfaktoren in einer niedrigen, bzw. hohen Konzentration beigegeben so zeigt sich nach

drei Tagen Kultur, bei Zugabe von Antikörper gegen TGF-ß, EGF und IGF keine Änderung der Mitoserate der Fibroblasten im Vergleich zu der Mitoserate einer Zellkultur ohne Antikörper (29840 +/- 13732,4 cpm/ml). Es ist zwar die Mitoserate, bei höherer Antikörperkonzentration immer geringer als bei niedrigerer, der Unterschied ist aber statistisch nicht nachzuweisen. Bei PDGF war bei Zugabe von Antikörper gegen den Wachstumsfaktor die Mitoserate 23586,7 +/- 8769,6 cpm/ml und damit signifikant ($p < 0,05$) weniger im Vergleich zur Mitoserate ohne Antikörper. Bei höherer Antikörperkonzentration gegen PDGF fiel die Mitoserate noch geringer aus, nämlich 17550,7 +/- 8783,9 cpm/ml. Werden zur Zellkultur Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren gegeben sinkt die Mitoserate bei niedriger Antikörperkonzentration auf 27432,1 +/- 9631,8 cpm/ml bei hoher auf 23271,6 +/- 5878,3 cpm/ml statistisch signifikant ab. (Abb.9 a und Anhang Tabelle 3a)

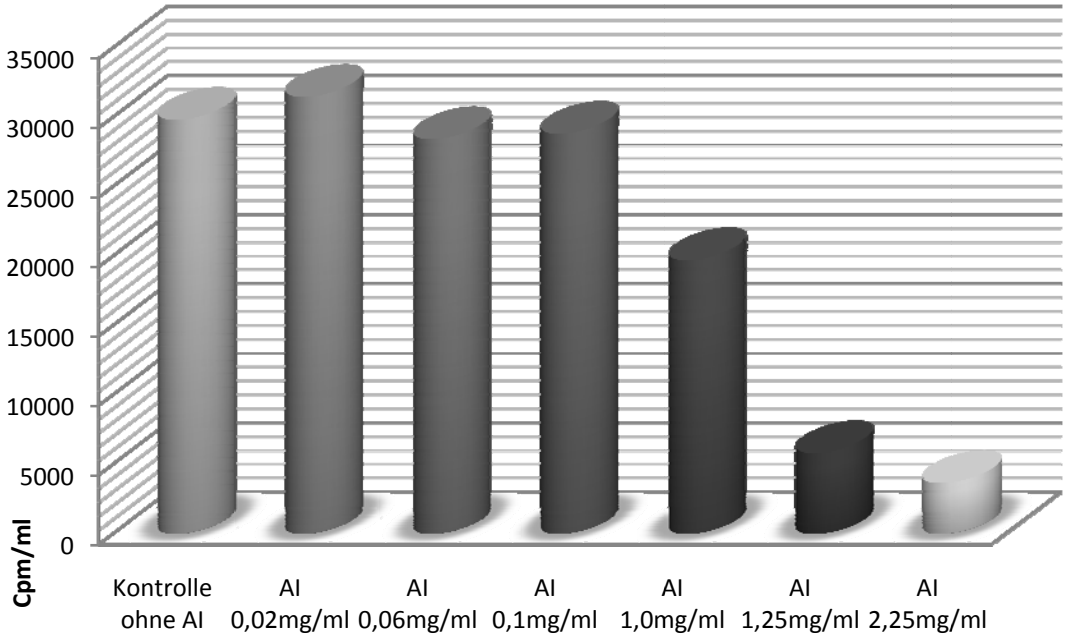
Werden der Zellkultur von Fibroblasten der *Überstand* von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, Fibrinogen, Thrombin und Antikörper gegen Wachstumsfaktoren in einer niedrigen, bzw. hohen Konzentration beigegeben, so konnten ähnliche Ergebnisse wie bei den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten erzielt werden. Bei Zugabe von Antikörper gegen TGF-ß, EGF und IGF erfolgte keine signifikante Änderung in der Mitoserate der Fibroblasten im Vergleich zur Mitoserate einer Zellkultur ohne Antikörper (28927 +/- 12324,6 cpm/ml). Allerdings ist der Unterschied von niedriger zur hohen Antikörperkonzentration weniger deutlich als bei der Gruppe mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten. Wie bei den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten ist auch beim Überstand die Mitoserate signifikant geringer, wenn Antikörper gegen PDGF (24511,1 +/-4188,2 bzw. 22658,7 +/- 11364,5 cpm/ml), bzw. Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren der Zellkultur beigefügt wurden (23333,3 +/- 5976,5 bzw. 22654,7 +/- 6808,4 cpm/ml). (Abb.9b und Anhang Tabelle 3b)

Ein anderes Verhalten war beim *Zellrest* von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten festzustellen. Bei Zugabe von Antikörper gegen TGF-ß und IGF,

sowohl in niedriger, als auch hoher Konzentration bestand kein Unterschied zur Mitoserate ohne Antikörper (27457,8 +/- 9955,7cpm/ml). Bei EGF war bei niedriger Antikörper-Konzentration ebenfalls kein Unterschied der Mitoserate im Vergleich ohne Antikörper festzustellen. Dagegen war bei hoher Konzentration die Mitoserate deutlich geringer (20431,5 +/- 1816,2 cpm/ml) der Zellkultur ohne Antikörper. Werden Antikörper gegen PDGF beigefügt ist die Mitoserate deutlich geringer als ohne Antikörper (20940 +/- 8795,8 bzw. 18741,7 +/- 5714,6 cpm/ml). Ebenfalls deutlich geringer als ohne Zugabe von Antikörper ist die Mitoserate wenn Antikörpern gegen alle vier Wachstumsfaktoren der Zellkultur beigefügt wurden (21319,2 +/- 5345,3 bzw. 19809,3 +/- 4674,2 cpm/). (Abb.9c und Anhang Tabelle 3c)

6.4.2 Einfluss der Integrins GP IIb-IIIa auf die Mitoserate von Fibroblasten.

Abb.:10 *Rehydrierte, lyophilisierte, Thrombozyten*. 3 Tage Zellkultur von humanen Fibroblasten in 48 well plates. Der Zellkultur wurde ein Adhäsionsinhibitor (AI) in steigender Konzentration zugefügt. Die Mitoserate wurde mittels Einbau von ^{3}H-Thymidin gemessen(cpm/ml).

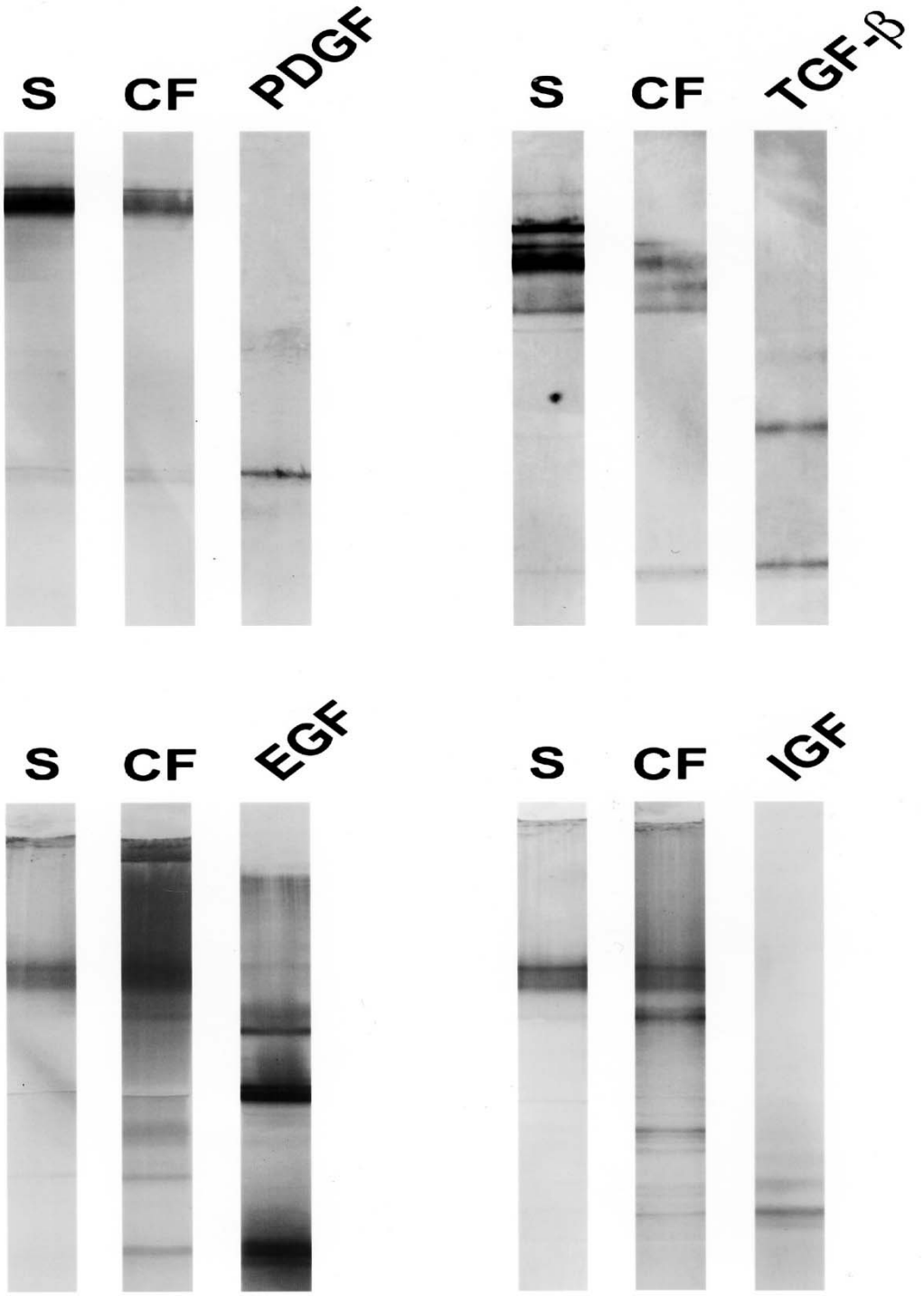


Adhäsionsinhibitoren hemmen das Integrin GP IIb-IIIa und verhindern dadurch die Bindung von Fibrinogen an die Zellen. Wird in einer Zellkultur von Fibroblasten der Adhäsionsinhibitor in einer Konzentration von 0,02 bis 0,1 mg/ml beigefügt, zeigte sich kein Unterschied zur Mitoserate der Fibroblasten ohne Adhäsionsinhibitor (29840 +/- 13732,4 cpm/ml). Erst bei einer Konzentration von 1,0 mg/ml war die Mitoserate, und dann Dosis abhängig, signifikant geringer als ohne Adhäsionsinhibitor. Bei einer Konzentration von 1,0 mg/ml war die Mitoserate 19738,5 +/- 16548,7 cpm/ml, bei einer Konzentration von 1,25 mg/ml 5836,8 +/- 4349 cpm/ml, bei einer Konzentration von 2,25 mg/ml war die Mitoserate nur mehr 3682,5 +/- 3581,9 cpm/ml.

6.4.3 Einfluss des Integrins GP IIb-IIIa auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren

Werden einer Kultur von Fibroblasten, der neben Thrombin und Fibrinogen auch der Überstand, bzw. die Zellfraktion von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten zugesetzt wurden, das Integrin GP IIb-IIIa mittels eines Adhaesionsinhibitor gehemmt und nach drei Tagen im Medium die Wachstumsfaktoren gemessen so lassen sich darin folgende Wachstumsfaktoren mittels Western blot bestimmen: In der Kultur mit der Zellfraktion alle vier Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF-ß, EGF und IGF während im Überstand nur PDGF und TGF-ß, nicht aber EGF und IGF nachgewiesen werden konnte (Abb.: 11).

Abb.: 11 Zellkultur von humanen Fibroblasten in 48 well plates. Dem Nährmedium wurde neben Thrombin und Fibrinogen der Überstand (S), bzw. die Zellfraktion (CF) von rehydrierten, lyophilisierten, Thrombozyten, sowie ein Adhaesionsinhibitor in einer Konzentration von 0,1 mg/ml beigefügt. Nachweis der Wachstumsfaktoren mittels Western blot nach drei Tagen Kultur im Medium. PDGF, TGF-ß. EGF und IGF = gereinigte humane Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von PDGF und TGF-ß = 0,5µg/ml, EGF=50µg/ml und IGF = 25µg/ml.


S
CF
PDGF
S
CF
TGF-β
S
CF
EGF
S
CF
IGF

7 Diskussion

Wird bei einer Gewebsverletzung ein Blutgefäß durchtrennt entsteht ein Blutgerinnsel. Das Blutgerinnsel besteht hauptsächlich aus Fibrin, enthält aber auch sämtliche andere Blutbestandteile. Fibrin stillt die Blutung und ist gleichzeitig die extrazelluläre Matrix, in die Zellen in das Wundareal einwandern. Die Thrombozyten, als Blutbestandteile sind an der Bildung von Fibrin beteiligt. Kommen Thrombozyten mit freigelegtem Kollagen der Gefäßwand in Kontakt verändern sich ihre Oberflächenrezeptoren, die Integrine. Das bewirkt, dass sich die einzelnen Thrombozyten mit Hilfe des von Willebrand Faktors aneinander lagern (aggregieren), oder sich an extrazellulärer Matrixproteine, wie etwa Fibrin oder Fibronectin, binden (25, 26, 27). Die aggregierten, oder an extrazelluläres Matrixprotein gebundene Thrombozyten sezernieren zahlreiche Mediatoren, die für die Blutgerinnung und Wundheilung wesentlich sind. Die Mediatoren ziehen Leukozyten, Makrophagen und Fibroblasten in das Wundbett und aktivieren diese Zellen. Ist bei einer Gewebsverletzung kein Gefäß verletzt, und unterbleibt die Blutung so werden vasoaktive Mediatoren und chemotaktische Faktoren durch die verletzten und/oder aktivierten Parenchymzellen gebildet. Diese sind es die jetzt die Leukozyten und Makrophagen in das Wundbett heranziehen (28).

Die Leukozyten reinigen das Wundareal, wobei Bakterien und Fremdkörper durch das Wundsekret abtransportiert, oder durch die Makrophagen phagozytiert werden. In Antwort auf die verschiedenen chemotaktischen Reize wie z.B. Fragmente von extrazellulärem Matrixprotein, TGF-ß und andere mehr, infiltrieren auch Monozyten das Wundareal und verwandeln sich zu aktivierten Makrophagen. Durch ihren Integrin Rezeptor binden sich Makrophagen an die etrazelluläre Matrix, was einerseits ihre Phagozytosefähigkeit stimuliert, anderseits die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bewirkt (29).

Zytokine und Wachstumsfaktoren sind es, die proliferative Zellen (Fibroblasten, Angioblasten und Keratinozyten) in das Wundareal bringen und ihre Teilung verursachen. Zytokine sind Proteine, die andere Zellen anlocken

oder, durch Bindung an spezifischen Rezeptoren von Zelloberflächen ihr Wachstum, ihre Differenzierung, oder auch ihr Absterben (Apotose) verursachen. Man unterscheidet vier Hauptgruppen: Hämatopoetine (Interleukine), die TNF-Familie, Chemokine und Interferone. Wachstumsfaktoren sind multifunktionelle Proteine die durch Ankoppelung an spezifischen Oberflächenrezeptoren Nachrichten von Zelle zu Zelle übertragen, sie dadurch aus der Ruhephase mobilisieren, oder einen neuen DNA-Synthesezyklus induzieren. Wachstumsfaktoren und Zytokine sind es, die die Vermehrung der Integrinrezeptoren am Fibroblasten bewirken, die sich dadurch an benachbarten Fibroblasten binden können (30). Sind genügend Fibroblasten im Wundgrund vorhanden beginnt ihre Kollagensynthese. Sobald genügend Kollagen gebildet ist, beenden die Fibroblasten ihre Synthese. Interferon- und die Prokollagen-Matrix selbst unterdrücken die Fibroblastenaktivität, ihre Apotose beginnt. Das fibroblastenreiche Granulationsgewebe wandelt sich in ein zellarmes Narbengewebe.

Der Verschluss einer Verletzung erfolgt dann durch die Wiederherstellung des Epithels. Bei Hautverletzungen beginnt die Reepithelisierung vom Wundrand innerhalb von Stunden nach der Verletzung (31). Die Epithelzellen verändern sich, die intrazellulären Tonofilamente ziehen sich zusammen und die Desmosomen, die die interzellulären Verbindungen, und die Hemidesmosomen, die die Verbindung mit der Basalmembran herstellen, bilden sich zurück. Dadurch verlieren epidermale und dermale Zellen ihren Zusammenhalt, und zwar sowohl untereinander, als auch mit der Basalmembran. Sie bilden periphere zytoplasmatischen Aktin-Filamente aus und können sich so fortbewegen (32). Integrinrezeptoren werden an den Epidermalzellen ausgebildet, sodass sie sich mit der extrazellulären Matrix verbinden können, Desmosomen stellen wieder die interzelluläre Verbindung her und die Reepithelisierung erfolgt wie bei einem Reißverschluss, vom Wundrand ausgehend (32,33). Der Stimulus für die Migration der Epithelzellen, für ihre morphologischen Veränderungen, und für die vermehrte Zellteilung, ist einerseits der Verlust der Verbindung mit der Nachbarzelle, die durch die

Verletzung verursacht wird, andererseits die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der Umgebung der Verletzung (34,35).

Das nach Epithelisierung entstandene zellarme Narbengewebe beginnt dann zu schrumpfen. Ein Vorgang, der mit der Entwicklung von Myofibroblasten aus Fibroblasten beginnt. Myofibroblasten sind durch breite Bündel von aktin-haltigen Mikrofilamenten charakterisiert, die sich im Zytoplasma entlang der Zellmembran ausbilden. Weiters sind die Myofibroblasten untereinander und mit der extrazellulären Matrix verbunden (36,37). Durch die zellulären Mikrofilamente und den Verbindungen mit extrazellulärer Matrix kann das Narbengewebe sich kontrahieren und schrumpfen. Die Auslösung der Kontraktion erfolgt durch Wachstumsfaktoren sowie Querverbindungen der einzelnen Kollagenbündel.

Wundheilungsstörungen, wie am Beispiel des diabetischen Ulcus gezeigt werden kann, sind multifaktoriell. Durch die Gefäßstörungen beim Diabetes wird die Wunde schlecht ernährt, die Gefäßbildung im Wundbett ist vermindert und die Makrophagenfunktion gestört. Es entstehen hypertrophe Narben, als Ausdruck einer fibroproliferativen Störung mit einer Kollagenansammlung innerhalb der Wunde. Weiters werden bei der Heilung des diabetischen Ulcus Störungen der Zellmigration und Zellproliferation, der Synthese und Sekretion von extrazellulärer Matrix, Wachstumsfaktoren und Zytokinen angenommen (38). Zur Verbesserung bei Heilungsstörungen von Wunden wurden einerseits einzelne Wachstumsfaktoren lokal auf die Wunde aufgetragen (39,40), anderseits spezielle Wundverbände (41) verwendet. Allerdings keine dieser Methoden konnten bisher überzeugen, was insofern erklärbar ist, als immer nur ein Agens, trotz Komplexität der Vorgänge bei der Wundheilung ersetzt, oder unterstützt wurde.

Das Konzept von Gfatter et al. (24) die gestörte Wundheilung zu unterstützen, indem Fibrin(ogen) und Thrombozyten in hoher Konzentration der Wunde lokal zugeführt werden erscheint den komplexen Vorgängen bei der

Wundheilung am ehesten zu entsprechen. Fibrin(ogen) ist als extrazelluläre Matrix das adäquate Milieu für die Immigration, Wachstum und Vermehrung von Zellen, aber auch für die Interaktion von Zellen von Bedeutung. Die Thrombozyten sind die natürliche Quelle für Wachstumsfaktoren und Zytokine. In ihren Untersuchungen an einer Zellkultur von humanen Fibroblasten konnten die Autoren zeigen, dass nur Fibrin(ogen) und Thrombozyten zusammen die Mitose von Fibroblasten steigern können, nicht aber Thrombin-stimulierte Thrombozyten, oder Fibrin(ogen) alleine. Nur Fibrin(ogen) und Thrombozyten gemeinsam ermöglichen die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Granula der Thrombozyten. Werden Integrine gehemmt, somit interzelluläre Verbindungen und/oder zelluläre Verbindungen mit der extrazellulären Matrix unterbrochen, unterbleibt der Effekt von Fibrin(ogen) und Thrombozyten auf die Mitose der Fibroblasten und auf die Sekretion der Wachstumshormone. Ihre Untersuchungen wurden mit humanen vitalen Thrombozyten durchgeführt.

Derartige Thrombozytenpräparationen haben den Nachteil der kurzen Lagerungsdauer und der Unmöglichkeit ein Sterilisationsverfahren dabei anzuwenden. Es schien deswegen von Interesse zu untersuchen, ob lyophilisierte Thrombozyten mit Fibrin(ogen) einen gleichen Effekt am Fibroblasten in einer Kultur haben wie die vitalen Thrombozyten. Beim Lyophilisieren werden den Zellen Wasser entzogen, was dazu führt dass die äußere Zellmembran (Zellwand), aber auch Membranen und Strukturen im Inneren der Zellen auseinander brechen. Beim Lyophilisieren von Thrombozyten entsteht ein weißes Pulver, das bei der Zugabe von Wasser als gelbliche, dickflüssige Lösung imponiert (rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten). Wird diese Lösung zentrifugiert (100g/min, 20 min) trennt sich ein bräunliche Lösung mit korpuskulären Zellbestandteilen (CF) vom klarem flüssigen Überstand (S). Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von CF waren neben amorphen Zelldetritus auch Membranstrukturen zu erkennen. Native Thrombozyten benötigen zur Freisetzung der in den verschiedenen Granula gespeicherten Substanzen einer Stimulation. Solche physiologischen Stimuli sind Kollagen, Thrombin, Trypsin, ADP, Serotonin, oder Epinephrin. Für

diese Substanzen existieren an der äußeren Zellmembran der Thrombozyten Rezeptoren. Der Thrombozyt antwortet in gleicher Weise auf die verschiedenen Stimuli, nämlich durch Entleerung seiner Granula. Die Sekretion aus den Granula kann aber erst dann erfolgen wenn die Thrombozyten aggregieren, wozu sie die Membranbestandteile GPIIb-IIIa benötigen. Bei Stimulation mit Thrombin ist für die Sekretion aus den Granula keine Aggregation notwendig (42, 43). Auch die Untersuchungen von Gfatter et al. bestätigten, dass die durch Integrine vermittelte Aggregation der vitalen Thrombozyten von entscheidender Bedeutung für die Sekretion aus den Granula ist. So war in vorliegender Untersuchung nachzuweisen, ob die elektronenoptisch erkennbaren Membranstrukturen von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, als Integrin GPIIb-IIIa identifiziert werden können. Im Western blot zeigte sich, dass rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten das GP IIb-IIIa enthalten, und zwar sind in S deutlich mehr, als in CF. Dieses Ergebnis deutet dahingehend, dass die Integrine leicht in Lösung gehen und nur ein geringer Teil von ihnen an ein Substrat gebunden, im korpuskulären Compartement CF der rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten enthalten sind.

Stimulierte native Thrombozyten entleeren ihre Granula. So werden aus den Alpha Granula die Wachstumsfaktoren EGF, IGF, PDGF und TGFß freigesetzt. Erfolgt der Stimulus mit Thrombin sind für die Freisetzung der verschiedenen Wachstumsfaktoren unterschiedliche Konzentrationen von Thrombin notwendig. Kaplan et al. (44) zeigten, dass zwei Wege zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren existieren: Bei niedriger Thrombinkonzentration erfolgt die Freisetzung über den Weg der Cyclooygenase, während bei hoher Konzentration dieser Weg übergangen wird. Obwohl bei den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten anzunehmen ist dass durch den Vorgang des Lyophilisierens auch die Membranstrukturen der Granula zerstört werden und demnach die Wachstumsfaktoren bei Rehydrierung in Lösung gehen und keine Stimulation mit Thrombin zur Freisetzung notwendig ist, wurden vor Bestimmung der Wachstumsfaktoren mittels Western blot die rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten mit Thrombin

in einer niedrigen, bzw. hohen Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurde ohne Inkubation mit Thrombin in den einzelnen Fraktionen, CF und S die Wachstumsfaktoren bestimmt. PDGF, TGF-ß und EGF lassen sich in rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten unabhängig der Thrombinkonzentration nachweisen, IGF nur bei hoher Thrombin Konzentration. Ohne Inkubation mit Thrombin finden sich in S von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten PDGF, TGF-ß nicht aber EGF und IGF. In CF von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten konnten alle vier Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Lyophilisierung die Zellstrukturen der Thrombozyten und die Bindungen der Wachstumsfaktoren an diese Zellstrukturen unterschiedlich zerstört werden. PDGF und TGF-ß werden durch den Vorgang der Lyophilisierung aus den Granula herausgelöst und befinden dann in S, während EGF und IGF weiters an Zellstrukturen gebunden bleiben und sich dann in Compartement von CF nachweisen lassen. Die Bindung von IGF an seine Zellstruktur scheint auch eine stärkere zu sein als bei den anderen Wachstumsfaktoren, da es eine höhere Konzentration von Thrombin bedarf es aus seiner Bindung zu lösen.

Gfatter et al. haben. mittels Einbau von 3^{H}-Thymidin nachgewiesen, dass mit Thrombin stimulierte, native humane Thrombozyten, gemeinsam mit humanem Fibrin(ogen) eine gesteigerte Zellteilung der Fibroblasten bewirken. Um zu untersuchen, ob auch rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten mit Fibrin(ogen) die gleiche Wirkung haben, wurde in vorliegender Untersuchung ein gleicher Versuchsansatz verwendet und die Mitose in einer Fibroblasten-Zellkultur am dritten, fünften uns siebenten Tag der Kultur gemessen. Als Kontrollen dienten einerseits die Fibroblastenkulturen mit Medium, dem fetales Kalbserum(FCS) zugesetzt wurde, anderseits Fibroblastenkulturen mit Medium dem Fibrin(ogen) und native Thrombozyten zugegeben wurden. Die Mitoserate der Fibroblasten war im Vergleich der Zellkultur, der lediglich FCS beigegeben wurde signifikant gesteigert, wenn der Zellkultur Fibrin(ogen) und Thrombozyten beigesetzt wurden, egal ob native oder, lyophilisierte Thrombozyten, bzw. S, oder CF von rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten beigegeben wurde. In

allen Versuchen mit Fibrin(ogen) wurde Thrombin in einer hohen Konzentration von 3,2 U/ml verwendet, damit war sichergestellt, dass alle Wachstumsfaktoren aus ihren Verbindungen gelöst, frei zur Verfügung stehen. Die Steigerung der Mitose von Fibroblasten war bei den rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten gleich den nativen Thrombozyten. Im Vergleich zur Zellkultur mit FCS war die Mitose um das 8 fache gesteigert. Die Wirkung hielt bis zum siebenten Tag der Zellkultur an und war von lyophilisierten Thrombozyten und ihren Fraktionen S und CF gleich. Eine Ausnahme war in der Kultur mit CF am siebenten Tag, wo die Mitose der Fibroblasten geringer war als am fünften Tag. Die Erklärung dürfte in der, im Vergleich von S und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, in CF enthaltenen höheren Konzentration von Zellstrukturen sein, an die sich die Wachstumsfaktoren binden und nicht mehr für die Fibroblasten zur Verfügung stehen, insofern auch, als die einmalige Gabe von Thrombin am Anfang des Versuches bei seiner kurzen Halbwertszeit nicht ausreicht um diese Verbindungen ausdauernd zu lösen. Die kurze Halbwertszeit von Thrombin ist es auch, die das signifikante Absinken der Mitoserate der Fibroblasten bei nativen Thrombozyten am fünften Tag verursacht. Thrombin hat, innerhalb der ersten drei Tage der Kultur bewirkt, dass aus den Granula der nativen Thrombozyten die Wachstumsfaktoren auch ohne vorherige Aggregation freigesetzt werden. Danach müssen die Thrombozyten zuerst aggregieren um die Wachstumsfaktoren freizusetzen. So stehen ab den dritten Tag weit aus weniger Wachstumsfaktoren zur Stimulierung der Mitose zur Verfügung. Im Vergleich zur Untersuchung von Gfatter et al. war in der Gruppe mit vitalen Thrombozyten und Fibrin(ogen) in vorliegender Untersuchung ein geringere Wachstumsrate, ausgedrückt als cpm/ml nach drei Tage Kultur zu messen (196645 +/- 56864 cpm/ml vs. 46297 +/-19951). Eine Erklärung konnten wir dafür nicht finden.

Aus Kostengründen – und auch in Anlehnung an die Untersuchungen von Gfatter et al. - wurden die weiteren Versuche in 48 well plates ohne Filtereinsatz durchgeführt. Es war vorerst zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse in den 24 well plates mit Filtereinsatz auch in 48 well plates ohne Filtereinsatz nach drei

Tagen Fibroblastenkultur reproduzieren lassen. Hervorzuheben ist, dass das Verhältnis der Fibroblastenzahl /cm^2 mit 10^4 Zellen/cm^2 für beide plates gleich war, allerdings aufgrund der größeren Fläche der 24 well plates diese zweimal mehr Fibroblasten und Thrombozyten enthalten. Die Mitoserate der Fibroblasten war in beiden well plates gleich, unabhängig davon ob FCS, rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, deren S, oder CF dem Kulturmedium neben Fibrin(ogen) zugegeben wurde. Lediglich bei Zusatz von nativen Thrombozyten und Fibrin(ogen) zum Medium war die Mitoserate in 48 well plates um die Hälfte geringer, als in den 24 well plates. Dies erklärt sich, dass bei nativen Thrombozyten die Freisetzung von Wachstumsfaktoren entweder durch Thrombin, oder durch Aggregation der Thrombozyten erfolgt, somit von der Menge der Thrombozyten abhängt. Die freigesetzten Wachstumsfaktoren wirken dann auf die Fibroblasten und initiieren ihre Zellteilung, die durch den Thymidineinbau angezeigt wird. In 48 well plates sind nur die Hälfte Thrombozyten und Fibroblasten enthalten als in 24 well plates, woraus sich auch der geringere Einbau von Thymidin erklärt.

Sind für eine gesteigerte Mitose der Fibroblasten die Wachstumsfaktoren verantwortlich, so sollte, wenn sie durch Antikörper gehemmt werden dieser Effekt ausbleiben. So schien es von Interesse der Zellkultur Antikörper gegen die verschiedenen Wachstumsfaktoren beizugeben, wobei die Mitoserate am dritten Tag der Zellkultur gemessen wurde, da bis zu diesem Zeitpunkt die höchsten ^{3}H-Thymidineinbaurate nachgewiesen werden konnte. Wie vorliegende Untersuchungen ergeben und in der Literatur beschrieben wurde (45,46) hat die größte Wirkung auf die Zellteilung der Fibroblasten PDGF. Bei Hemmung von PDGF durch Antikörper war die Mitoserate auch deutlich vermindert, und zwar sowohl in der Kultur mit Fibrin(ogen) und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten, als auch mit Fibrin(ogen) und S, bzw. CF. Antikörper gegen TGF-ß, EGF und IGF haben auf die Fibroblastenkultur mit Fibrin(ogen) und rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten sowie mit Fibrin(ogen) und S keinen Einfluss, was insofern nicht überrascht, da in den Untersuchungen durch Western blot gezeigt wurde, dass in S sich kein EGF

und IGF befindet. Sind Antikörper gegen alle vier Wachstumsfaktoren in der Fibroblastenkultur enthalten, somit alle vier Wachstumsfaktoren gehemmt, so ist gegenüber der Kultur in der nur Antikörper gegen PDGF enthalten ist keine wesentlicher Unterschied in der Mitoserate nachzuweisen, allerdings ist die Mitoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe auch hier statistisch signifikant geringer. In keiner der Versuchsgruppen hatte eine Steigerung der Antikörperkonzentration um das 10 fache einen Einfluss auf die Mitoserate, allerdings war bei höherer Antikörperkonzentration die Mitoserate immer niedriger, sodass es in weiteren Untersuchungen durch Wahl einer höheren Antikörperkonzentration (30,50 fache Konzentrationen) nachzuweisen sein wird, ob nicht die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Mitoserate der Fibroblasten nicht dosisabhängig und für die verschiedenen Wachstumsfaktoren unterschiedlich ist.

Wird einer Kultur aus Fibroblasten, der zur Stimulation der Mitose native Thrombozyten und Fibrin(ogen) beigegeben wurde, ein Adhäsionsinhibitor zugesetzt, unterbleibt die Sekretion der Wachstumsfaktoren und damit die Stimulierung der Mitose (24). Die Erklärung der Autoren war, dass vor Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus nativen Thrombozyten eine Aggregation der Thrombozyten erfolgen muss, die durch ihr Membranintegrin GPIIb-IIIa vermittelt wird. Wird dieses Integrin gehemmt, unterbleibt die Aggregation und die Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den Granula. Somit stehen auch keine Wachstumsfaktoren zur Verfügung, die eine Mitose der Fibroblasten steigern könnten. Anders verhält es sich mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten. Durch den Vorgang des Gefriertrocknens sind die Zellstrukturen aufgebrochen und, wie vorliegende Untersuchungen durch den Western blot zeigten stehen die Wachstumsfaktoren damit frei zur Verfügung, um die Mitose der Fibroblasten zu steigern. Wird der Zellkultur der Fibroblasten mit rehydrierten, lyophilisierten Thrombozyten ein Inhibitor von GP IIb-IIIa dazugegeben zeigt sich dennoch eine Wirkung: die Mitose wird gehemmt, allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen des Inhibitors. Diese Wirkung ist dosisabhängig. Eine Zellkultur mit Fibrin(ogen),Thrombin, CF und S und

zusätzlichem Inhibitor von GP IIb-IIIa in einer Konzentration von 0.1mg/ml enthält nach drei Tagen ausreichend Wachstumsfaktoren, wie die Western blot Untersuchung zeigt. Dabei war auch die gleiche Verteilung, wie im vitro Versuch ohne Zellkultur zu finden. Trotz ausreichender Wachstumsfaktoren ist aber durch Zugabe des Inhibitors von GP IIb-IIIa eine Steigerung der Mitose der Fibroblasten hemmbar. Die Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist folgende: Für eine gesteigerte Mitose der Fibroblasten sind zwei Bedingungen notwendig. Einerseits Wachstumsfaktoren, anderseits die Verbindung der Fibroblasten entweder miteinander (Zelle an Zelle), oder an ein Matrixprotein wie Fibrin(ogen). Unterbleibt diese Bindung ist die Wirkung der Wachstumsfaktoren gehemmt. Die hohe Konzentration des Inhibitors, die dazu notwendig ist, um eine Hemmung zu erwirken ergibt sich dadurch, dass sich der Inhibitor nicht nur der an die Integrine GP IIb-IIIa der Fibroblasten bindet, sondern auch an die durch die Gefriertrocknung der Thrombozyten freigewordenen Integrine.

Durch vorliegende Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten die gleiche Wirkung, wie native Thrombozyten haben. In einer Kultur von Fibroblasten vermögen sowohl native, als auch rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten die Mitoserate der Fibroblasten in gleicher Weise zu steigern. Allerdings haben lyophilisierte Thrombozyten den Vorteil, dass sie einer Hitzesterilisation zugeführt werden können, somit für die Anwendung am Menschen besser geeignet sind. Es wird jedoch weitere Untersuchungen benötigen um nachzuweisen, ob die Wirkung bei der Hitzesterilisation erhalten bleibt.

8 Literatur:

(1) Spängler HP. Gewebeklebung und lokale Blutstillung mit Fibrinogen, Thrombin und Blutgerinnungsfaktor XIII. Wien.klin.Wschr 1976 ; 88; Suppl.49

(2) Schäffer M, Becker H D. Immunregulation der Wundheilung. Der Chirurg. 1979; 70; 897-908.

(3) Leibovich S J, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol. 1975; 78; 71-100.

(4) Martin P, et al. Wound healing in the PU.1 null mouse – tissue repair is not dependent on inflammatory cells. Curr. Biol. 2003; 13; 1122-1128.

(5) Lindblad W.J. How should one study wound healing? Wound Repair Regen. 2000; 14; 515.

(6) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigert L. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. Cell Differentiation 1986; 19: 1-17.

(7) Ross R E, Raines W, Bowen-Pope D F. The biology of platelet-derived growth factor. Cell 1986; 46: 11-69.

(8) Sporn M B, Roberts A B, Wakefield L M, Assoian R K. Transforming growth factor-B: biological function and chemical structure. Science 1986; 233:532-4.

(9) Benett N T, Schultz G S. Growth factors and wound healing: Biochemical Properties of growth factors and their receptors. American J.of Surgery; 1993; 165: 728-737.

(10) Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as source of proteins for healing and tissue regeneration.Thomb.Haemostat; 2004; 91: 4-15.

(11) Lansddown AD. Calcium: A potential central regulator in wound healing in the skin. Wound Repair Regen. 2002; 10:271-285.

(12) Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, et al. Deposition of platelelet RANTES triggering monocyte recruitment reqires P-Selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. Circulation 2002; 106; 1523-1529.

(13) Balasubramanian V, Gabrowski E, Bini A, et al.. Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow condions. Blood 2002¸100:2787-92

(14) Fan Z, Larson PJ, Bognacki J, et al..Tissue factor regulates plasminogen binding and activation. Blood 1998; 91:1987-98.

(15) Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al.. CD-40 ligand on activated Platelets triggers an inteflammatory reaction of entothelial cells. Nature 1998; 391:591-594.

(16) McEver RP. P-selectin and and PSGL-1: Exploiting connections betweeninflammation and venous thrombosis. Thomb. Haemost. 2002; 87: 364-365.

(17) Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules`constituents, secretion and function. Platelets 2001; 12: 261-273.

(18) Hynes RO. Integrins:Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Ahesion. Cell 1992; 69: 11-25.

(19) Ginsberg MH, Loftus JC, Plow EF. Cytoadhesins, Integrins, and Platelets. Thromb. Haemost. 1988; 59:1-6.

(20) Shatil SJ, Brugge JS.Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets. Curr.Opin.Cell Biol. 1991; 3: 869-879.

(21) Manning DR, Brass LF. The role of GTP-binding proteins in platelet activation. Thromb. Haemost. 1991; 66: 393-399.

(22) Robson MC et al. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. Ann.Surg. 1992; 216: 401-406.

(23) Steed DL and the Diabetic Ulcer Group. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. J. Vasc. Surg. 1995; 21: 71-79.

(24) Gfatter R et al. The mitosis of fibroblast in cell culture is enhanced by binding GP IIb-IIIa of activated platelets on fibrinogen. Platelets. 2000; 11: 204-214.

(25) Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipids distribution during platelet activation. Biochem Biophys Acta. 1983; 736:57-66.

(26) Abelda SM, BuckCA. Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB j. 1990; 4:2868-80.

(27) Andrieux A, Rabiet MJ, Chapel A, Concord E, Marguerie G. A highly conserved sequence of a Arg-Gly-Asp-binding domain of the integrin ß3 subunit is sensitive to stimulation. J Biol Chem 1991; 266: 14202-7.

(28) Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. 1999; New England J. Medicine. 341: 738-745.

(29) Brown EJ. Phagozytosis. Bioessays 1995; 17: 109-117

(30) Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF-a and other growth factors in vivo: analysis by mRNA-phenotyping. Science 1988; 241: 708-712.

(31) Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. J Cell Biol 1996; 132:381-397.

(32) Larjava H, Salo T, Haapasalmi K, Kramer RH, Heino J. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. J Clin Invest 1993; 92: 1425-1435.

(33) Clark RAF, Ashcroft GS, Spencer MJ, Larjava H, Ferguson MWJ. Reepithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from avß5 to avß6 integrins. Br J Dermatol 1996; 135: 46-51

(34) Werner S, Smola H, Liao X et al. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. Science 1994; 266: 819-22.

(35) Clark RAF, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepitheliazation. J Invest Dermatol 1982; 79; 264-269.

(36) Welch MP, Odland GF, Clark RAF. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. J Cell Biol 1990; 110:133-145.

(37) Laato m, Kähäri VM, Ninikoski J, Vuorio E. Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes. Biochem J. 1987; 247: 385-388.

(38) Scheithauer M, Riechelmann H.B. Die gestörte kutane Wundheilung. Review Part II. Laryngo-Rhino-Otol 2003; 82:36-39.

(39) Tsang MW et al. Human Epidermal Growht Factor enhances healing of diabetic foot ulcers. Diabetes Care 2003; 26:1856-1861

(40) Wiemann TJ, Smiell JM, Su SY. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human Platelet-Derived Growth Factor-BB (Becaplermin) in patients with chronic diabetic ulcers. Diabetes Care 1998; 21: 822-827

(41) Veves A, Sheehan P, Pham HT. A randomised, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidised regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. Arch Surg 2002; 137:822-827.

(42) Kinlough-Ranbone RL, Perry DW. Prolonged expression of procoagulant activity of human platelets degranulated by thrombin. Thromb Haemos 1995; 74: 958-61.

(43) Zecker MB, Nachmias VT. Platelet activation. Atheriosclerosis 1985; 5: 2-18.

(44) Kaplan KL, Broeckman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M. Platelet alpha-granule proteins: studies on release and subscellular localization. Blood 1979; 53: 604-18.

(45) Robson MC, Philipp LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. Lancet 1992; 339:23-25.

(46) Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, Ross R. Effect of growth factors in vivo. Am J Pathol 1987; 129:601-613.

9 Anhang

Tabelle 1a: Vergleich native, rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten u. deren Fraktionen (Überstand, Zellrest).

3 Tage Fibroblasten-Zellkultur in 24 well plates . Zellwachstum auf Einsatz. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/min).

	FCS	FK + Thrombinnativ.Pl.	FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl	FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl. Überstand	FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl Zellrest
	3.839,5	63.465,7	22.747,5	28.996,6	23.950,7
	5.543,5	78.541,2	36.499,2	23.626,0	19.810,8
	3.920,0	18.549,3	37.047,5	27.547,0	22.817,6
	6.847,4	43.008,1	88.356,1	33.880,7	16.955,5
	3.402,8	44.332,1	59.187,8	28.076,0	27.358,8
	3.261,3	29.888,7		23.559,6	18.678,3
	1.471,2		19.197,6	48.994,7	26.212,6
	2.336,8		21.073,9	39.060,9	39.336,2
	1.572,0		23.640,2	35.299,5	12.996,5
	1.127,5		38.969,7	26.278,9	20.255,9
			17.081,4	29.961,6	27.843,5
			25.590,9		40.451,5
	5.886,6		19.532,8		
	5.607,8		20.858,2		
	3.660,3		28.495,0		
	4.208,6		41.339,9		
	4.411,1		20.902,5		
	4.343,6		32.859,5		
M	3.840,0	46.297,5	32.551,7	31.389,2	24.722,3
SD	1.599,0	19.951,2	17.505,8	7.207,9	7.971,4

Tabelle 1b: Vergleich native : rehydrierte, lyophilisierten Thrombozyten u. deren Fraktionen (Überstand, Zellrest).

5 Tage Fibroblasten-Zellkultur in 24 well plates . Zellwachstum auf Einsatz. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

FCS		**FK + Thrombinnativ.Pl.**	**FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl**	**FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl. Überstand**	**FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl Zellrest**
3.973,4	2.816,0	19.824,7	27.798,9	25.415,9	15.604,1
2.642,6	2.021,8	15.417,3	30.959,8	22.558,9	37.281,8
2.065,5	4.055,0	31.043,3	32.830,4	30.907,4	16.934,9
1.802,5	2.115,6	13.799,0	27.106,8	24.813,2	21.835,4
1.738,2	2.003,4	44.159,2	36.715,9	40.624,7	43.656,9
1.020,7	1.927,0	18.718,1	29.895,1	29.686,1	16.575,8
1.210,3	2.329,8	15.824,7	20.440,6	28.988,2	
1.052,0	1.699,5	15.417,3	28.694,6	25.238,3	
2.082,9	4.918,8	31.043,3	15.938,4	23.985,3	
1.647,3	2.553,8	13.799,0	15.278,2	30.184,2	
1.037,5	2.747,4	44.159,2	37.786,7	24.073,4	
1.414,6		18.718,1	33.356,5		
			42.034,5		
			27.797,9		
			36.128,7		
M	2.211,9	23.493,6	29.557,5	27.915,9	25.314,8
SD	972,6	10.818,0	7.477,6	4.907,6	11.050,0

Tabelle 1c: Vergleich native : rehydrierte, lyophilisierten Thrombozyten u. deren Fraktionen (Überstand, Zellrest).

7 Tage Fibroblasten-Zellkultur in 24 well plates . Zellwachstum auf Einsatz. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

	FCS	**FK + Thrombinnativ.Pl.**	**FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl**	**FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl. Überstand**	**FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl Zellrest**
	1.363,1	28.759,9	49.786,9	33.077,9	7.038,0
	2.353,8	21.065,2	36.911,5	19.050,7	16.342,0
	1.352,1	9.543,0	60.262,4	18.774,4	6.412,6
	861,0	5.941,1	52.847,9	13.319,6	11.105,5
	2.309,2	22.780,7	35.760,6	13.344,4	13.680,6
	2.743,8	13.587,5		33.653,4	17.118,3
	1.239,3	4.819,0	10.079,9		13.898,1
	1.371,5	22.329,8	10.637,8		12.719,3
	1.513,9	25.627,4	21.887,6		19.386,8
	1.769,6	26.444,7	11.417,3		18.546,1
	2.003,3	28.428,8	24.416,5		16.039,4
	2.950,2	14.409,4	35.057,0		31.771,7
			22.131,8		
			13.686,8		
			16.654,4		
			19.481,8		
			13.516,0		
			6.994,3		
M	1.819,2	18.544,7	25.972,4	21.870,1	15.338,2
SD	623,9	8.281,8	15.889,0	8.443,8	6.321,7

Tabelle 2: Vergleich native : rehydrierte, lyophilisierten Thrombozyten u. deren Fraktionen (Überstand und Zellrest). 3 Tage Fibroblasten-Zellkultur in 48 well plates. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

FCS		FK + Thrombin nativ.Pl.	FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl.		FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl. Überstand		. FK + Thrombin rehy.lyoph.Pl Zellrest	
6.031,6	1.076,5	23.886,1	67.470,0	35.996,6	15.648,3	32.023,0	36.904,0	6.383,8
5.585,5	258,9	27.134,4	36.924,5	6.249,0	17.661,6	36.452,0	34.180,0	7.004,7
6.903,1	137,2	30.927,3	33.562,8	32.531,1	10.397,9	44.254,0	42.440,0	29.521,2
8.691,9	171,5	27.698,5	32.892,0	16.532,2	14.767,6	40.577,0	41.513,0	26.395,4
6.813,9	1.188,4	35.139,8	30.883,4	8.758,3	9.784,9	37.751,0	50.726,0	13.509,4
7.275,8	335,3	38.259,8	25.530,6	22.561,0	9.938,4	36.358,0	30.981,0	14.262,7
8.472,6	216,2	31.124,5		19.827,8	14.695,9	29.841,0	29.731,0	23.742,3
6.275,9	484,1	28.649,5		5.000,0	6.589,5	32.571,0	28.047,0	23.758,4
8.691,9	3.078,6	19.918,7	55.768,2	13.376,9	33.655,1	35.975,0	36.137,5	38.031,0
8.472,6	2.530,9	28.275,9	48.079,1	33.284,2	27.614,2	38.469,0	32.206,4	40.757,0
7.275,8	2.126,6	28.645,0	34.193,8	15.780,7	27.483,1	34.595,0	30.812,9	39.206,0
6.903,1	1.978,9	14.606,7	26.918,9	17.095,8	25.020,8	36.084,0	28.024,8	21.545,0
6.813,9	2.450,8	21.586,7	22.865,8	14.086,3	24.812,3	33.880,0	26.332,5	37.578,0
6.275,9	1.897,9	26.798,9	22.416,7	9.626,5	21.453,4	41.444,0	23.021,5	33.937,0
6.031,6	1.505,0	10.612,8	19.834,9	11.365,9	17.174,7	31.588,0	14.281,5	30.380,0
5.586,5	1.561,3		17.742,0	14.022,3	8.515,8	40.674,0	13.562,6	40.431,0
820,6	1.263,6	25.365,1	9.350,0	7.220,1	40.846,0	25.020,5	40.556,0	14.281,5
679,9	788,6	21.746,2	25.030,0	47.900,1	37.237,0	21.453,4	37.418,0	30.812,9
568,3	684,0	23.688,4	22.504,0	31.495,7	30.612,0	27.483,6	1.574,0	13.562,6
574,0	627,6	27.175,5	26.187,0	364.111,0	34.968,0	33.655,1	47.346,0	23.021,5
733,9	612,9	31.384,8	51.090,0	22.924,2	36.575,0	24.812,3	63.723,0	28.024,8
758,1	600,4	24.206,4	40.344,0	24.553,5	40.421,0	17.174,7	49.991,0	26.332,5
2.346,0	884,1	23.821,2	37.811,0	21.841,4	42.170,0	27.614,2	40.065,0	32.206,4
482,8	798,1		44.292,0	3.292,5	51.876,0	8.515,8	42.691,0	36.137,5
2.444,0	608,0		43.298,0	22.865,8	27.564,0	8.222,0	20.894,0	17.831,0
1.884,0	679,0		48.720,0	22.416,7	47.738,0	19.695,0	24.437,0	20.367,0
1.804,0	568,0		32.970,0	17.742,0	27.830,0	18.526,0	19.964,0	21.121,0
1.767,0	574,0		50.984,0	19.834,9	24.470,0	37.874,0	23.548,0	29.170,0
2.058,0	733,0		56.000,0	26.918,9	15.589,0	19.617,0	26.140,0	35.803,0
1.709,0	758,0		52.900,0	55.768,2	15.484,0	34.615,0	15.978,0	24.655,0
2.190,0	2.345,0			34.193,8	19.089,0	23.008,0	7.155,0	22.131,0
1.950,0	482,0			48.079,1	1.511,0	17.430,0	21.907,0	33.273,0
5.126,0	6.031,0		41.078,0	20.334,0	35.107,0			
6.051,0	5.586,0		25.575,0	17.053,0	50.015,0			
3.371,0	6.903,0		31.931,0	27.402,0	44.471,0			
3.100,0	8.691,0		43.455,0	55.653,0	51.416,0			
920,0	6.813,0		40.280,0	24.870,0	43.807,0			
209,0	7.275,0		34.146,0	24.060,0	43.825,0			
441,0	8.472,0		29.631,0	29.731,0	39.277,0			
123,0	6.275,0							
			9.350,0					
			25.030,0					
			22.504,0					
			26.187,0					
			51.090,0					
			40.344,0					
			37.811,0					
			44.292,0					
M	2.995,7	25.272,4	29.840,0		28.927,0		27.457,8	
SD	2.815,9	6.668,1	13.732,4		12.324,6		9.955,7	

Tabelle 3a: *Rehydrierte, lyophilisierte, Thrombozyten*. Antikörper gegen Wachstumsfaktoren. 3 Tage Fibroblasten Zellkultur in 48 well plates. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti TGF-ß 0,5µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti TGF-ß 5µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti EGF 2,5µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti EGF 10µg/ml/ml
	31.205,0	28.328,0	41.965,0	30.109,0
	32.156,0	30.163,0	30.603,0	31.544,0
	32.146,0	28.333,0	39.193,0	16.028,0
	31.491,0	25.860,0	32.166,0	32.977,0
	31.007,0	17.585,0	33.494,0	24.531,0
	29.467,0	32.489,0	31.651,0	35.435,0
	29.492,0	34.121,0	29.807,0	31.704,0
	26.267,0	30.428,0	47.578,0	26.283,0
M	30.403,8	28.413,4	32.307,1	28.576,4
SD	1.841,0	5.072,2	5.455,2	5.770,9

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti IGF 2,5µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti IGF 10µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti PDGF 250µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti PDGF 1000µg/ml
	42.108,0	35.757,0	16.003,3	10.219,1
	29.886,0	30.536,0	31.710,4	11.012,6
	30.086,0	35.220,0	42.524,9	35.400,0
	30.646,0	29.543,0	16.536,3	17.963,8
	34.651,0	23.346,0	23.685,5	10.163,0
	41.262,0	38.023,0	19.640,0	17.255,5
	37.820,0	33.887,0	15.361,5	10.772,5
	39.047,0	34.896,0	23.208,1	27.619,5
M	35.688,2	32.651,0	23.583,7	17.550,7
SD	5.066,1	4.665,8	8.769,6	8.783,9

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti TGF-ß 0,5µg/ml anti EGF 2,5µg/ml anti IGF 2,5µg/ml anti PDGF 250µg/ml	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL anti TGF-ß 5µg/ml anti EGF 10µg/ml anti IGF 10µg/ml anti PDGF1000µg/ml
	17.592,0	14.510,0
	23.686,0	17.535,0
	11.505,0	26.087,0
	26.424,0	22.476,0
	35.839,0	23.840,0
	27.223,0	35.827,0
	33.268,0	22.808,0
	43.920,0	23.090,0
M	27.432,1	23.271,6
SD	9.631,8	5.878,3

Tabelle 3b: Rehydrierte, lyophilisierte Thrombozyten, *Überstand*. Antikörper gegen Wachstumsfaktoren. 3 Tage Fibroblasten Zellkultur in 48 well plates. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti TGF-ß 0,5µg/ml	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti TGF-ß 5µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti EGF 2,5µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti EGF 10µg/ml/ml**
	25321,0	27778,0	35975,0	29379,0
	37624,0	37326,0	38469,0	31548,0
	36677,0	33884,0	34595,0	26945,0
	27672,0	37688,0	36084,0	33626,0
	34708,0	21570,0	33880,0	34040,0
	19713,0	18054,0	21444,0	36809,0
	30400,0	30443,0	31588,0	28132,0
	33340,0	20060,0	20674,0	25913,0
M	30681,8	28350,3	31588,6	30799,0
SD	6159,8	7780,9	6794,1	3836,5

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti IGF 2,5µg/ml	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti IGF 10µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti PDGF 250µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti PDGF 1000µg/ml**
	26065,0	22790,0	18727,2	11531,2
	35699,0	22140,0	27962,2	11014,7
	27284,0	25535,0	24963,8	37982,3
	26627,0	29205,0	28504,6	17945,8
	36268,0	34814,0	28597,4	31958,4
	15332,0	35626,0	24972,0	36900,1
	40486,0	28574,0	17850,8	7948,5
	28594,0			25989,3
M	29544,3	28383,4	24511,1	22658,7
SD	7850,6	5368,0	4188,2	11364,5

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti TGF-ß 0,5µg/ml anti EGF 2,5µg/ml anti IGF 2,5µg/ml anti PDGF 250µg/ml	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Überstand anti TGF-ß 5µg/ml anti EGF 10µg/ml anti IGF 10µg/ml anti PDGF1000µg/ml**
	16820,0	23056,0
	13837,0	33507,0
	22560,0	29454,0
	33520,0	18559,0
	26172,0	28370,0
	29236,0	13345,0
	20922,0	14569,0
	23597,0	20378,0
M	23333,3	22654,7
SD	5976,5	6808,4

Tabelle 3c: Rehydrierte, lyophilisierte, Thrombozyten, *Zellrest*. Antikörper gegen Wachstumsfaktoren. 3 Tage Fibroblasten Zellkultur in 48 well plates. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti TGF-ß 0,5µg/ml	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti TGF-ß 5µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti EGF 2,5µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti EGF 10µg/ml/ml**
	23442,0	27848,0	17723,0	22817,0
	20268,0	25942,0	27703,0	17435,0
	20713,0	22237,0	22336,0	25181,0
	34480,0	15605,0	39827,0	32463,0
	30789,0	34573,0	28346,0	28487,0
	24455,0	29135,0	33888,0	25715,0
	30453,0	29716,0	23428,0	32939,0
	28022,0	28227,0		24049,0
M	26577,7	26660,4	27607,3	20431,5
SD	5152,4	5659,8	7441,7	1816,2

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti IGF 2,5µg/ml	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti IGF 10µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti PDGF 250µg/ml**	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti PDGF 1000µg/ml**
	21879,0	27148,0	23977,6	13171,2
	29379,0	20317,0	27435,2	14341,6
	32032,0	40739,0	23307,0	22421,6
	36801,0	29100,0	26559,6	13137,6
	29909,0	36668,0	25162,5	21199,5
	26716,0	22893,0	21303,6	22483,8
	28525,0	24306,0	27105,8	28553,3
	40424,0	39433,0	20104,4	14624,9
M	30708,1	28825,5	20940,0	18741,7
SD	5785,8	6014,8	8795,8	5714,6

	FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti TGF-ß 0,5µg/ml anti EGF 2,5µg/ml anti IGF 2,5µg/ml anti PDGF 250µg/ml	**FK + Thrombin rehydr.lyophil.PL Zellrest anti TGF-ß 5µg/ml anti EGF 10µg/ml/ml anti IGF 10µg/ml anti PDGF 1000µg/ml**
	26327,0	16563,0
	19535,0	22226,0
	12708,0	24418,0
	18799,0	27417,0
	28328,0	17328,0
	26856,0	16682,0
	19598,0	20449,0
	18406,0	13395,0
M	21319,2	19809,3
SD	5345,3	4674,2

Tabelle 4: Rehydrierte, lyophilisierte, Thrombozyten. Hemmkörper gegen Integrinrezeptor GP IIb-IIIa (Adhäsionsinhibitor = AI). 3 Tage Fibroblasten Zellkultur in 48 well plates. Messung der Mitoserate durch Einbau von 3^{H}-Thymidin (cpm/ml).

	AI 0,02mg/ml	**AI 0,06mg/ml**	**AI 0,1mg/ml**	**AI 1,0mg/ml**	**AI 1,25mg/ml**	**AI 2,25mg/ml**
	32925,0	12844,0	39122,3	39357,7	6301,1	11635,6
	47900,0	23548,0	4412,9	15362,1	3918,5	4828,3
	31495,0	32414,0	11341,9	41313,1	13758,2	3091,4
	36411,0	16606,0	45517,0	2783,8	1415,0	2074,9
	22924,0	27759,0	43793,0	12547,0	8540,3	4731,6
	24553,0	35418,0	5133,4	7067,6	2075,5	1340,2
	21841,0	39467,0	n.d	n.d	1859,9	815,4
	39524,0	n.d	n.d	n.d	8826,3	942,7
	67470,0					
	30883,4					
	25530,6					
	32892,0					
	33562,8					
	n.d					
	n.d					
	n.d					
M	31486,8	28447,5	28837,4	19738,5	5836,8	3682,5
SD	7272,9	10117,9	19431,3	16548,7	4349,1	3581,9

10 Danksagung:

Ich bedanke mich besonders bei Herrn O. Univ .Prof. Dipl. Ing .Mag. Dr. Christian Noe, für seine Unterstützung bei vorliegender Arbeit und dafür, dass er es mir gestattet hat diese Untersuchungen als Diplomarbeit durchzuführen.

Bei Herrn O. Univ. Prof .Dr. Dontscho Kerjaschki bedanke ich mich für seine Anregungen und Anleitungen, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Reagentien und bei Frau Ursula Martin (MTA) für ihre technische Hilfestellung.

11 Curriculum Vitae

Florian Braun

Gloriettegasse 2

1130 Wien

0043-676-3118188

f.braun@gmx.at

Geb.:	29.05.1976
	Wien, Österreich
Staatsbürgerschaft	Österreich
Vater	Prof. Dr.med univ. Friedrich Braun, FA für Pädiatrie
Mutter	Mag. pharm. Monika Braun, Selbstständige Pharmazeutin

Schulbildung:

1982-1986	Volkschule der Erzdiözese Wien 1010 Wien Judenplatz 4
1986-1994	Öffentliches Schottengymnasium der Benediktiner in Wien
1994	Matura mit Fachbereichsarbeit (Chemie: Einfluss von 1,25DHVitD3 auf humane Coloncarzinomzellen)
Seit 1994	Studium der Pharmazie an der Uni Wien

Berufliche Erfahrung

1997-2001	T-mobile Austria (vormals max.mobil, im Bereich Aufbau und Regionalisierung des direct customer care)
1994-2002	Diverse Tätigkeiten im Bereich Logistik und Transport (Ferialpraktika)
1996-2007	Diverse Tätigkeiten im Bereich Eventmanagement
2005-2007	Wissenschaftliche Arbeit am AKH Wien
Seit 2001	Apotheke zu Weißen Engel 1010 Wien Bognergasse 9

Zusätzliche Qualifikationen

Führerschein	Klassen A und B uneingeschränkt
EDV	Alle MS Office Applikationen seit 1997, Ausbildung als Netzwerkadministrator auf NT4.0 und XP, SAP (R3), Hardware Management, html Programmierung