

Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier)
Sektion Sportorthopädie und Prävention
(Sektionsleiter: Prof. Dr. med. Thomas Tischer)

Vergleichende Untersuchung eines standardisiert hergestellten, allogenen Wachstumsfaktorextraktes

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Frank Sander
aus Rostock

Rostock, Januar 2021

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Tischer, Universitätsmedizin Rostock, Sektion Sportorthopädie & Prävention

PD Dr. Kirsten Peters, Universitätsmedizin Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie

Prof. Dr. Knut Beitzel, Köln, ATOS Orthoparc Klinik GmbH

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion von Thrombozyten	2
1.2 Funktion von Wachstumsfaktoren	3
1.3 Funktion von Zytokinen	5
1.4 Anwendungsmöglichkeiten von PRP	6
1.5 Klassifikation von PRP-Produkten	7
1.6 Problemstellung	8
2. Material und Methoden	10
2.1 Studiendesign und Probanden	10
2.2 Materialien	11
2.2.1 Geräte und Instrumente	11
2.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	12
2.2.3 Herstellersets	13
2.3 Durchführung der Probengewinnung	13
2.3.1 Abnahme und Verarbeitung von Vollblut	14
2.3.2 Gewinnung von PRP mit dem Arthrex® ACP Kit Series I	15
2.3.3 Gewinnung von PRP mit dem Harvest® SmartPReP-2 APC-20	16
2.3.4 Aufarbeitung der leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentrate des Instituts für Transfusionsmedizin der UMR	17
2.3.5 Herstellung des PRP-Pulvers	18
2.3.6 Aufarbeitung des Serums aus Blutsenkungsgeschwindigkeits-Sedimenten	19
2.4 Methoden zur Probenanalyse	19
2.4.1 Hämogramme der Probanden	19
2.4.2 Antigen - Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Sandwich-ELISA-Assay) mit ausgewählten Wachstumsfaktoren und Zytokinen	20
2.5 Statistische Auswertung	22
3. Ergebnisse	24
3.1 Hämogramme der Probanden	24
3.2 Wachstumsfaktor VEGF	25
3.3 Wachstumsfaktor FGF-2	28
3.4 Wachstumsfaktor PDGF-AB	31
3.5 Wachstumsfaktor TGF-β1	34

3.6 Wachstumsfaktor IGF-1	37
3.7 Wachstumsfaktor IGF-BP3	40
3.8 Zytokin IL-1 α	43
3.9 Zytokin IL-1 β	46
3.10 Zytokin IL-1RA	48
4. Diskussion	51
4.1 Diskussion der Methoden.....	52
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	53
5. Ausblick.....	58
Zusammenfassung	60
Literaturverzeichnis	63
Anhang.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Proben- und Methodenübersicht.	10
Abb. 2: Blutabnahme mit den Systemen von A) Arthrex® und B) Harvest®.	14
Abb. 3: Darstellung der verwendeten Arthrex ACP®-Doppelspritze.	15
Abb. 4: Trennung des PRPs mit Hilfe der kleineren Spritze im Inneren der Arthrex ACP®-Doppelspritze.	16
Abb. 5: Abziehen des PRPs mit einer Spritze aus der Plasmakammer des Harvest® Doppelkammer-Systems.	17
Abb. 6: Präparation der TK-Extrakte in verschiedenen Prozessphasen (Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Prinz, Fa. DOT GmbH Rostock, DEU)	19
Abb. 7: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs VEGF aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD- Range (^a berechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD- Messung).	26
Abb. 8: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs VEGF aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	28
Abb. 9: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs FGF-2 aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD- Range (^a berechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD- Messung).	29
Abb. 10: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs FGF-2 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	31
Abb. 11: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs PDGF-AB aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD- Range (^a berechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD- Messung).	32
Abb. 12: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs PDGF-AB aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	34
Abb. 13: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs TGF-β1 aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD- Range (^a berechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD- Messung).	35
Abb. 14: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs TGF-β1 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	37
Abb. 15: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-1 aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD- Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.	38

Abb. 16: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-1 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	40
Abb. 17: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-BP3 aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range (^a berechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung).	40
Abb. 18: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-BP3 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	43
Abb. 19: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 α aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.	44
Abb. 20: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 α aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	45
Abb. 21: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 β aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.	47
Abb. 22: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 β aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	48
Abb. 23: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1RA aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.	49
Abb. 24: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1RA aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.	50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Instrumente.	11
Tab. 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer.	12
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Herstellersets.	13
Tab. 4: Auflistung der verwendeten Verdünnungen der Proben mit Reagent Diluent in den jeweiligen Sandwich-ELISA-Assays.	22
Tab. 5: Datenübersicht der Hämogramme von den Probanden aus den EDTA- Monovetten.	24
Tab. 6: Datenübersicht zu den Zellzahlen in mmol/L von den Probanden P1 bis P5 des Vollbluts, PRP nach der Herstellungsmethode Arthrex und Harvest sowie der Thrombozytenkonzentrate TK1 bis TK5.	25
Tab. 7: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs VEGF aller Probengruppen.	26
Tab. 8: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs VEGF mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).	27
Tab. 9: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des WFs VEGF.	27
Tab. 10: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs FGF-2 aller Probengruppen.	29
Tab. 11: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs FGF-2 mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).	29
Tab. 12: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des WFs FGF-2.	30
Tab. 13: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs PDGF-AB aller Probengruppen.	32
Tab. 14: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs PDGF-AB mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).	33
Tab. 15: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des WFs PDGF-AB.	33
Tab. 16: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs TGF- β 1 aller Probengruppen.	35
Tab. 17: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs TGF- β 1 mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).	36
Tab. 18: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des WFs TGF- β 1.	36

Tab. 19: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs IGF-1 aller Probengruppen.	38
Tab. 20: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des WFs IGF-1.	39
Tab. 21: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs IGF-BP3 aller Probengruppen.	41
Tab. 22: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs IGF-BP3 mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).	41
Tab. 23: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des WFs IGF-BP3.	42
Tab. 24: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 α aller Probengruppen.	43
Tab. 25: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des Zytokin IL-1 α	45
Tab. 26: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 β aller Probengruppen.	46
Tab. 27: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des Zytokin IL-1 β	46
Tab. 28: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1RA aller Probengruppen.	48
Tab. 29: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des Zytokin IL-1RA.	49

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACD-A	<i>Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A</i> , Antikoagulans Citrat Dextrose Lösung A
ACP	<i>Autologous Conditioned Plasma</i> , Autologes Konditioniertes Plasma
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
BMP-2	<i>Bone-morphogenetic Protein-2</i> , knochenmorphogenetisches Proteine 2
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CSF	<i>Colony-Stimulating Factor</i> , Kolonie stimulierender Faktor
DOT	Dünnschicht- und Oberflächentechnologie GmbH
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ERY	Erythrozyten
Fa.	Firma
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor 2
fl	Femoliter (10 x E-15 l)
fmol	Femtomol (10 x E-15 mol)
Gy	Gray
HB	Hämoglobin
HKT	Hämatokrit
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
i. A.	im Anhang
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i> , insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IGF-BP3	<i>Insulin-like Growth Faktor-Binding Protein 3</i> , insulinähnliches wachstumsfaktorbindendes Protein 3
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-1α	<i>Interleukin-1 alpha</i>
IL-1β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-1RA	<i>Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
kD	Kilodalton
LEUK	Leukozyten
Max.	Maximum
MCH	mean corpuscular hemoglobin, mittleres Zellhämoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration, mittlere Zellhämoglobin-konzentration

MCV	<i>mean corpuscular volume</i> , mittleres Zellvolumen der Erythrozyten
mg	Milligramm
Min.	Minimum
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichts-Chirurgie
ml	Milliliter
mmol/L	Millimol pro Liter
MW	arithmetisches Mittel/Mittelwert
n	Anzahl
n. d.	nicht detektierbar
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
nl	Nanoliter
OD	optische Dichte
P	Proband
PAW	<i>Platelets, Activation and White blood cells</i> , Thrombozyten, Aktivierung und weiße Blutkörperchen
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF-AB	<i>Platelet-Derived Growth Factor-AB</i> , Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor-AB
PDGF-BB	<i>Platelet-Derived Growth Factor-BB</i> , Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor-BB
pg/ml	Pikogramm (10 x E-12g) pro Milliliter
PLRA	<i>Platelet count, Leukocyte presence, Red blood cell presence and use of Activation</i> , Thrombozytenzahl, Leukozytenpräsenz, Anwesenheit roter Blutkörperchen und Verwendung der Aktivierung
PRP	<i>Platelet-Rich Plasma</i> , Plättchen/Thrombozyten-reiches Plasma
RhD	Rhesus negativ
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor-Beta 1</i> , transformierender Wachstumsfaktor-Beta 1
THRO	Thrombozyten
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> , Tumornekrosefaktor
U/ Min.	Umdrehungen pro Minute
UMR	Universitätsmedizin Rostock
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WF	Wachstumsfaktor

1. Einleitung

Die Therapie als auch die Heilung von Krankheiten und Verletzungen sind wesentliche Tätigkeiten der Medizin. Der menschliche Körper besitzt das Vermögen, sich in einem gewissen Maße selbst zu heilen. Diese Fähigkeit der Regeneration von Gewebe (engl. Tissue) ist ein Gegenstand der heutigen medizinischen Forschung. Mit Hilfe von Tissue Engineering wird die Heilung von Gewebe inzwischen therapeutisch eingesetzt, aber noch stecken diese Bereiche in den Anfängen, obwohl in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte darin erzielt wurden (1,2).

Beim Ablauf der Geweberegeneration im Körper spielen Wachstumsfaktoren (WF) eine wichtige Rolle und sind in den letzten zwei Jahrzehnten immer mehr in den Fokus gerückt. Seit die Wundheilung wissenschaftlich besser verstanden ist, wurde auch die Bedeutung und das Potenzial des Tissue Engineering erkannt. Die Blutplättchen sind dabei maßgeblich am Prozess der Wundheilung von Verletzungen beteiligt. Neben ihrer bekannten Funktion in der Gerinnung und Heilung von Wunden hat sich zudem herausgestellt, dass die Thrombozyten durch die Ausschüttung von bioaktiven Proteinen den Heilungsprozess verschiedener Gewebe (u.a. Sehnen, Muskeln, Knorpel und Knochen) positiv beeinflussen können (3,4). Demzufolge ist die Verwendung von autologen Wachstumsfaktorpräparaten wie das sogenannte Plättchen-reiche Plasma (*Platelet-Rich Plasma/PRP*) in den letzten Jahren zunehmend populärer geworden. Durch Blutentnahme von 10 bis 60ml und der anschließenden Zentrifugation wird innerhalb kurzer Zeit ein Plättchen-reiches Plasma (PRP) gewonnen, das reich an Wachstumsfaktoren aus den Alpha-Granula der Thrombozyten ist. Mit der nachfolgenden gezielten Applikation wird versucht, die Heilung von beschädigten Geweben zu verbessern, wie z.B. bei Arthrose, Tendopathien oder Muskelverletzungen (5–14).

In der Sportmedizin und Orthopädie ist die Behandlungsmethode mit PRP-Injektionen inzwischen weit verbreitet, aber auch andere Fachbereiche wie die Ästhetische Chirurgie und die Dermatologie zeigen in letzter Zeit vermehrt Interesse für dessen Anwendung (13,15–20). Die Behandlungsmethode mit PRP entstand ursprünglich in der Zahnmedizin sowie Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG-Chirurgie) als Eigenblutbefüllung von Kieferzysten im Jahre 1960 zur Unterstützung der knöchernen Heilung. Seitdem ist der Einsatz von autologen Blutprodukten Bestandteil der zahnärztlichen Therapie. Im Jahre 1969 publizierte Schulte et al. die Verwendung von zentrifugiertem Eigenblut zur Füllung von Zysten, welche jedoch international kaum Aufmerksamkeit erlangte. Erst mit der Publikation von Yamamoto et al. 1996 und der publizierten Erstbeschreibung zur Herstellung von PRP nach Whitman et al. 1997 gewann die Verwendung mit Thrombozyten angereichertem Plasma das internationale Interesse zur Heilung von Knochendefekten (21–25).

Das PRP ist ein aus zentrifugiertem Eigenblut gewonnenes konzentriertes Blutplasma, angereichert mit einer erhöhten Thrombozytenzahl gegenüber dem Vollblut (26,27). Gängige PRP-Präparate unterscheiden sich durch unterschiedliche Konzentration an Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten sowie Wachstumsfaktorkonzentrationen, wodurch sich die

standardisierte Forschung und der klinische Einsatz anspruchsvoll gestalten (28). Über den klinischen Einsatz von PRP haben inzwischen eine Vielzahl an Studien aussichtsreiche Resultate bei der Behandlung von diversen muskuloskeletalen Pathologien berichtet (11,29,30). In der Fachliteratur bestehen jedoch weiterhin Diskrepanzen zu den PRP-Formulierungen und dessen Terminologie. Der Mangel an Charakterisierung und Standardisierung der Herstellungsmethoden erschwert eine exakte Klassifizierung der applizierten PRP Produkte (31–33). Aus 22 Studien im Bereich der Grundlagenforschung lieferte eine daraus erhobene Evaluation, dass lediglich 19% der Studien die Zellzahlen im PRP gemessen haben und nur 71% die tatsächlich erreichte Thrombozytenkonzentrationen aufzeigten (34).

Die individuelle Zusammensetzung und der Wachstumsfaktorgehalt von PRP-Produkten unterliegt dabei großen Schwankungsbereichen und ist unter anderem stark abhängig von der Herstellungs- und Anwendungsmethodik (35). In jeder einzelnen PRP-Applikation werden daher Präparate mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren appliziert (32,36–38). Diese in einer publizierten Metaanalyse erfassten Unterschiede könnten für die unterschiedlichen Resultate verantwortlich sein und fassen die Bedenken über Validität wie Reliabilität für die steigende klinische Anwendung von PRP zusammen (33). Eine generelle Bedingung für ein besseres Verständnis der Resultate von klinischen Studien ist es, über die Variationen der PRP Zusammensetzung zu berichten (26). Erforderlich ist es, jegliche Technologien unterschiedlicher Generationen zur PRP-Herstellung bezüglich der Konzentration von Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Wachstumsfaktoren zu charakterisieren. Das Internationale Olympische Komitee hat im Jahr 2010 mehr als 14 verschiedene kommerziell verfügbare PRP-Herstellungssets registriert (39). Hinsichtlich einer Studie, die 7 kommerzielle PRP-Herstellungsmethoden verglich (32), kann davon ausgegangen werden, dass weitere Formulierungen existieren.

1.1 Aufbau und Funktion von Thrombozyten

Die zellulären Bestandteile des menschlichen Blutes werden im Knochenmark aus hämatopoetischen, multipotenten Stammzellen gebildet. Die Erythrozyten (ERY), Leukozyten (LEUK) und Thrombozyten (THRO) entwickeln sich aus ihren jeweiligen Zelllinien der Erythro-, Leuko- und Thrombopoese (40,41).

Die morphologisch variabelste Zelle des Knochenmarks, der Megakaryozyt, differenziert sich durch Endomitose aus einem Megakaryoblast. Dieser zeichnet sich durch einen mehrfach segmentierten Kern sowie basophiles Zytoplasma aus. Sie sind die Vorläufer der Thrombozyten, welche durch Abschnürung von Megakaryozyten entstehen (40–42). Die dadurch entstandenen Thrombozyten haben ein hellblaues Zytoplasma mit Ausläufern und besitzen keinen Zellkern. Sie sind etwa 1 - 4 µm groß und haben ein Volumen von 5 - 8 fl (42,43). Die Lebensdauer von Thrombozyten beträgt etwa 8 - 11 Tage und ihr Abbau erfolgt unter anderem durch Phagozytose in der Milz, Leber sowie im Knochenmark (40–42). Durch den in der Leber gebildeten Wachstumsfaktor Thrombopoetin wird die Syntheserate der

Thrombozyten gesteuert (44). Der Referenzbereich der Thrombozytenkonzentration von älteren Kinder und Erwachsenen im Blut liegt zwischen 150 – 450 /nl (4,45,46). Das Proteom der Thrombozyten besteht aus 1507 Bestandteilen, von denen 262 phosphorylierte und 190 membranassoziierte Proteine sind (4). Die im Zentrum gelegenen feinen rötlich-blauen Granulakomponente setzen sich aus den Alpha-Granula und den kleinen elektronendichten Granula zusammen. Die dominierenden Alpha-Granula beinhalten verschiedene und plättchenspezifische Plasmaproteine wie Signalstoffe, Gerinnungs- und Wachstumsfaktoren. Diese Inhaltsstoffe werden bei der Degranulation über ein Kanälchensystem in die Umgebung abgesondert (42,43).

Thrombozyten besitzen auf ihrer Oberfläche eine Glycocalix, welche zahlreiche saure Mukopolysaccharide und Glykoproteine enthält. Die gesamte Plasmamembran beinhaltet zudem Phospholipide, Enzyme und verschiedenartige Rezeptoren zur Aktivierung der Thrombozyten, welche wesentlich für die Adhäsion und Aggregation sind (42,43). Durch die Bildung von chemotaktischen Faktoren und Wachstumsfaktoren sowie das Enthalten diverser Enzyme und Granulakomponenten werden Thrombozyten zu wichtigen Komponenten bei Entzündungsprozessen der Wundheilung, der Gefäßneubildung, der Blutstillung und scheinbar bei der Immunabwehr von Infektionen (4,40,41,43).

1.2 Funktion von Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind eine heterogene Gruppe von Polypeptiden, die sich bereits in sehr niedrigen Konzentrationen an Membranrezeptoren binden und dadurch eine schnelle Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie ein effektives Zellwachstum begünstigen und beeinflussen können (27,47,48). Sie verfügen über ein Molekulargewicht von 6-45 kD (3,27,47,49) und werden hauptsächlich von Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen produziert (3). Demnach sind sie bereits in der Embryonalentwicklung sowie postnatal wesentliche Regulatoren von Zellfunktionen (47,49).

Die Wachstumsfaktoren werden von anderen Polypeptidhormonen wie dem Wachstumshormon oder Insulin durch ihre Wirkweise charakterisiert (48). Denn die Wachstumsfaktoren werden räumlich sezerniert und wirken mittels intra-, para- und autokriner Prozesse (27,48). Man gruppiert sie durch ihre ähnlichen Strukturen und Funktionen in Familien, aber ihre Terminologie ist abweichend (3). Indem sie sich an spezifische Membranrezeptoren binden, welche auch als Glykoproteinrezeptoren bezeichnet werden und sich auf der Zelloberfläche befinden, lösen sie unterschiedliche Signalkaskaden oder Änderungen im Ionenstrom, Glukose- oder Aminosäuretransport in ihrer Zielzelle aus. Ebenfalls beeinflussen sie im Zellkern durch Aktivieren oder Deaktivieren von Genen, die DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese (3,27,48). Manche der Wachstumsfaktorrezeptoren weisen eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf, die durch Binden des Wachstumsfaktors eine Autophosphorylierung des Rezeptors sowie die Phosphorylierung intrazellulärer Substrate in Bewegung setzt und somit einen erwünschten biologischen Effekt erzielt (27,48).

Die Entdeckung der Wachstumsfaktoren begann mit dem 20. Jahrhundert durch Victor Hamburger, der an spinalen Motoneuronen und Nervenzellen forschte. Ebenso trugen Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen durch ihre intensive Forschung am Nerve Growth Factor (NGF) und dem Epidermal Growth Factor (EGF) zur Entdeckung weiterer Wachstumsfaktoren bei (48).

Die Unterscheidung des Ursprungs zwischen autogenen, xenogenen und rekombinanten Wachstumsfaktoren spielt ebenso eine wesentliche Rolle. Die Wachstumsfaktoren autogenen Ursprungs stammen vom Individuum selbst, wie z. B. bei der PRP-Herstellung. Hingegen werden die Wachstumsfaktoren xenogenen Ursprungs aus tierischen Organen oder Geweben gewonnen. Hierbei besteht die Gefahr einer Krankheitsübertragung von human pathogenen Tierseuchen, wie beispielsweise die Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), was die klinische Anwendung kritisch erscheinen lässt. Mithilfe von genetischen Verfahren lassen sich rekombinante Wachstumsfaktoren synthetisch herstellen. Dabei kommen Zellen oder Bakterien, meist *E. coli*, zur Anwendung, denen man das Gen des betreffenden Wachstumsfaktors hineintransferiert, um dessen Produktion und Sekretion zu übernehmen. Beispielsweise wurden die rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren Platelet-derived Growth Factor - BB (PDGF-BB) und Bone-morphogenetic Protein - 2 (BMP-2) in der Paradontaltherapie zur Behandlung von Knochendefekten erfolgreich eingesetzt (27).

Die folgenden Wachstumsfaktoren sind maßgeblich mit an der Wundheilung beteiligt:

Vascular endothelial Growth Factor (VEGF): Der WF wirkt bei der Angiogenese, der Lymphangiogenese und der Gefäßpermeabilität mit. Durch die exogene Applikation von VEGF in einzelnen experimentellen und klinischen Studien konnte eine beschleunigte Wundheilung aufgezeigt werden (3,27).

Fibroblast Growth Factor (FGF): Ist ein WF, der von verschiedenen Zelltypen gebildet wird, wie z.B. von Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Die Hauptvertreter und die am besten charakterisiertesten Mitglieder der Familie des WF FGF sind die Mitglieder FGF-1 (acidic FGF) und FGF-2 (basic FGF). Der WF FGF hat eine aktivierende Wirkung auf die Angiogenese sowie eine mitogene Wirkung auf Gefäßendothelzellen, Fibroblasten, Myoblasten, Chondrozyten und Osteoblasten. In experimentellen Tierversuchen konnte mit dem WF FGF-2 eine gestörte Wundheilung kompensiert sowie eine positive Wirkung bei bakteriell superinfizierten Wunden nachgewiesen werden (3,27,48).

Platelet-derived Growth Factor (PDGF): Wird überwiegend von Thrombozyten gebildet und kann variabel aus den Peptidketten A und/oder B zusammengesetzt sein. Die Isoform AB ist dabei die häufigste vorkommende Form in menschlichen Thrombozyten. Der WF PDGF setzt den Wundheilungsprozess in Gang und wirkt dabei mitogen sowie chemotaktisch auf Entzündungszellen, Mesenchymzellen, Fibroblasten und glatte

Muskelzellen. Außerdem aktiviert der WF die Produktion von Hyaluronsäure, Kollagenasen und Fibronectin (3,27,48).

Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1): Ist ein WF der am besten beschriebenen Isoform der gesamten TGF- β -Familie und hat eine antiinflammatorische Funktion in der Entzündungsreaktion. Zudem aktiviert es sehr effektiv die Kollagensynthese und unterbindet den Kollagenabbau bei der Wundheilung, wobei die Wundheilung durch einen Mangel an TGF- β 1 dadurch nicht beeinflusst wird (3,27,48).

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1): Ist in seiner Struktur mit dem Proinsulin verwandt, wirkt endokrin und ist an Heilungsprozessen beteiligt. Es stimuliert anabol die Glykogen-, Glykosaminoglykan- und Proteinsynthese. Zusätzlich aktiviert es die Proliferation von Fibroblasten und anderen Zelltypen, wobei dort ein Zusammenspiel mit den Wachstumsfaktoren PDGF und FGF erforderlich ist. Gebildet wird der WF IGF-1 vorwiegend in Leber, Thrombozyten, Lunge, Pankreas, Gehirn, Herz und Skelettmuskulatur. Ergänzend zu erwähnen ist, dass die Wachstumsfaktoren der IGF-Familie größtenteils an bekannten IGF-Bindungsproteinen gebunden sind und im Gewebe sowie in der Zirkulation nur in sehr geringer Menge in freier Form vorkommen (3,27,48).

Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGF-BP3): Gehört zu den sechs charakterisierten Insulin-like Growth Factor Bindungsproteinen (IGF-BP), die sich überwiegend im Serum des erwachsenen Menschen befinden und der Hauptträger des zirkulierenden IGF-Pools ist. Außerdem wird die biologische Halbwertszeit der WF IGFs durch die Existenz der Trägerproteine IGF-BPs stark verlängert. Ebenso besteht ein abhängiges Mengenverhältnis zwischen den WF IGFs und den IGF-BPs, wodurch stimulierende sowie inhibierende biologische Effekte bewirkt werden können (48).

1.3 Funktion von Zytokinen

Der Terminus Zytokine lässt sich aus dem Griechischen herleiten ($\kappa\upsilon\tau\omicron\varsigma$, Zyto, Zelle und $\kappa\iota\nu\epsilon\iota\nu$, Kinese, Bewegung) und bedeutet soviel wie „sich zwischen den Zellen bewegend“ (50). Zytokine sind kleine lösliche Polypeptide, regulieren wichtige biologische Prozesse wie Differenzierung, Zellwachstum, Apoptose, Angiogenese, Fetalentwicklung und stellen nach Einwirkung von Noxen die Homöostase wieder her (50–52). Sie werden von einer Vielzahl von Zellen produziert und wirken vorwiegend nahe der sezernierenden Zellen. Oft wirken mehrere Zytokine zusammen und ihre lokale Interaktion besteht vorwiegend aus einer kurzen Halbwertszeit (50,52). Die Mehrheit der Zytokine wird als Interleukine beschrieben, jedoch ist die Nomenklatur der Zytokine nicht einheitlich (50,52–54). Es sind mehr als 30 Zytokine bekannt und ihre Sekretion kann zudem von Zellen außerhalb des Immunsystems erfolgen (51,52). Der Wirkmechanismus eines Zytokins hängt einerseits von der Bindung in der Rezeptorstruktur ab und andererseits in der gemeinsamen Wirkung mit anderen Zytokinen. Sie können daher pleiotrop, redundant, synergistisch als auch antagonistisch wirken. Klassischerweise unterscheidet man Zytokine nach pro- und antiinflammatorischer

Wirkung und sie gehen vielseitige Wechselbeziehungen zu Wachstumsfaktoren ein, wie z.B. den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (51–54).

Von nahezu allen Zelltypen, inklusive Epithelzellen, Gefäßzellen, Hautkeratinozyten, Mesangiumzellen, Natürliche Killerzellen, B- und T-Zellen werden die zwei gemeinsam strukturell verwandten Zytokine – Interleukin-1 alpha und -1 beta ($IL-1\alpha$ und -1β) gebildet. Zugleich bestehen Wechselwirkungen zu Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Colony-Stimulating Factor (CSF) und Tumor Necrosis Factor (TNF). Dinarello stellte bereits 1988 fest, dass die Interleukin-1-Produktion durch Toxine, Antigene, Verletzungen und Entzündungsprozesse ausgelöst wird. Außerdem wirkt Interleukin-1 ($IL-1$) als Kofaktor bei der Aktivierung der körpereigenen Abwehr. Die Herstellung anderer Lymphokine wird erhöht und ruhende T-Zellen werden aktiviert. Es übernimmt zusammen mit IL-6 und TNF eine Schlüsselfunktion im Entzündungsprozess und bewirkt zudem die Proliferation von Zellen der Blutgefäße (48). Das Zytokin Interleukin-1 beta ($IL-1\beta$) hat ein Molekulargewicht von 17.000 Dalton wie das strukturell verwandte $IL-1\alpha$ und weist gleichartige Wirkmechanismen auf (48). Seckinger et al. haben 1987 einen Inhibitor entdeckt, der den biologischen Effekt von IL-1 blockiert (48). Das Zytokin Interleukin-1-Receptor Antagonist ($IL-1RA$) wirkt als Gegenpart von IL-1 und verhindert kompetitiv die Wirkung von $IL-1\alpha$ und $IL-1\beta$ am IL-1-Rezeptor. Es hemmt somit die Signalübertragung ins Zellinnere und die proinflammatorische Wirkung von IL-1 (55). Das Zytokin $IL-1RA$ wird von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Keratinozyten sowie anderen Epithelzellen sezerniert (48,55). Ohlsen et al. (1990) fand zudem heraus, dass die durch ein Endotoxin bewirkte Letalität bei Kaninchen durch einen spezifischen IL-Receptor Antagonist reduziert werden konnte (48).

1.4 Anwendungsmöglichkeiten von PRP

PRP wird seit längerem in verschiedenen Bereichen der Medizin angewendet, wie es oben bereits beschrieben wurde (13,15,16). In der Orthopädie und Sportmedizin wird die PRP-Anwendung bei einer Vielzahl an Pathologie eingesetzt. Am besten untersucht ist dabei die Behandlung von Patienten mit beginnender Gonarthrose. Hier zeigen mehrere prospektiv randomisierte Studien einen klaren Wirkungseffekt (56–60). Weitere Anwendungsfelder sind Muskelverletzungen oder Tendopathien, wie z. B. die Epicondylitis humeri lateralis oder das Patellaspatiensyndrom (61–63). Des Weiteren findet es intraoperativ bei chirurgischen Verfahren wie Sehnen- und Bandverletzungen, vorwiegend in der Kreuzbandchirurgie (64–68), sowie bei Sehnennähten in der Schulterchirurgie zunehmend Verwendung zur intraoperativen Stimulation der Heilung (69,70). Aber auch postoperativ wird versucht, durch Verbesserung der Heilung positiv auf das Outcome einzuwirken. Laut einer Studie von Mishra et al. (2006) ermöglicht der Einsatz von PRP mit einer hohen Konzentration an Wachstumsfaktoren nach Verletzungen einen schnelleren Wiedereinstieg in den Sport, wobei die Ergebnisse dieser Studie bei genauerer Betrachtung widersprüchlich erscheinen (66).

In der Zahnmedizin und der MKG-Chirurgie findet PRP wie eingangs erwähnt Anwendung, beispielsweise zur Förderung der Ossifikation knöcherner Hohlräume, zur Rekonstruktion

von Defekten im Unterkiefer, um die Blutstillung im Entnahmegebiet eines Knochentransplantates zu beschleunigen, als unterstützender Einsatz bei Sinusbodenaugmentationen oder Kieferspaltosteoplastiken, beim Verschluss von oronasalen Fisteln oder einer Mund-Antrum-Verbindung (9,12,14,25,71). Des Weiteren findet es Verwendung in der regenerativen Dermatologie und ästhetischen Medizin (17–20). Dort kommt es zur Anwendung in der Faltenbehandlung im Dekolletée, Hals und Gesicht, wie z. B. bei bläulich schimmernden Augenringen oder Augenfältchen. Ebenso bei Dehnungsstreifen, die durch eine Schwangerschaft entstanden sind, sowie bei Akne- und störenden Operationsnarben. Es wird außerdem zur Verdickung der Kopfhaut und zur Stimulierung der Haarfollikel bei Haarausfall auf der Kopfhaut eingesetzt (18–20). Daneben existieren noch unzählige weitere Anwendungsgebiete, die oftmals jedoch noch nicht ausreichend mit Studien belegt sind.

1.5 Klassifikation von PRP-Produkten

Im Laufe der Jahre wurden aufgrund der verschiedenen PRP-Herstellungsverfahren mehrere Klassifikationssysteme entwickelt, um den Prozess zu vergleichen und zu standardisieren (72). Bekanntlich können PRP-Präparate in vielen Bereichen variieren, einschließlich der Thrombozytenkonzentration, der Anzahl der weißen Blutkörperchen, des Vorhandenseins oder Fehlens von Erythrozyten sowie des Aktivierungsstatus des PRP-Präparats (73).

Mishra et al. erstellten daraufhin ein Klassifikationssystem für PRP-Präparate, das auf der vorhandenen Thrombozytenmenge basiert. Dabei liegt die Thrombozytenkonzentration entweder über dem fünffachen Ausgangswert des nativen Blutes oder unterhalb der fünffachen Thrombozytenkonzentration. Des Weiteren war das Vorhandensein von weißen Blutkörperchen sowie der Aktivierungsstatus der Thrombozyten von Bedeutung (74). Im Folgenden kategorisierten Dohan Ehrenfest et al. PRP mit Hilfe der Konzentration von Thrombozyten (pure platelet-rich plasma/P-PRP) und Leukozyten (leucocyte- and platelet-rich plasma/L-PRP) sowie der An- oder Abwesenheit von Fibrin (pure platelet-rich fibrin/P-PRF, leucocyte- and platelet-rich fibrin/L-PRF) (75).

Im Jahr 2012 stellten Delong et al. das Klassifizierungssystem für Thrombozytenzahl, Aktivierung und Anwesenheit weißer Blutkörperchen (PAW / *Platelets, Activation, White blood cells*) vor. Das PRP wurde mittels der Thrombozytenkonzentration klassifiziert, die vom Ausgangswert bis über 1,2 Millionen Thrombozyten pro Milliliter reichte, ebenso des Aktivierungsstatus der Thrombozyten sowie die Konzentration an Leukozyten und Neutrophilen, die als über oder unter dem Ausgangswert liegend beschrieben wird (76).

Die letzte bekannte Kategorisierung für PRP präsentierten Mautner et al. mit Hilfe des Klassifizierungssystems PLRA (*Platelet count, Leukocyte presence, Red blood cell presence, and use of Activation*). Dort wurde die absolute Thrombozytenkonzentration pro Mikroliter, die Erythrozytenkonzentration sowie die Konzentration von Leukozyten und Neutrophilen gemessen, ebenso die Aktivierung der Thrombozyten durch exogene Mittel (73).

Diese Klassifizierungssysteme bieten umfangreiche Informationen zur Verwendung von PRP-Präparaten in klinischen Studien sowie für dessen Planung zukünftiger PRP-Studien. Der Vergleich zwischen den Studien bleibt dabei weiterhin erschwert, weil es an einem einzigen vereinbarten standardisierten Klassifizierungssystem fehlt. Ursachen dafür sind ständig verändernde PRP-Herstellungsmethoden und -Ausstattung, in Folge dessen müssen bestehende Klassifizierungssysteme regelmäßig überarbeitet werden (72). Eine Zusammenfassung der oben benannten Klassifizierungssysteme ist in der folgenden Tabelle (s. Tab. 1) dargestellt.

Tab. 1: Zusammenfassung gängiger Klassifikationssysteme für PRP-Präparate (72).

Klassifikations-system	Messparameter und -kriterien
Mishra et al.	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytenkonzentration liegt entweder fünfmal über dem Ausgangswert oder unterhalb der fünffachen Aufkonzentration - Vorhandensein von weißen Blutkörperchen - Aktivierungsstatus der Thrombozyten
Dohan Ehrenfest et al.	<ul style="list-style-type: none"> - Konzentration von Thrombozyten - Konzentration von Leukozyten - Nicht- oder Vorhandensein von Fibrin
PAW	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytenkonzentration reicht vom Ausgangswert bis über 1,2 Millionen Thrombozyten pro Mikroliter - Aktivierungsstatus der Thrombozyten - Konzentration von Leukozyten und Neutrophilen, die über oder unter dem Ausgangswert beschrieben sind
PLRA	<ul style="list-style-type: none"> - absolute Thrombozytenkonzentration pro Mikroliter - Konzentration von Leukozyten und Neutrophilen - Konzentration der Erythrozyten - Aktivierung durch exogene Agenzien

1.6 Problemstellung

Die technisch einfache und schnelle Herstellung von PRP lässt auf den ersten Blick eine vielfältige und erfolgversprechende Anwendung erahnen. Bei genauerer Betrachtung und Auseinandersetzung mit der Herstellung sowie dem Einsatz von PRP werden jedoch unterschiedliche Probleme deutlich (36).

Zunächst stellt die Vielzahl kommerzieller Anbieter mit verschiedenen Herstellungssystemen von PRP eines der Probleme dar, sodass selbst bei prinzipiell gleichen Herstellungsprozessen die Konzentration an Thrombozyten, Leukozyten und deren biologisch aktive Moleküle abweichend sind (28,36). Leukozyten sind außerdem dafür bekannt, dass sie Auslöser für proinflammatorische Mediatoren sind. Besonders neutrophile Granulozyten zeigen hohe Konzentrationen an Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) auf (77). Eine hohe Konzentration an Leukozyten schüttet vermehrt Entzündungsmediatoren aus, was für die meisten Anwendungsbereiche jedoch nicht

gewünscht ist. PRP-Anwendungen mit erhöhter Leukozytenzahl an Sehnen zeigten eine Beeinträchtigung der Produktion der extrazellulären Matrix (78). Diesbezüglich gibt es zunehmend Hinweise, dass eine Reduzierung an Leukozyten im PRP, zumindest in der Verwendung bei vielen muskuloskelettalen Indikationen, eine wichtige Bedeutung gemäß der Wirkung hat (78,79). Zusätzlich beeinflussen patientenspezifische Faktoren wie Alter, Erkrankungen oder Gebrauch von Pharmaka die Funktion der Blutplättchen (36). Eine weitere Abweichung und Einflussnahme stellt der uneinheitliche Aktivierungsstatus der Thrombozyten der verschiedenen PRP-Produkte vor der Applikation dar. Offenbar besteht ein Zusammenhang beim Aktivierungsstatus der Thrombozyten und der ausgeschütteten WF-Konzentration (36,74,76).

Insofern wird deutlich, dass bislang kein einheitlicher Standard existiert und die dringend benötigte Standardisierung lediglich ansatzweise erfolgte. Die Schwierigkeit der Standardisierung von PRP bei etablierten Herstellungsmethoden stellt daher die Ausgangssituation dieser Studie dar. Zu Beginn richtete sich der Schwerpunkt der PRP-Herstellung auf die Anzahl der Thrombozyten und deren Wachstumsfaktorkonzentrationen, von denen angenommen wird, dass sie einen beschleunigenden Effekt auf die Gewebeheilung haben (80–94). Darüber hinaus werden Bestandteile mit antiinflammatorischer Wirkung im PRP betrachtet (36). Eine der Kernfragen bezüglich des PRPs war, welche Herstellungsmethode für den Heilungsprozess am effektivsten sein könnte. Ausschlaggebend für die medizinische Anwendung und Wirkungsweise von PRP sind die Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche sich im Blutplasma und in den Thrombozyten befinden. Durch das Poolen und Lyophilisieren mehrerer Thrombozytenkonzentrate könnte ein solches standardisiertes PRP-Produkt erzeugt werden (28).

Ein Bestreben der vorliegenden Studie war es, ein standardisiertes PRP-Produkt zu entwickeln, das in großen Mengen verfügbar, haltbar und in seinen Wachstumsfaktorkonzentrationen konsistent ist sowie die Variabilität der bestehenden PRP-Formulierungen beseitigt. Dadurch werden sowohl homogenere Ergebnisse als auch erweiterte neue Forschungs- und Behandlungshorizonte eröffnet. Dabei wurde ein standardisiertes Wachstumsfaktorpräparat aus allogenen, gepoolten Thrombozytenkonzentraten hergestellt, durch Lyophilisierung haltbar und lagerungsfähig gemacht sowie durch Bestrahlung sterilisiert (28).

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Probanden

Im Rahmen dieser Studie wurde ein gepooltes und lyophilisiertes Thrombozytenkonzentrat (PRP-Pulver) mit einzelnen Thrombozytenkonzentraten sowie von Probanden gewonnenem nativen Blut, Serum aus Blutsenkungsgeschwindigkeits-Sedivetten und PRP mittels zwei verschiedener Herstellungsverfahren (Arthrex und Harvest) verglichen. Somit gab es sechs Gruppen (s. Abb. 1).

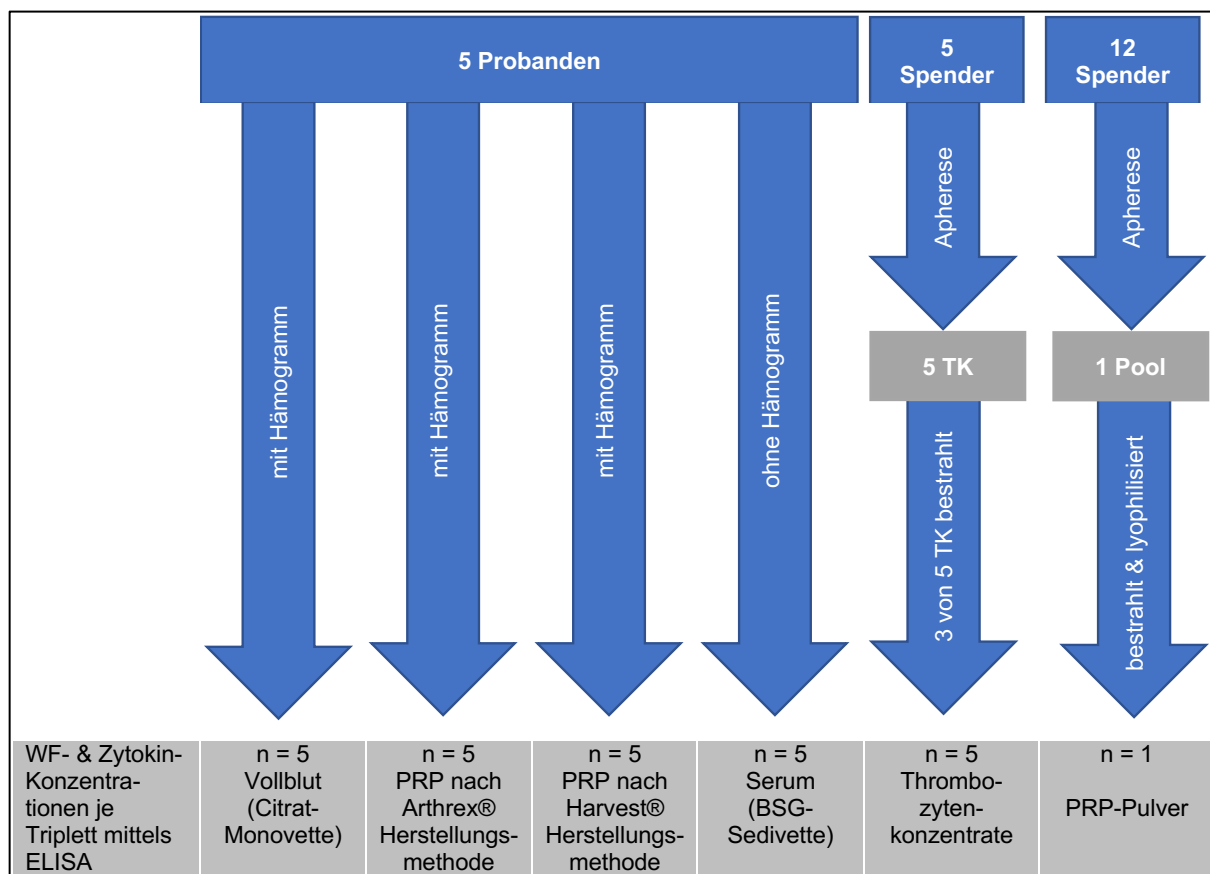


Abb. 1: Schematische Darstellung der Proben- und Methodenübersicht.

Das standardisiert hergestellte Wachstumsfaktorpräparat aus gepoolten Thrombozytenkonzentraten (PRP-Pulver) wurde von der Firma DOT GmbH (Rostock, DEU) bezogen. Die einzelnen Thrombozytenkonzentrate (TK) stellte das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock (UMR) für diese Studie bereit. Zudem wurden Blutproben von fünf männlichen Spendern gewonnen (Details siehe weiter unten). Alle Probanden haben eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an dieser Studie unterschrieben. Das Studienprotokoll wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (A 2016-0024, s. i.A.). Die Probanden sollten folgende Kriterien erfüllen: 1) männliches Geschlecht, 2) im Alter von 25 bis 35 Jahren, 3) mindestens vier sportliche Aktivitäten pro Woche und 4) gesunder körperlicher Zustand. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme fühlten sich

alle Probanden körperlich fit und psychisch gesund. Mindestens drei Stunden vor der Blutentnahme wurde kein Training absolviert.

Ein Teil des abgenommenen Blutes wurde direkt im Anschluss zu Thrombozyten-reichem Plasma (PRP/platelet-rich plasma) nach zwei etablierten Herstellungsmethoden aufbereitet und für die Untersuchungen verwendet. Ebenfalls wurde das Serum aus Blutsenkungsgeschwindigkeits-Sedimenten (BSG-Serum) für Analysen genutzt. Nach der Blutentnahme wurde ein Basis-Blutbild am Institut für Labormedizin der UMR aus den Proben bestimmt, die später zum Vergleich der enthaltenen korpuskulären Bestandteilen diente. Die übrigen Proben wurden kryokonserviert, um sie später für die Analyse der Wachstumsfaktoren mittels Sandwich-ELISA-Assays (Fa. R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK) zu verwenden.

Insgesamt wurden in dieser klinischen experimentellen Studie zwei Versuchsreihen durchgeführt. Die erste Versuchsreihe diente als Vorversuch und der Optimierung der Versuchsdurchführung. Die gewonnenen Daten aus der zweiten optimierten Versuchsreihe stellen die Grundlage dieser wissenschaftlichen Arbeit dar. Insgesamt ergaben sich daraus sechs verschiedene Probengruppen (s. Abb. 1).

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte und Instrumente

Sämtliche in dieser Arbeit gebrauchten Geräte und Instrumente sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (s. Tab. 2).

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Instrumente.

Gerätename	Geräteart	Hersteller
Hettich Tischzentrifuge Rotofix 32A	Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG. (Tuttlingen, DEU)
SmartPREP® 2 Zentrifuge	Tischzentrifuge	HARVEST Technologies GmbH (München, DEU)
AEG SANTO Kühl-Gefrierkombination	Kühl- und Gefrierschrank	Electrolux Hausgeräte GmbH – Markenvertrieb AEG (Nürnberg, DEU)
Skadi® SLIMVIP® ultra low temperature freezers 830 L -86°C	Ultra-Tiefkühlschrank (-45°C bis -86°C)	Skadi® Europe (Ede, NL)
Bioair Safeflow 1.2	Sicherheitswerkbank	Bioair Instruments s.r.l. (Siziano, IT)
Unimax 1010	Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DEU)
anthos Washer fluido2	Mikrotiterplatten Wascher	anthos Mikrosysteme GmbH (Friesoythe, DEU)

rosys anthos 2010	Photometer für Mikrotiterplatten	anthos Mikrosysteme GmbH (Friesoythe, DEU)
ThermoShaker TS1	Thermomixer	Biometra GmbH (Jena, DEU)
MR Hei-Standard	Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DEU)
Reax top	Vortexer/ Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DEU)
Analysewaage XA205 DualRange	Feinmesswaage	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, DEU)
Eppendorf Research®, Einkanal	Einkanal-Pipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, DEU)
Eppendorf Research®, 8-Kanal	Mehrkanalpipette 30 - 300 µl	Eppendorf AG (Hamburg, DEU)
Tranferpette® S-8	Mehrkanalpipette 300µl	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, DEU)
accu-jet® pro	Pipettierhelfer	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, DEU)
Reagenzreservoirs	Pipettierschalen	VWR International GmbH (Darmstadt, DEU)
Mikroplate, 96well, PS, F-BOTTOM, CLEAR	96-well Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, DEU)
Inkubations-/ Inaktivierungsbad	Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labor-technik mbH (Burgwedel, DEU)

2.2.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Die gesamten in dieser Studie verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer sind in der Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Puffer.

Substanz	Hersteller
DPBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) w/o: Ca and Mg, non-sterile	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, DEU)
DPBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) w/o: Ca and Mg, sterile filtered	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, DEU)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DEU)
Bovine Serum Albumin (BSA) Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DEU)
Stop Solutionen (2N H ₂ SO ₄)	Merck KGaA (Darmstadt, DEU)
Substrate Solution - 1:1 mixture of Colour Reagent A (H ₂ O ₂) and Colour Reagent B (Tetramethylbenzidine)	R&D System Europe Ltd. (Abington, UK)

Streptavidin-HRP (<i>Horseradish Peroxidase</i>)	R&D System Europe Ltd. (Abington, UK)
Wash Buffer	enthält aus 0,05% Tween® 20 in DPBS
Block Buffer	enthält 5% Tween® 20 in DPBS
Reagent Diluent	enthält 1% BSA in DPBS

2.2.3 Herstellersets

Folgende Herstellersets wurden zur PRP-Herstellung sowie zur Bestimmung der WF- und Zytokinkonzentrationen mittels Sandwich-ELISA-Assays verwendet (s. Tab. 4).

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Herstellersets.

Name	Hersteller
Arthrex ACP Kit Series I - ABS-10011	Arthrex GmbH (München, DEU)
SmartPreP2®2 ACP-20	HARVEST Technologies GmbH (München, DEU)
Human VEGF DuoSet® ELISA DY293B	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human FGF basic DuoSet® ELISA DY233	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human PDGF-AB DuoSet® ELISA DY222	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human TGF-β1 DuoSet® ELISA DY240	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human IGF-1 DuoSet® ELISA DY291	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human IGFBP-3 DuoSet® ELISA DY675	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human IL-1α/IL-1F1 DuoSet® ELISA DY200	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human IL-1β/IL-1F2 DuoSet® ELISA DY201	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)
Human IL-1ra/IL-1F3 DuoSet® ELISA DY280	R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK)

2.3 Durchführung der Probengewinnung

Die Blutentnahme von circa 52 ml erfolgte in einem Behandlungsraum der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der UMR. Aus einer Vene der Ellenbeuge des Probanden wurden unter Anwendung einer 23-Gauge-Nadel die jeweiligen Blutentnahmeröhrchen (3x Citrat-Monovetten, 1x Ethylendiamintetraessigsäure-Monovetten/EDTA-Monovetten und 2x Blutsenkungsgeschwindigkeits-Sedivetten (BSG-Sedivetten) der Fa. Sarstedt® AG & Co. KG, Nümbrecht, DEU) sowie die PRP-Herstellungssysteme nach Arthrex® (s. Abb. 2A) und Harvest® (s. Abb. 2B) befüllt.

Alle Proben, die zur Konzentrationsbestimmung der Wachstumsfaktoren und Zytokinen bestimmt waren, wurden innerhalb einer Stunde bei minus 80°C eingefroren. Der Einfrierprozess diente der Probenkonservierung und zur Lyse der enthaltenen korpuskulären Bestandteile, um deren Inhaltsstoffe vor Analyse freizusetzen.

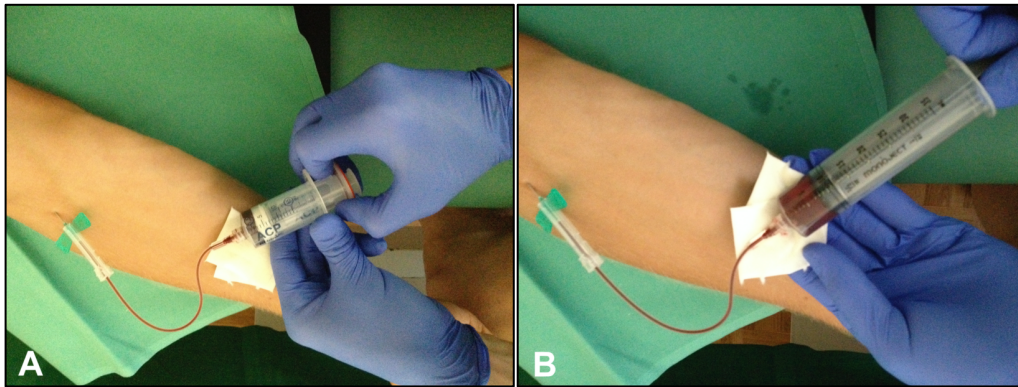


Abb. 2: Blutabnahme mit den Systemen von A) Arthrex® und B) Harvest®.

2.3.1 Abnahme und Verarbeitung von Vollblut

Es wurden pro Proband jeweils drei 2,9 ml Citrat-Monovetten und eine 2,6 ml EDTA-Monovette mit Blut befüllt. Die EDTA-Monovette ging direkt im Anschluss an die Abnahme ins Institut für Labormedizin der UMR zur Bestimmung eines Hämogramms. Die drei Citrat-Monovetten mit Vollblut wurden bei minus 80°C eingefroren und dienten später zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren (WF) und Zytokine durch Anwendung von Sandwich-ELISA-Assays als Vergleichsgruppe.

Die Verwendung von Citrat- statt EDTA-Vollblut als Vergleichsgruppe war eine Notwendigkeit, da beide patentierten Verfahren zur PRP-Herstellung ein Antikoagulans zur längeren Haltbarkeit des PRPs empfehlen. Im Herstellsset SmartPReP-2 von Harvest wird das Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A (ACD-A Lösung) vom Hersteller mitgeliefert und als Antikoagulans eingesetzt, welches Citrat enthält (95). Die Fa. Arthrex GmbH liefert kein Antikoagulans im Herstellsset mit und gibt auch keine Empfehlung des zu verwendenden Antikoagulans. Außer dass sie eines empfiehlt, sollte das PRP, welches Arthrex als Autologes Conditioniertes Plasma (ACP) bezeichnet, später als 30 Minuten zur Anwendung kommen (96). Da das PRP von Arthrex ACP in dieser Studie später als 30 Minuten zur Anwendung kam, wurde vorab das Antikoagulans Natriumcitrat zur längeren Haltbarkeit ausgewählt und hinzugefügt. Die Auswahl und die Verwendung des Antikoagulans Natriumcitrat erfolgte, weil es laut Hersteller Arthrex GmbH frei wählbar ist, Citrat enthält und zudem gleiche Ausgangsbedingungen zu den anderen Probengruppen schafft. Bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten mit Hilfe des Aphereseverfahren wird ebenfalls die ACD-A Lösung als Antikoagulans verwendet. Diese dient der Gerinnungshemmung sowie Konservierung von Blutprodukten (97,98). Bei den BSG-Sedivetten findet ebenfalls ein Citrat-Puffer (Tri-Natriumcitrat-Lösung) Anwendung (99). Durch die einheitliche Verwendung von Citrat als Antikoagulans wurden gleiche Ausgangsbedingungen zur Datenerhebung und deren Validität geschaffen.

2.3.2 Gewinnung von PRP mit dem Arthrex® ACP Kit Series I

Das PRP wurde unter Verwendung des Arthrex ACP Kit Series I (Fa. Arthrex GmbH, München, DEU) gemäß den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Das Arthrex ACP Kit Series I enthält die patentierte Arthrex ACP®-Doppelspritze (s. Abb. 3) sowie dazugehörige notwendige Einmalartikel.



Abb. 3: Darstellung der verwendeten Arthrex ACP®-Doppelspritze.

Vom Probanden wurden 15 ml venöses Blut mit der Arthrex ACP®-Doppelspritze über eine 23-Gauge-Nadel abgenommen. Dieses System ermöglicht nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 U/Min. den Überstand, gleich PRP, mit Hilfe der inneren kleinen Spritze abzusaugen und somit zu trennen (s. Abb. 4). Das somit gewonnene PRP kann laut Hersteller direkt zur medizinischen Anwendung genutzt werden. Sollte das gewonnene PRP (3 ml) zu einer späteren Anwendung kommen, empfiehlt der Hersteller die Thrombozytenaggregation mittels eines Antikoagulans zu hemmen. Dieses muss dann vor der Blutabnahme in die Arthrex ACP®-Doppelspritze aufgezogen werden (96).

In dieser Studie kam als Thrombozytenaggregationshemmer Natriumcitrat zur Anwendung, das zuvor in die ACP®-Doppelspritze aufgezogen wurde. Das je Proband gewonnene PRP aus einem Arthrex ACP Kit Series I wurde anschließend in mehrere 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert. Ein 1,5 ml Eppendorf Tube wurde zur Bestimmung der enthaltenen Zellzahlen ins Institut für Labormedizin der UMR gegeben. Die restlichen 1,5 ml Eppendorf Tubes wurden bei minus 80°C kryokonserviert, um sie später für die Sandwich-ELISA-Assays zu verwenden.

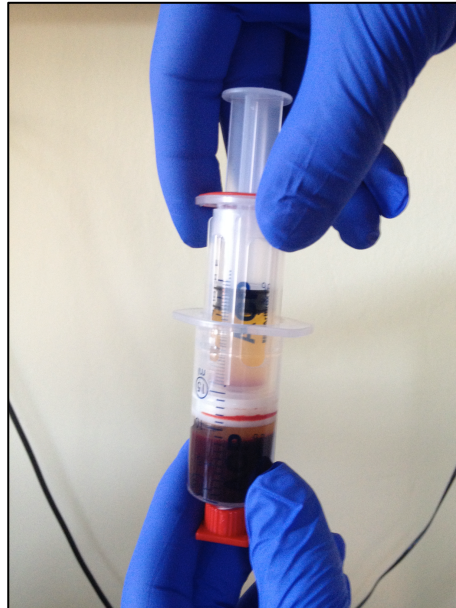


Abb. 4: Trennung des PRPs mit Hilfe der kleineren Spritze im Inneren der Arthrex ACP®-Doppelspritze.

2.3.3 Gewinnung von PRP mit dem Harvest® SmartPReP-2 APC-20

Gemäß den Anweisungen des Herstellers (Fa. Harvest Technologies GmbH, München, DEU) wurde das PRP unter Verwendung des Harvest SmartPReP-2-Systems hergestellt. Das PRP-Herstellungssset von Harvest SmartPReP-2 verwendet zur PRP-Aufbereitung ein steriles Prozess-Doppelkammer-System (s. Abb. 5). Es ist ein Zentrifugenbechereinsatz, der aus einer Blutkammer und einer Plasmakammer besteht. Des Weiteren enthält das Herstellungssset eine ACD-A Lösung als Antikoagulans sowie entsprechend erforderliche Einmalartikel (95).

Zu Beginn wurde mit Hilfe einer Spritze 1 ml ACD-A Lösung als Antikoagulans in die Plasmakammer gegeben. Anschließend wurden 20 ml Vollblut mit einer Spritze über eine 23-Gauge-Nadel vom Probanden abgenommen und danach in die Blutkammer des Prozess-Doppelbechers hineingegeben. Dann wurde der Prozess-Doppelbecher für etwa 14 Minuten bei einem zweistufigen Zentrifugations-Zyklus zentrifugiert (95).

Der erste Zentrifugationszyklus zentrifugierte das Blut bei 2500 U/Min. ± 150 bei einer Prozesszeit von ca. 1-3 Minuten. Das Plasma wird während der Zentrifugation automatisch vom Vollblut getrennt und tritt in die Plasmakammer über. Unter einer schwebenden Umfüllsperre werden der Großteil der Erythrozyten und Leukozyten am Übertritt gehindert. Der überwiegende Teil des Plasmas inklusive der Thrombozyten und des oberen Anteils des Buffy Coats (leukozyten- und thrombozytenreiche Fraktion) werden ohne Weiteres in die Plasmakammer überführt. Darauf folgte ein zweiter längerer Zentrifugationszyklus bei 2300 U/Min. ± 140 mit ca. 6-9 Minuten, bei welchem das in die Plasmakammer übergetretene Plasma schließlich in zellarmes- und zellreiches Plasma separiert wird. Im Anschluss wurde

mit einer weiteren Spritze das PRP aus der Plasmakammer aufgezogen, wobei ungefähr 3 ml PRP erzeugt wurden (s. Abb. 5) (95).

Das pro Proband gewonnene PRP aus einem Harvest SmartPRP-2 ACP-20 Herstellsset wurde anschließend in mehrere 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert. Hier wurde ebenfalls ein 1,5 ml Eppendorf Tube zur Bestimmung der enthaltenen korpuskulären Bestandteile ins Institut für Labormedizin der UMR gegeben. Die restlichen 1,5 ml Eppendorf Tubes wurden bei minus 80°C eingefroren, um sie später für die Sandwich-ELISA-Assays zu verwenden.



Abb. 5: Abziehen des PRPs mit einer Spritze aus der Plasmakammer des Harvest® Doppelkammer-Systems.

2.3.4 Aufarbeitung der leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentrate des Instituts für Transfusionsmedizin der UMR

Die Thrombozytenkonzentrate (TK) vom Institut für Transfusionsmedizin der UMR wurden mit Hilfe eines Aphereseverfahrens hergestellt und werden zugleich als Thrombozytapheresekonzentrate bezeichnet (100,101). Bei der Apherese werden durch maschinelles Auftrennen des Spenderblutes während einer Spende, Thrombozyten im Plasma oder in einem Plasmaersatzmittel (kolloidale Lösung) gesammelt (97). Über eine anschließende Leukozytenfiltration oder einen weiteren Aphereseschritt werden die Leukozyten aus dem TK entfernt (97). Die Anzahl an Thrombozyten in den TKs beträgt $2-4 \times 10^{11}$ in 200-300 ml Plasma. Dabei dürfen weniger als 1×10^6 Leukozyten pro Einheit enthalten sein (97,102).

Um die Übertragung vermehrungsfähiger und immunkompetenter Lymphozyten auf den Empfänger zu verhindern, können die TKs mit 30 Gy, jedoch an keiner Stelle unter 25 Gy,

gamma- oder röntgenbestrahlt werden (103). Diese Bestrahlung zeigt bisher keinerlei Komplikationen bei den Thrombozyten und hat somit keine Auswirkungen auf die Haltbarkeit (103). Auch hier muss laut Herstellervorschrift ein Antikoagulans zur Gerinnungshemmung angewendet werden (97,98). In Rücksprache mit dem Institut für Transfusionsmedizin der UMR wurde eine ACD-A Lösung als Antikoagulans in den von ihnen zur Verfügung gestellten TKs verwendet. Die genutzten TKs wurden gammabestrahlt und unmittelbar nach Erhalt bis zur Analyse bei minus 80°C kryokonserviert.

2.3.5 Herstellung des PRP-Pulvers

Das PRP-Pulver wurde von der Firma DOT GmbH (Rostock, DEU) für diese Studie zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Für dieses Produkt besteht ein Patent [Patentschrift: EP 2 813 232 A1], weshalb nur grob auf die Herstellungsschritte eingegangen werden kann.

Bei der Herstellung des PRP-Pulvers dienten leukozytendepletierte TKs, welche die Firma DOT GmbH vom Institut für Transfusionsmedizin der UMR bezogen. Die Erzeugung des PRP-Pulvers erfolgte aus zwölf TKs, die von verschiedenen Spendern stammen. Alle TKs enthielten circa 250 ml mit mindestens $2-4 \times 10^{11}$ Thrombozyten und weniger als $1-3 \times 10^6$ Leukozyten. Zur Entfernung von zellulären Komponenten wurde jedes der zwölf TKs einer Reihe von speziellen Waschschritten unterworfen. Es erfolgte die Verringerung des Plasmaproteingehalts auf ungefähr 30 mg/ml (28). Im Anschluss wurden die Suspensionen der zwölf TKs vereinigt (28), um eine größere Ausgangsmenge zu erhalten sowie durch das Poolen der Suspensionen spenderbedingte Schwankungen zu eliminieren (104). Dann wurde die gepoolte Suspension in 1 ml Portionen aliquotiert und gefrieretrocknet (s. Abb. 6), wodurch ein lyophilisiertes standardisiertes Wachstumsfaktorpräparat aus allogenen Thrombozytenkonzentraten in Form eines Pulvers entstand. Eine Deaktivierung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen erfolgte mit Hilfe von Gammasterilisation bei 30 Gy. Schließlich wurde bei einer Menge von 3 ml PRP einer herkömmlichen PRP-Herstellungsmethode eine große Einzelcharge mit 1000 möglichen Anwendungen aus einem Pool von 12 TKs hergestellt. Um es anwenden zu können, kann es in 3 ml Natriumchlorid resuspendiert werden (28).

Die Messung der Wachstumsfaktorkonzentrationen erfolgte aus einer Charge. Durch Resuspendieren des PRP-Pulvers mit einer Gesamtkonzentration von 10 mg/ml in einem Reagenz-Verdünnungsmittelpuffer (Reagent-Diluent Lösung) wurde dieses mit Hilfe des Sandwich-ELISA-Assays im Triplettestet (28).

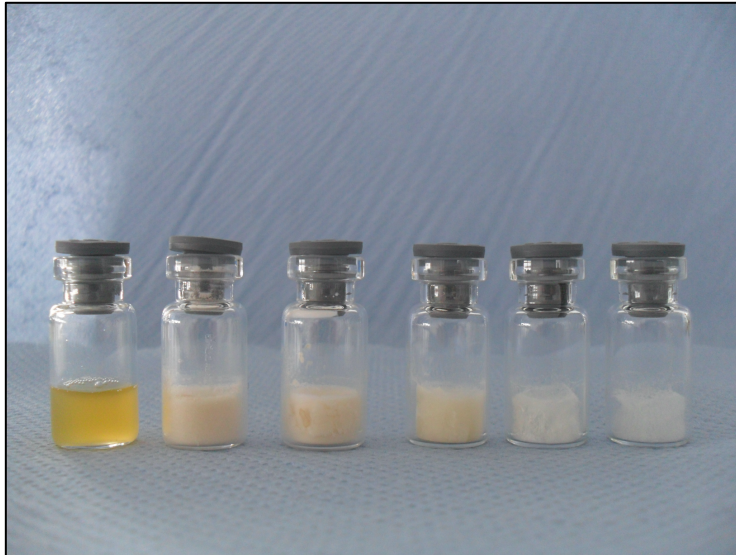


Abb. 6: Präparation der TK-Extrakte in verschiedenen Prozessphasen (Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Prinz, Fa. DOT GmbH Rostock, DEU)

2.3.6 Aufarbeitung des Serums aus Blutsenkungsgeschwindigkeits-Sedimenten

Zusätzlich erfolgte die Abnahme von zwei 2,8 ml BSG-Sedimenten bei den Probanden. Die BSG-Sedimenten enthalten laut Hersteller einen Citrat-Puffer (Tri-Natriumcitrat-Lösung) als Antikoagulant (99). Sorgfältig wurden die BSG-Sedimenten nach Abnahme für zwei Stunden verkehrtherum senkrecht in einem Ständer aufgestellt. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde der Serum-Überstand vorsichtig mit Hilfe einer Pipette in mehrere 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Anschließend ging ein 1,5 ml Eppendorf Tube zur Bestimmung enthaltener korpuskulärer Bestandteile ins Institut für Labormedizin der UMR. Die restlichen 1,5 ml Eppendorf Tubes wurden bei minus 80°C eingefroren, um sie später für die Sandwich-ELISA-Assays zu verwenden.

2.4 Methoden zur Probenanalyse

2.4.1 Hämogramme der Probanden

Im Institut für Labormedizin der UMR wurden mit Hilfe der Photometrie und der Durchflusszytometrie Hämogramme aus allen gewonnenen Proben der Probanden bestimmt. Diese beinhalteten zum einen Vollblut aus einer EDTA-Monovette und zum anderen ein 1,5 ml Eppendorf Tube mit Serum aus den BSG-Sedimenten sowie mit PRP, hergestellt mit dem Arthrex- bzw. Harvest-Verfahren. Folgende Parameter wurden im Vollblut ermittelt: Hämoglobingehalt (HB), Hämatokritwert (HKT), mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV), mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (MCHC), Anzahl der Erythro- (ERY), Leuko- (LEU) und Thrombozyten (THRO). In den PRP-Proben und im BSG-Serum wurden ausschließlich die Zellzahlen der ERY, LEU und THRO bestimmt.

2.4.2 Antigen - Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Sandwich-ELISA-Assay) mit ausgewählten Wachstumsfaktoren und Zytokinen

Mit Hilfe der immunologischen Methode des Antigen - enzymgekoppeltem Immunadsorptionstests (Sandwich-ELISA-Assay), ferner als ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bezeichnet, lassen sich Wachstumsfaktoren sowie Zytokine detektieren und dessen Konzentration nachweisen (53). Die Konzentrationsbestimmung wurde unter Verwendung von Sandwich-ELISA-Assays mit einem Kit-basierten System der Fa. R&D Systems Europe Ltd. (Abingdon, UK) mittels 96-well-Mikrotiterplatten und gemäß den Gebrauchsanweisungen nach „General ELISA Protocol“ des Herstellers umgesetzt. Die Durchführung erfolgte vier Wochen und 14 Monate nach der Probengewinnung.

Zuerst wurden die 96-well Mikrotiterplatten vorbereitet, indem jede Vertiefung, auch als Well bezeichnet, mit je 100 µl Capture-Antikörper verdünnt in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), beschichtet und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert (105–113). Der Capture-Antikörper, ein fixierter monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche des Wells, ermöglicht im Weiteren die Bindung der gesuchten Wachstumsfaktoren und Zytokine aus der zu prüfenden Probe (114).

Im Folgenden wurden die Platten mit Hilfe eines Mikrotiterplattenwaschers ausgespült. Dabei wurde der Inhalt der Wells aspiriert und anschließend dreimal hintereinander mit 300 µl Waschpuffer (Wash Buffer) gespült und verworfen. Nach dem Waschvorgang erfolgte schonend das Ausklopfen der Platten, um Reste des Waschpuffers zu entfernen (105–113). Danach wurden die Wells der 96-well-Mikrotiterplatte durch Zugabe von 300 µl des Reagent Diluent, einer stabilisierenden polypeptidhaltigen Lösung, blockiert (105–111). Bei einigen der Kit-basierten Systemen von R&D-Systems wird zum Blockieren auf die Verwendung eines Blockpuffers (Blocking Buffer) verwiesen, welcher an Stelle des Reagent Diluent angewendet wurde (112,113). Nach mindestens einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterplatten, wie oben beschrieben, mit dem Waschpuffer erneut gewaschen (105–113).

Im nächsten Schritt wurden die Verdünnungsreihe sowie die Proben einer nachweisbaren Konzentration des gesuchten Wachstumsfaktors oder Zytokins auf die 96-well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Je 100 µl der Verdünnungsreihe des getesteten Wachstumsfaktors oder Zytokins, auch als Standard bezeichnet, wurden in die Vertiefungen pipettiert. Sie diente am Ende als Referenzwert und reichte von der Konzentration 2000 pg/ml bis 31,2 pg/ml. Danach wurden je 100 µl Probe, verdünnt mit Reagent Diluent (s. Tab. 5), in die Wells hineingegeben. Drei Wells der 96-well-Mikrotiterplatten enthielten ausschließlich Reagent Diluent und dienten als Leerwert. Die bei minus 80°C gelagerten kryokonservierten Proben wurden zuvor mit Hilfe eines Inkubators auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Platten mit einer Klebefolie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Mikrotiterplatten abermals wie oben dargestellt mit dem Mikrotiterplattenwascher gespült. Dann folgten 100 µl je Well des Detektionsantikörpers, verdünnt in Reagent Diluent (105–113). Dieser polyklonale Antikörper sollte an den zuvor gebundenen Wachstumsfaktor oder Zytokin binden (114). Die Mikrotiterplatten werden erneut mit einer Folie zugeklebt und für

zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgt erneut der bereits beschriebene Waschvorgang mit dem Mikrotiterplattenwascher (105–113).

Im Anschluss dessen wurden 100 µl Streptavidin-HRP (*Horseradish Peroxidase*) in die Vertiefungen pipettiert und mit einer Klebefolie abgedeckt. Nach einer 20-minütigen Einwirkzeit ohne Lichteinwirkung bei Raumtemperatur wurde anschließend das Streptavidin-HRP mittels Waschpuffer, wie oben dargestellt, ausgespült (105–113).

Als nächstes wurden 100 µl einer Substratlösung (*Substrate Solution*) pro Well hineingegeben, welches aus einer 1:1 Mixtur von Color Reagent A und B besteht (105–113). Das darin enthaltene Tetramethylbenzidine löst eine bläuliche Farbreaktion aus, die proportional zu der Menge an vorhandener Wachstums- oder Zytokinkonzentration ist (114). Die 96-well-Mikrotiterplatten wurden mit der enthaltenen Substratlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Lichteinwirkung inkubiert. Direkt im Anschluss wurden 50 µl einer Stopplösung (*Stop Solution*) zu jeder Vertiefung hinzugefügt und danach die Platte vorsichtig geklopft, um eine sorgfältige Durchmischung zu garantieren (105–113). Infolgedessen verfärbte sich der Inhalt gelblich.

Am Ende wurde mit Hilfe eines Photometers für Mikrotiterplatten die optische Dichte (OD) aller Vertiefungen der 96-well-Mikrotiterplatten, bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm, gemessen und in einer dazugehörigen Software erfasst. Durch Subtraktion der Wellenlängen 540 nm von 450 nm wird ein optischer Fehler in der Messung korrigiert (105–113). Die daraus berechneten Messwerte wurden anschließend in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel zur weiteren Auswertung und Darstellung übertragen.

Folgende Wachstumsfaktorkonzentrationen wurden im Vollblut aus den Citrat-Monovetten, PRP-Präparate entsprechend den Herstellungsmethoden nach Arthrex und Harvest, TKs, PRP-Pulver sowie im Serum aus den BSG-Sedivetten dreifach gemessen: VEGF, FGF-2, PDGF-AB, TGF-β1, IGF-1 und IGF-BP3. Des Weiteren wurden die Konzentrationen folgender Zytokine bestimmt: IL-1α, IL-1β und IL-1RA.

Mindestens zwei 96-well-Mikrotiterplatten wurden zur Konzentrationsbestimmung eines Wachstumsfaktors oder Zytokins verwendet. Auf einer Platte waren zwei Verdünnungsreihen mit je zwei Wells pro Verdünnungskonzentration von 2000 pg/ml bis 31,2 pg/ml angelegt sowie der Leerwert mit drei Wells. Jede Probe wurde als Triplet auf einer 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Außerdem wurden verschiedene Verdünnungen zur Bestimmung der enthaltenen Zytokine und WF-Konzentrationen verwendet. Die Proben wurden zum Teil in unterschiedlichen Verhältnissen mit Reagent Diluent verdünnt und auf die Platten aufgetragen (s. Tab. 5). Die Biologisch-Technischen Assistentinnen Stefanie Adam und Anne Wolf unterstützten die Durchführung der Sandwich-ELISA-Assays.

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Verdünnungen der Proben mit Reagent Diluent in den jeweiligen Sandwich-ELISA-Assays.

ELISA	
VEGF	1:2 Verdünnung bei allen Proben
FGF-2	1:2 Verdünnung bei allen Proben
TGF- β 1	1:40 Verdünnung bei allen Proben
PDGF-AB	1:20 Verdünnung bei Vollblut, TK, Serum (BSG) und WF-Extrakt 1:30 Verdünnung bei PRP nach Harvest- und Arthrex-Methode
IGF-1	1:2 Verdünnung bei allen Proben
IGF-BP3	1:20 Verdünnung bei allen Proben
IL-1 α	1:5 Verdünnung bei allen Proben
IL-1 β	1:5 Verdünnung bei allen Proben
IL-1ra	1:5 Verdünnung bei allen Proben

2.5 Statistische Auswertung

Die deskriptive Datenanalyse und die schließende Statistik erfolgten zum einen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel Version 15.33 (Fa. Microsoft Corp., Redmond, USA) und zum anderen mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics 20.0 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA).

Die gemessenen Daten der 96-well-Mikrotiterplatten im Photometer für Mikrotiterplatten wurden in eine Microsoft® Excel-Datei übertragen und auf ihre Plausibilität überprüft. Mit dem anschließend errechneten arithmetischem Mittel (MW) aus den zwei gemessenen OD-Werten des jeweils verdünnten Standards und dem davon subtrahierten Leerwerts (Blank) ließ sich mit Hilfe entsprechender Excel-Funktionen eine graphische Standardkurve mit steigender Konzentration darstellen. Anhand der daraus resultierenden Funktionsgleichung konnte im Verlauf die WF-Konzentrationsmenge in Pikogramm pro Milliliter (pg/ml) errechnet und auf deren Evidenz geprüft werden.

Die Proben wurden in Triplets gemessen. Aus den drei gemessenen OD-Werten einer Probe wurde ein MW gebildet und mit dem Leerwert (Blank) subtrahiert. Dieser Wert wurde für die Variable "x" in die zuvor errechnete Funktionsgleichung aus der graphischen Standardkurve eingesetzt. Das Resultat wurde anschließend mit dem jeweiligen verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert und ergab die enthaltene WF-Konzentrationsmenge in pg/ml. Mit den fünf errechneten WF-Konzentrationsmengen einer Probengruppe wurde anschließend eine deskriptive Statistik durchgeführt sowie diese mit den anderen Probengruppen des jeweiligen Wachstumsfaktors oder Zytokins grafisch dargestellt. Des Weiteren wurden die Daten konvertiert und für die abschließende statistische Analyse in das Statistikprogramm SPSS 20.0 überführt. Dort wurden die Daten der Probengruppen des jeweiligen Wachstumsfaktors und Zytokins auf signifikante Unterschiede mit ungepaarten t-Tests sowie gepaarten Mehrfachvergleichen unter Verwendung der Varianzanalyse (Analysis of Variance/ANOVA) mit dem Bonferroni-Post-

hoc-Test hin untersucht. Die Festlegung des Signifikanzniveaus erfolgte mit signifikant bei $p < 0,05$ und hoch signifikant bei $p < 0,01$. Abschließend wurden diese Ergebnisse auf deren Bedeutung geprüft, bewertet und interpretiert.

3. Ergebnisse

3.1 Hälogramme der Probanden

Von den fünf Probanden mit einem Alter von 27 bis 34 Jahren (MW $31 \pm 3,21$ Jahren) wurde jeweils aus dem Vollblut einer EDTA-Monovette, aus den hergestellten PRPs nach Arthrex ACP und Harvest SmartPREP-2 sowie aus dem Serum der BSG-Sedivetten ein Hälogramm im Institut für Labormedizin der UMR erstellt.

Die Hälogramme der fünf Probanden dieser Studie lagen im Normbereich und wiesen annähernd vergleichbare Werte auf. Krankheiten wie systemische Erkrankungen, Infektionskrankheiten und Anämien ließen sich aus diesen Hälogrammen nicht erkennen (Tab. 6).

Tab. 6: Datenübersicht der Hälogramme von den Probanden aus den EDTA-Monovetten.

	Einheit	P1	P2	P3	P4	P5	Referenzbereich*
HB	mmol/L	9,90	9,10	9,90	10,20	9,30	8,6-12
HKT	%	48	42	47	48	45	40-51
ERY	$10^{12}/L$	5,27	4,78	5,55	5,34	4,99	4,5-5,5
MCV	fl	91,80	88,50	84,50	89,10	91,00	83-93
MCH	fmol	1,88	1,90	1,78	1,91	1,86	1,55-1,9
MCHC	mmol/L	20,50	21,50	21,10	21,40	20,50	18,5-22,5
LEUK	$10^9/L$	6,58	6,64	6,92	6,48	6,19	4-9
THRO	$10^9/L$	209	242	243	221	200	150-450

*Verwendeter Referenzbereich des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der UMR (46).

Bei der PRP Herstellungsmethode nach Arthrex wurden die Thrombozyten um den Faktor 0,97 ($217 \pm 27,81$ vs. $223 \pm 19,3 \times 10^9/L$) und die Leukozyten um den Faktor 0,25 ($1,63 \pm 0,97$ vs. $6,56 \pm 0,26 \times 10^9/L$) zur Referenzgruppe Vollblut gesenkt. Die Erythrozyten ließen sich deutlich um den Faktor von 0,008 ($0,04 \pm 0,02$ vs. $5,19 \pm 0,3 \times 10^{12}/L$) zum Vollblut reduzieren (s. Tab. 7).

Die Thrombozyten im PRP nach der Harvest-Methode wurden signifikant um den Faktor 4,0 ($901 \pm 66,27$ vs. $223 \pm 19,3 \times 10^9/L$) und die Leukozyten um den Faktor 2,4 ($15,96 \pm 4,09$ vs. $6,56 \pm 0,26 \times 10^9/L$) zum Vollblut aufkonzentriert. Außerdem enthielt das PRP nach Harvest SmartPREP-2 nur knapp ein Fünftel an Erythrozyten ($0,91 \pm 0,32$ vs. $5,19 \pm 0,30 \times 10^{12}/L$) im Vergleich zum Vollblut (s. Tab. 7).

Im Weiteren wird deutlich, dass die PRP-Aufbereitung nach Harvest SmartPREP-2 eine 4,15-fach erhöhte Thrombozytenanreicherung aufzeigte als die nach Arthrex ACP ($901 \pm 66,27$ vs. $217 \pm 27,81 \times 10^9/L$) (s. Tab. 7). Gegenüber beiden herkömmlichen PRP-Herstellungsmethoden nach Arthrex ACP und Harvest SmartPREP-2 weisen die TKs ($1310 \pm$

45,97 $10^9/L$) eine höhere Thrombozytenanreicherung und eine deutlich niedrigere Leukozytenzahl ($< 0,001 \times 10^9/L$) auf (s. Tab. 7).

Im abpipettierten Serum der BSG-Sedivetten, die vorab 2 Stunden in senkrechter Position standen, waren mit dem Messgerät keine Zellzahlen nachweisbar.

Tab. 7: Datenübersicht zu den Zellzahlen in $mmol/L$ von den Probanden P1 bis P5 des Vollbluts, des PRPs nach der Arthrex- und Harvest-Herstellungsmethode, des BSG-Serums, der Thrombozytenkonzentrate TK1 bis TK5 sowie des PRP-Pulvers.

		P1	P2	P3	P4	P5	MW \pm SD	Faktor*
Vollblut	ERY $10^{12}/L$	5,27	4,78	5,55	5,34	4,99	5,19 \pm 0,30	
	LEUK $10^9/L$	6,58	6,64	6,92	6,48	6,19	6,56 \pm 0,26	
	THRO $10^9/L$	209	242	243	221	200	223 \pm 19,30	
Arthrex ACP	ERY $10^{12}/L$	0,04	0,02	0,05	0,02	0,05	0,04 \pm 0,02	0,008x
	LEUK $10^9/L$	1,01	1,04	1,89	0,97	3,22	1,63 \pm 0,97	0,25x
	THRO $10^9/L$	179	234	247	198	227	217 \pm 27,81	0,97x
Harvest	ERY $10^{12}/L$	1,19	0,55	0,83	1,29	0,68	0,91 \pm 0,32	0,18x
Smart	LEUK $10^9/L$	16,2	15,2	11,3	14,6	22,5	15,96 \pm 4,09	2,4x
PRReP-2	THRO $10^9/L$	847	915	997	830	915	901 \pm 66,27	4,0x
BSG- Serum	ERY $10^{12}/L$	0	0	0	0	0	0 \pm 0	0x
	LEUK $10^9/L$	0	0	0	0	0	0 \pm 0	0x
	THRO $10^9/L$	0	0	0	0	0	0 \pm 0	0x
		TK1	TK2	TK3	TK4	TK5	MW \pm SD	Faktor*
TK	ERY $10^{12}/L$	0	0	0	0	0	0 \pm 0	0x
	LEUK $10^9/L$	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001 \pm <,001	0x
	THRO $10^9/L$	1376	1288	1299	1334	1256	1310 \pm 45,97	5,9x
PRP-Pulver aus einer Charge (n = 1)							MW	Faktor*
PRP- Pulver	ERY $10^{12}/L$			0			0	0x
	LEUK $10^9/L$			0			0	0x
	THRO $10^9/L$			0			0	0x

*Faktor der Verdünnung / Aufkonzentration zur MW-Konzentration des Vollbluts.

3.2 Wachstumsfaktor VEGF

In der Versuchsreihe des WF VEGF wurden deutlich erhöhte WF-Konzentrationen (MW \pm SD in pg/ml) im PRP-Pulver (1722 \pm 50 pg/ml) und im TK (1087 \pm 535 pg/ml) gemessen (s. Tab. 8, Abb. 7). Dabei weist das PRP-Pulver eine statistisch hoch signifikante hohe WF-Menge im Vergleich zu den anderen Proben Gruppen ($p < 0,001$) auf, mit Ausnahme von der Gruppe der TKs, die keine eindeutige Signifikanz ($p = 0,057$) aufweist (s. Tab. 9, Abb. 7).

Tab. 8: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs VEGF aller Probengruppen.

Probengruppe	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	574	364	723	± 147
Arthrex ACP (n = 5)	222	126	378	± 99
Harvest SmartPReP-2 (n = 5)	528	233	775	± 233
TK (n = 5)	1087	528	1854	± 535
PPR-Pulver (n = 1)	1722	1722	1722	± 50 ^a
Serum aus BSG (n = 5)	174	0	389	± 170

^aBerechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung.

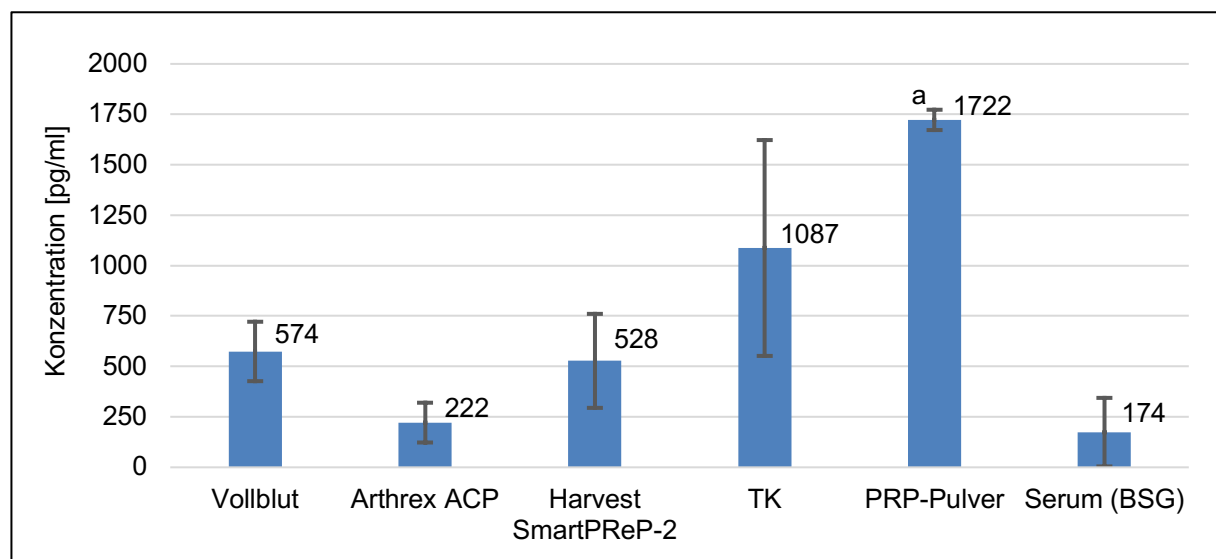


Abb. 7: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs VEGF aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range (^aberechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung).

Im Vergleich des TK (1087 ± 535 pg/ml) zur Referenzgruppe Vollblut (574 ± 147 pg/ml) zeigte sich dagegen in der WF-Messung eine nicht signifikante Erhöhung ($p = 0,114$) des WF VEGF. Dafür präsentieren die anderen paarweisen Mehrfachvergleiche einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen dem TK und dem Serum aus den BSG-Sedimenten (174 ± 170 pg/ml) sowie zwischen dem TK und dem PRP nach Arthrex (222 ± 99 pg/ml) (s. Tab. 10). Ferner zeigte sich kein eindeutig signifikanter Unterschied ($p = 0,077$) zwischen dem TK und dem PRP nach Harvest (528 ± 233 pg/ml) (s. Tab. 10, Abb. 7).

Beim PRP der Herstellungsmethode nach Harvest (528 ± 233 pg/ml) zeigte die VEGF Konzentrationsmessung keine signifikante Erhöhung ($p > 0,999$) gegenüber dem Vollblut (574 ± 147 pg/ml). Indes war die WF-Menge in der PRP-Aufbereitungsmethode nach Arthrex (222 ± 99 pg/ml) um einen nicht signifikanten Faktor von 2,59 ($p = 0,630$) zum Vollblut (574 ± 147 pg/ml) reduziert. Das BSG-Serum (174 ± 170 pg/ml) zeigte ebenfalls eine Verringerung der VEGF WF-Konzentration zum Vollblut (574 ± 147 pg/ml) ohne bestehender Signifikanz ($p = 0,371$) (s. Abb. 7, Tab. 10).

Tab. 9: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs VEGF mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).

VEGF		PRP-Pulver = 1722 pg/ml (n=1)			
Probengruppen (n=5)	T	Signifikanz/ p-Wert (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
Vollblut	-17,417	<,001 ^a	-1147,62	-1330,56	-964,68
Harvest SmartPRP-2	-11,456	<,001 ^a	-1194,29	-1483,74	-904,83
Arthrex ACP	-34,007	<,001 ^a	-1500,32	-1622,81	-1377,83
TK	-2,652	,057	-634,88	-1299,56	29,80
Serum BSG	-20,360	<,001 ^a	-1547,67	-1758,73	-1336,62

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < ,01$

Tab. 10: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n = 5) des WFs VEGF.

Abhängige Variable		VEGF in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	46,67	>,999	-564,48	657,83
	Arthrex	352,70	,630	-212,27	917,67
	TK	-512,74	,114	-1123,89	98,42
	Serum	400,05	,371	-164,92	965,02
Harvest	Vollblut	-46,67	>,999	-657,83	564,48
	Arthrex	306,03	>,999	-258,93	871,00
	TK	-559,41	,077	-1170,56	51,75
	Serum	353,38	,625	-211,58	918,35
Arthrex	Vollblut	-352,70	,630	-917,67	212,27
	Harvest	-306,03	>,999	-871,00	258,93
	TK	-865,44	<,001 ^a	-1430,41	-300,47
	Serum	47,35	>,999	-517,62	612,32
TK	Vollblut	512,74	,114	-98,42	1123,89
	Harvest	559,41	,077	-51,75	1170,56
	Arthrex	865,44	<,001 ^a	300,47	1430,41
	Serum	912,79	<,001 ^a	347,82	1477,76
Serum	Vollblut	-400,05	,371	-965,02	164,92
	Harvest	-353,38	,625	-918,35	211,58
	Arthrex	-47,35	>,999	-612,32	517,62
	TK	-912,79	<,001 ^a	-1477,76	-347,82

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < ,01$

Im Weiteren zeigten sich interindividuelle Unterschiede in der VEGF-Konzentration bei P1 bis P5 (s. Abb. 8). Bei P1 und P5 wurde der WF VEGF der PRP-Herstellungsmethode nach Harvest SmartPRP-2 in Bezug auf dessen Referenz Vollblut leicht aufkonzentriert. Der P2 zeigte keinen wesentlichen Konzentrationsunterschied. Bei P3 und P4 hingegen wurde VEGF in keiner der herkömmlichen PRP-Herstellungsmethoden sowie in dessen Serum (BSG) zum Vollblut aufkonzentriert. Die Konzentrationen im PRP der Aufbereitungsmethode nach Arthrex ACP zeigte hingegen bei P1, P2 und P5 annähernd gleiche Mengen im Verhältnis zu deren individuellen Seren aus den BSG-Sedimenten. Bei P1 bis P5 ließ sich in deren PRP nach Arthrex ACP deutlich weniger VEGF-Konzentration als zum Vollblut nachweisen. Nur sehr geringe Mengen an WF VEGF wurden bei P4 und keine bei P3 im Serum (BSG) gemessen.

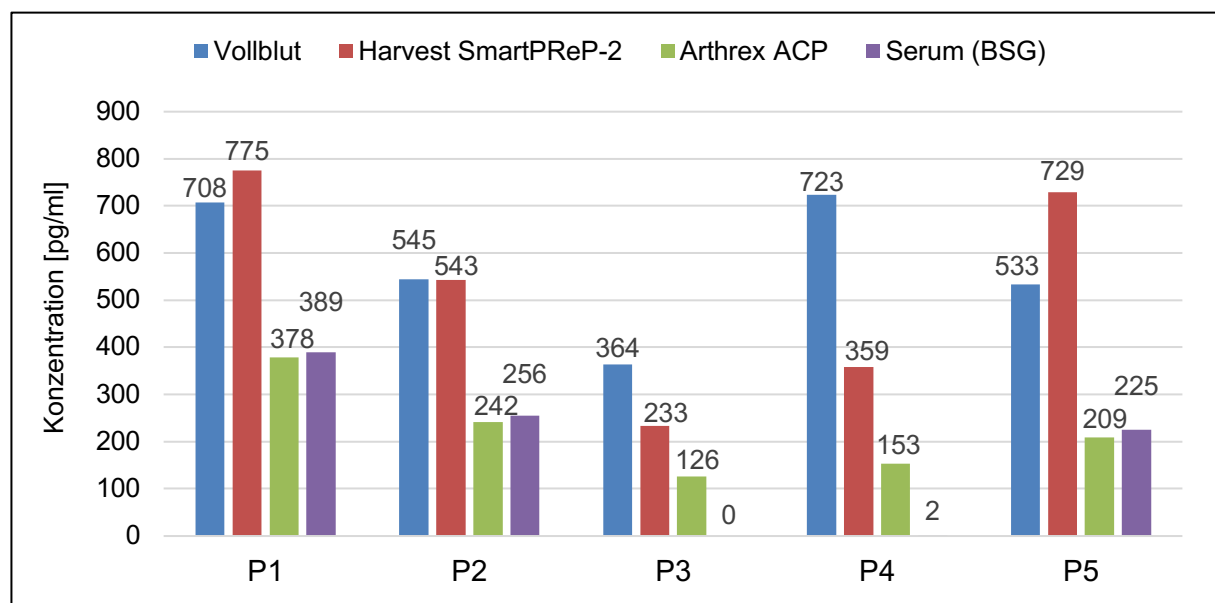


Abb. 8: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs VEGF aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.3 Wachstumsfaktor FGF-2

Es wurden erhöhte Konzentrationen des WF FGF-2 (MW \pm SD in pg/ml) im PRP-Pulver (542 ± 12 pg/ml), in den beiden herkömmlichen PRP-Herstellungsmethoden (Arthrex: 242 ± 203 pg/ml, Harvest: 410 ± 259 pg/ml) und im BSG-Serum (258 ± 218 pg/ml) gegenüber der Referenzgruppe Vollblut (198 ± 164 pg/ml) bestimmt. In den TKs (151 ± 99 pg/ml) wurde eine niedrigere FGF-2 WF-Menge gemessen (s. Tab. 11, Abb. 9).

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proben Gruppen des WF FGF-2 mit Ausnahme des PRP-Pulvers wurde nicht festgestellt (s. Tab. 13). Allein im PRP-Pulver ließ sich ein hoch signifikanter Unterschied zum Vollblut ($p = 0,009$) und zum TK ($p = 0,01$) nachweisen (s. Tab. 12).

Tab. 11: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs FGF-2 aller Probengruppen.

Probengruppe	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	198	59	467	± 164
Arthrex ACP (n = 5)	242	74	573	± 203
Harvest SmartPReP-2 (n = 5)	410	183	843	± 259
TK (n = 5)	151	47	288	± 99
PRP-Pulver (n = 1)	542	542	542	± 12 ^a
Serum aus BSG (n = 5)	258	84	602	± 218

^aBerechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung.

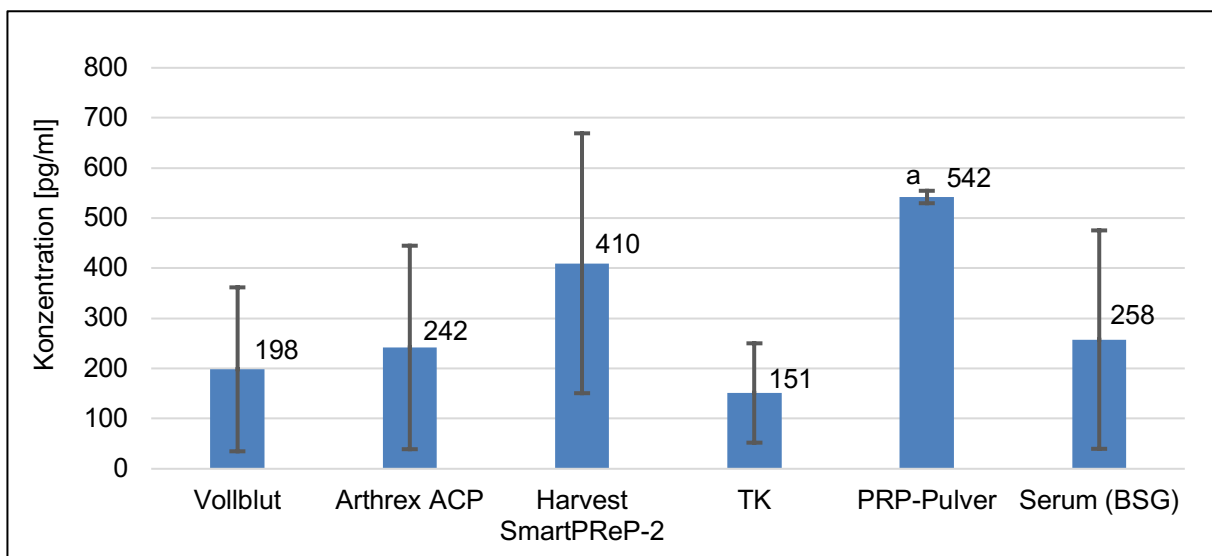


Abb. 9: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs FGF-2 aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range (^aberechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung).

Tab. 12: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs FGF-2 mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).

FGF-2		PRP-Pulver = 542 pg/ml (n = 1)			
Probengruppen (n = 5)	T	Signifikanz/ p-Wert (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
Vollblut	-4,697	,009 ^a	-343,65	-546,81	-140,50
Harvest SmartPReP-2	-1,139	,318	-132,07	-454,08	189,94
Arthrex ACP	-3,303	,030 ^b	-300,01	-552,19	-47,83
TK	-8,815	,001 ^a	-390,83	-513,92	-267,73
Serum BSG	-2,917	,043 ^b	-284,39	-555,06	-13,72

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < .01$

^bStatistisch signifikanter Unterschied: $p < .050$

Im Vergleich zwischen beiden PRP-Herstellungsmethoden war die gemessene WF-Menge nach der Harvest-Methode (410 ± 259 pg/ml) circa 1,7-fach höher als nach der Arthrex-Methode (242 ± 203 pg/ml) ohne nachweislicher Relevanz ($p > 0,999$) (s. Abb. 9, Tab. 13). Zudem enthielten beide PRP-Herstellungsmethoden weniger WF FGF-2 als das PRP-Pulver (542 ± 12 pg/ml). Eine statistische Signifikanz zwischen dem PRP nach Harvest SmartPreP-2 und dem PRP-Pulver ($p = 0,318$) bestehen nicht. Dafür besteht ein signifikanter Unterschied des PRP-Pulvers zum PRP nach Arthrex ACP ($p = 0,030$) sowie zum Serum aus den BSG-Sedimenten ($p = 0,043$) (s. Tab. 12).

Tab. 13: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Proben Gruppen (n= 5) des WFs FGF-2.

Abhängige Variable		FGF-2 in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	-211,58	,292	-538,65	115,49
	Arthrex	-43,64	>,999	-435,09	347,81
	TK	47,18	>,999	-279,89	374,25
	Serum	-59,26	>,999	-450,71	332,19
Harvest	Vollblut	211,58	,292	-115,49	538,65
	Arthrex	167,94	>,999	-223,51	559,39
	TK	258,75	,145	-68,32	585,83
	Serum	152,32	>,999	-239,13	543,77
Arthrex	Vollblut	43,64	>,999	-347,81	435,09
	Harvest	-167,94	>,999	-559,39	223,51
	TK	90,82	>,999	-300,64	482,27
	Serum	-15,62	>,999	-407,07	375,83
TK	Vollblut	-47,18	>,999	-374,25	279,89
	Harvest	-258,75	,145	-585,83	68,32
	Arthrex	-90,82	>,999	-482,27	300,64
	Serum	-106,44	>,999	-497,89	285,02
Serum	Vollblut	59,26	>,999	-332,19	450,71
	Harvest	-152,32	>,999	-543,77	239,13
	Arthrex	15,62	>,999	-375,83	407,07
	TK	106,44	>,999	-285,02	497,89

Zugleich waren nur geringe interindividuelle Unterschiede der FGF-2 WF-Konzentrationen bei den Probanden erkennbar. Auffallend ist hingegen, dass bei allen Probanden eine höhere WF-Menge im PRP nach Harvest SmartPreP-2 als zur Referenz Vollblut, ebenso zum PRP nach Arthrex ACP und zum BSG-Serum gemessen wurde (s. Abb. 10). In der Datenübersicht der Proben Gruppen wird dies ebenfalls ersichtlich (s. Tab. 11), dagegen wird im statistischen Vergleich der Proben Gruppen deutlich, dass hier kein signifikanter Unterschied besteht (s. Tab. 12, Tab. 13).

Ferner wird sichtbar, dass das PRP der Aufbereitungsmethode nach Arthrex ACP eine minimal höhere WF-Konzentration als zum Vollblut enthält, mit Ausnahme von P5. Geringfügige interindividuelle Konzentrationsunterschiede bestehen bei P4 und P5 zwischen deren Vollblut, ihrem PRP nach Arthrex ACP und ihrem Serum aus den BSG-Sedimenten im Gegensatz zu P1 bis P3. Bei P4 ist die WF-Menge im BSG-Serum am niedrigsten. Bei P5 ist die Konzentration im PRP nach der Arthrex-Methode am kleinsten. Bei P1 bis P3 sind keine Unterschiede innerhalb der Aufbereitungsmethoden untereinander erkennbar, dafür sind die WF-Konzentrationen der jeweiligen Aufbereitungsmethode zwischen den drei Probanden sichtlich verschieden (s. Abb. 10).

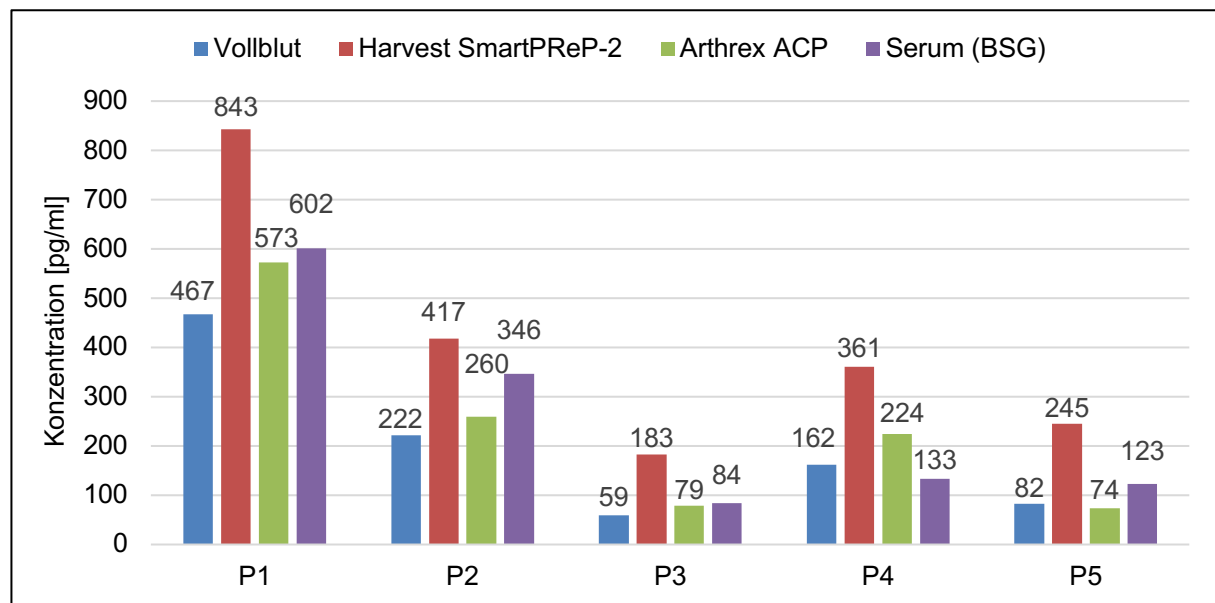


Abb. 10: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs FGF-2 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.4 Wachstumsfaktor PDGF-AB

Es konnten deutlich angereicherte WF-Mengen von PDGF-AB (MW \pm SD in pg/ml) im PRP nach Harvest SmartPreP-2 (17846 ± 3087 pg/ml), im TK (18461 ± 4455 pg/ml) und im PRP-Pulver (23023 ± 630 pg/ml) gegenüber der Referenz Vollblut (2394 ± 451 pg/ml) gemessen werden (s. Tab. 14, Abb. 11).

In den statistisch gepaarten Mehrfachvergleichen bestätigt sich die hoch signifikante Differenz ($p < 0,001$) zwischen dem Vollblut und dem PRP nach der Harvest-Methode sowie zwischen dem Vollblut und dem TK. Das PRP nach Harvest SmartPreP-2 und das TK präsentieren gegenüber allen Probangruppen, mit Ausnahme des PRP-Pulvers, einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) (s. Tab. 15, Tab. 16).

Das PRP-Pulver (23023 ± 630 pg/ml) weist gleichermaßen eine hoch signifikante große WF-Konzentration ($p < 0,001$) zum Vollblut (2394 ± 451 pg/ml), zum PRP nach Arthrex ACP (2473 ± 643 pg/ml) und zum Serum aus den BSG-Sedimenten (7325 ± 1900 pg/ml) auf.

Außerdem besteht eine signifikante Abweichung ($p = 0,02$) zwischen dem PRP-Pulver (23023 ± 630 pg/ml) und dem PRP nach Harvest SmartPReP-2 (17846 ± 3087 pg/ml). Zwischen dem PRP-Pulver und dem TK lässt sich dagegen kein eindeutig signifikanter Unterschied ($p = 0,084$) erkennen (s. Tab. 15).

Tab. 14: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs PDGF-AB aller Probengruppen.

Probengruppe	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	2394	1850	2984	± 451
Arthrex ACP (n = 5)	2473	1683	3361	± 643
Harvest SmartPReP-2 (n = 5)	17846	13804	20870	± 3087
TK (n = 5)	18461	13056	21923	± 4455
PRP-Pulver (n = 1)	23023	23023	23023	$\pm 630^a$
Serum aus BSG (n = 5)	7325	4282	9364	± 1900

^aBerechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung.

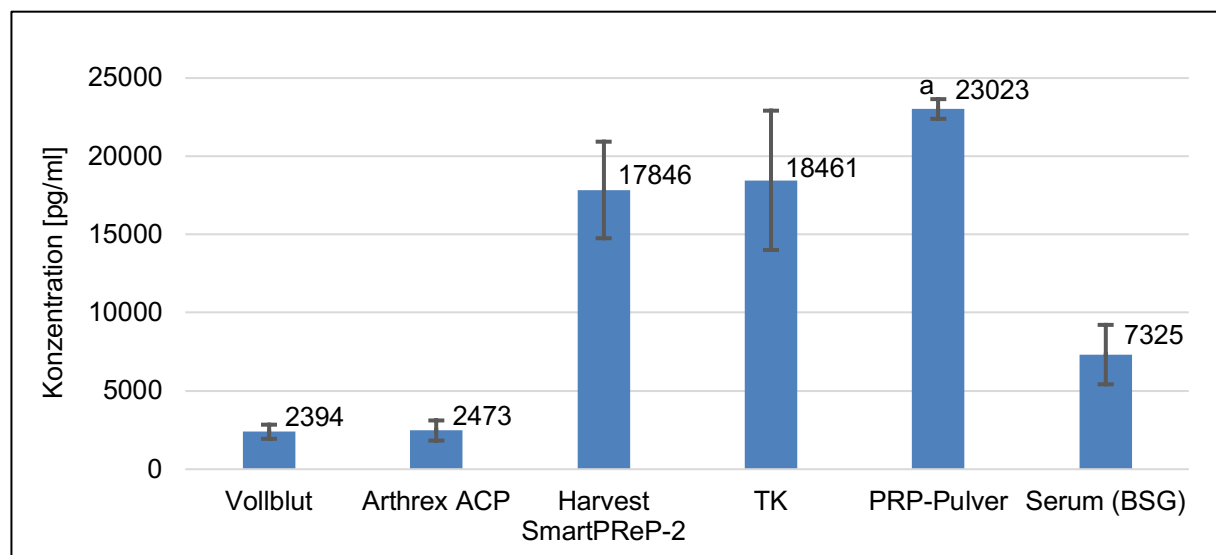


Abb. 11: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs PDGF-AB aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range (^aberechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung).

Des Weiteren konnte eine erhöhte Anzahl an WF PDGF-AB im BSG-Serum (7325 ± 1900 pg/ml) vergleichsweise zum Vollblut (2394 ± 451 pg/ml) ermittelt werden. Eine nur geringe Erhöhung der Konzentration an PDGF-AB zeigt hingegen das PRP nach Arthrex ACP (2473 ± 643 pg/ml) im Vergleich zum Vollblut (2394 ± 451 pg/ml) (s. Tab. 14, Abb. 11). Zugleich lässt sich kein eindeutig signifikanter Unterschied zwischen dem Serum aus den BSG-Sedimenten gegenüber dem Vollblut ($p = 0,070$) sowie dem PRP nach Arthrex ACP ($p = 0,077$) annehmen (s. Tab. 16). Ebenso besteht keine Signifikanz zwischen dem Vollblut und der PRP-Herstellungsmethode nach Arthrex ACP ($p > 0,999$) (s. Tab. 16).

Tab. 15: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs PDGF-AB mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).

PDGF-AB		PRP-Pulver = 23023 pg/ml (n = 1)			
Probengruppen (n = 5)	T	Signifikanz/ p-Wert (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
Vollblut	-102,176	<,001 ^a	-20628,66	-21189,21	-20068,11
Harvest SmartPRP-2	-3,750	,020 ^b	-5176,80	-9009,36	-1344,24
Arthrex ACP	-71,481	<,001 ^a	-20550,43	-21348,65	-19752,22
TK	-2,290	,084	-4562,09	-10093,36	969,17
Serum BSG	-18,478	<,001 ^a	-15697,97	-18056,66	-13339,27

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: p < .01

^bStatistisch signifikanter Unterschied: p < .050

Tab. 16: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n = 5) des WFs PDGF-AB.

Abhängige Variable		PDGF-AB in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	-15451,85	<,001 ^a	-20971,34	-9932,37
	Arthrex	-78,23	>,999	-5248,07	5091,62
	TK	-16066,56	<,001 ^a	-21586,05	-10547,08
	Serum	-4930,69	,070	-10100,54	239,15
Harvest	Vollblut	15451,85	<,001 ^a	9932,37	20971,34
	Arthrex	15373,63	<,001 ^a	10203,79	20543,47
	TK	-614,71	<,001 ^a	-6134,20	20971,34
	Serum	10521,16	<,001 ^a	5351,32	15691,01
Arthrex	Vollblut	78,23	>,999	-5091,62	5248,07
	Harvest	-15373,63	<,001 ^a	-20543,47	-10203,79
	TK	-15988,34	<,001 ^a	-21158,18	-10818,49
	Serum	-4852,47	,077	-10022,31	317,38
TK	Vollblut	16066,56	<,001 ^a	10547,08	21586,05
	Harvest	614,71	<,001 ^a	-20971,34	6134,20
	Arthrex	15988,34	<,001 ^a	10818,49	21158,18
	Serum	11135,87	<,001 ^a	5966,03	16305,72
Serum	Vollblut	4930,69	,070	-239,15	10100,54
	Harvest	-10521,16	<,001 ^a	-15691,01	-5351,32
	Arthrex	4852,47	,077	-317,38	10022,31
	TK	-11135,87	<,001 ^a	-16305,72	-5966,03

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: p < .01

In den Ergebnissen der Menge an WF PDGF-AB im Vergleich zwischen den einzelnen Probanden zeigen sich nur geringfügige Abweichungen. Deutlich wird, dass das PRP mit Hilfe der Herstellungsmethode nach Harvest SmartPReP-2 bei allen Probanden die höchste WF-Anreicherung hat und sich dies ebenso in den Mehrfachvergleichen der Probengruppen in deren Signifikanz widerspiegelt ($p < 0,001$) (s. Abb. 12, Tab. 16).

Außerdem wurden im Serum der BSG-Sedivetten höhere WF-Konzentrationen gemessen als im PRP nach Arthrex ACP und zum Vollblut (s. Abb. 12). In Bezug auf die Datenübersicht der Mehrfachvergleiche der Probengruppen von PDGF-AB besteht hier kein deutlich signifikanter Unterschied (s. Tab. 16).

Eine niedrige Anzahl an WF PDGF-AB weisen das PRP nach Arthrex ACP und etwas geringer das Vollblut bei der Mehrheit der Probanden auf, abgesehen von P3 und P5, bei denen es sich umgekehrt darstellt (s. Abb. 12).

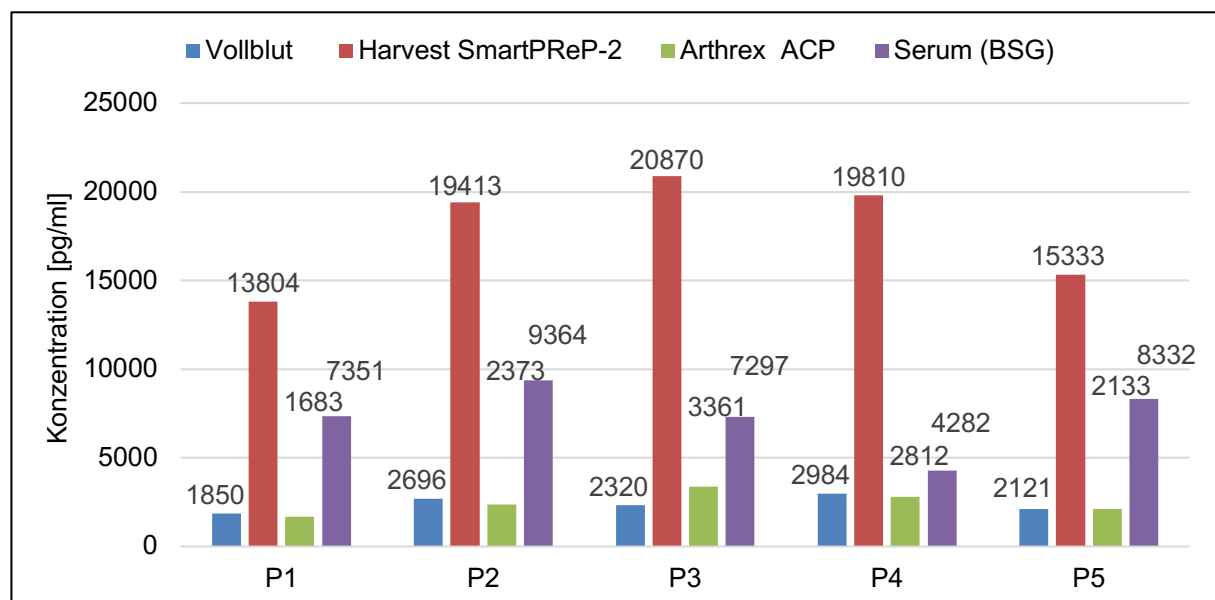


Abb. 12: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs PDGF-AB aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.5 Wachstumsfaktor TGF- β 1

Beim WF TGF- β 1 wurden hohe Konzentrationen (MW \pm SD in pg/ml) im PRP-Pulver (87495 ± 457 pg/ml), im PRP nach der Harvest-Methode (77533 ± 13918 pg/ml), im TK (68582 ± 7388 pg/ml) sowie mäßig viel im PRP nach Arthrex ACP (23668 ± 8225 pg/ml) im Vergleich zur Referenzgruppe Vollblut (14356 ± 4527 pg/ml) ermittelt (s. Tab. 17, Abb. 13). Hierbei weist das PRP-Pulver eine statistisch hoch signifikante größere WF-Menge als zum Vollblut ($p < 0,001$), zum PRP nach Arthrex ACP ($p < 0,001$), zum BSG-Serum ($p < 0,001$) und zum TK ($p = 0,005$) auf, mit Ausnahme vom PRP nach Harvest SmartPReP-2, was keinen erheblichen Unterschied ($p = 0,185$) darlegt (s. Tab. 18).

Tab. 17: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs TGF- β 1 aller Probengruppen.

Probengruppe	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	14356	10242	21627	± 4527
Arthrex ACP (n = 5)	23668	17395	37875	± 8225
Harvest SmartPReP-2 (n = 5)	77533	53092	87846	± 13918
TK (n = 5)	68582	56043	74280	± 7388
PRP-Pulver (n = 1)	87495	87495	87495	$\pm 457^a$
Serum aus BSG (n = 5)	11990	10918	12632	± 663

^aBerechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung.

In den gepaarten Mehrfachvergleichen präsentiert lediglich das PRP nach Harvest SmartPReP-2 und das TK eine statistisch hoch signifikante WF-Erhöhung ($p < 0,001$) gegenüber den anderen Probengruppen. Davon ausgenommen sind die beiden Gruppen in ihrem Direktvergleich, dort ließ sich kein relevanter Unterschied ($p = 0,482$) nachweisen (s. Tab. 19). Eine nicht signifikante geringere TGF- β 1 WF-Konzentration ($p > 0,999$) als das Vollblut (14356 ± 4527 pg/ml) weist ausschließlich das Serum aus den BSG-Sedimenten (11990 ± 663 pg/ml) auf (s. Abb. 13, Tab. 17, Tab. 19).

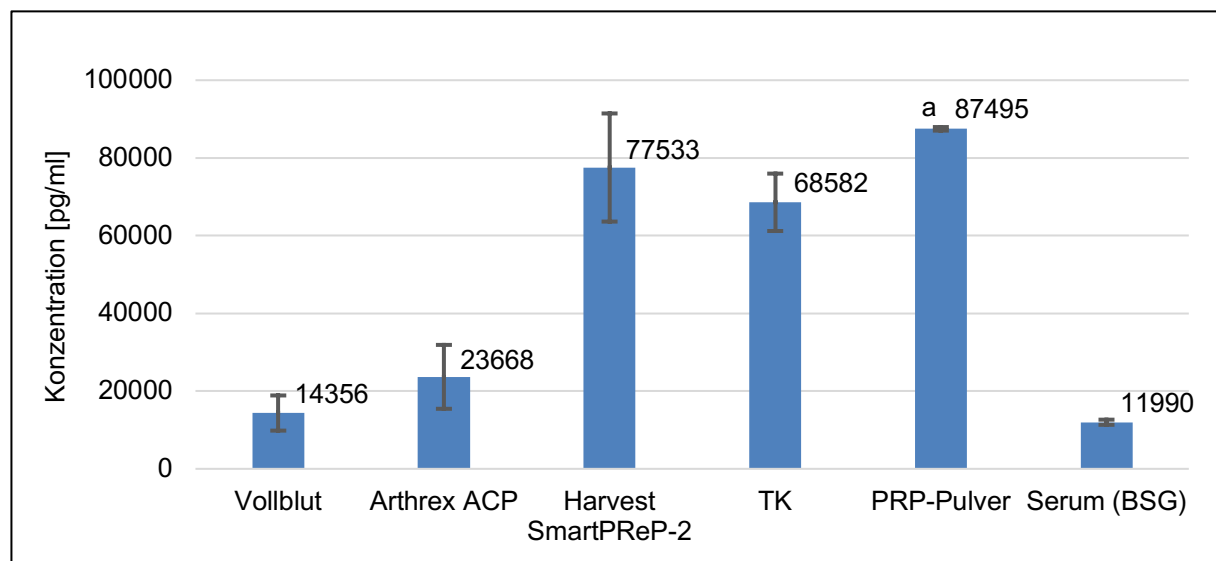


Abb. 13: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs TGF- β 1 aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range (^aberechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung).

Tab. 18: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs TGF- β 1 mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).

TGF- β 1		PRP-Pulver = 87495 pg/ml (n = 1)			
Probengruppen (n = 5)	T	Signifikanz/ p-Wert (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
Vollblut	-36,129	<,001 ^a	-73138,56	-78759,12	-67518,00
Harvest SmartPReP-2	-1,601	,185	-9962,19	-27243,74	7319,36
Arthrex ACP	-17,353	<,001 ^a	-63826,88	-74039,13	-53614,63
TK	-5,724	,005 ^a	-18912,70	-28086,44	-9738,96
Serum BSG	-254,683	<,001 ^a	-75504,57	-76327,69	-74681,45

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: p < .01

Tab. 19: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n = 5) des WFs TGF- β 1.

Abhängige Variable		TGF- β 1 in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	-63176,37	<,001 ^a	-79815,78	-46536,97
	Arthrex	-9311,68	,880	-25682,01	7058,65
	TK	-54225,86	<,001 ^a	-70865,26	-46536,97
	Serum	2366,01	>,999	-14004,32	18736,35
Harvest	Vollblut	63176,37	<,001 ^a	46536,97	79815,78
	Arthrex	53864,69	<,001 ^a	37494,36	70235,03
	TK	8950,51	,482	-7688,89	25589,92
	Serum	65542,38	<,001 ^a	49172,05	81912,72
Arthrex	Vollblut	9311,68	,880	-7058,65	25682,01
	Harvest	-53864,69	<,001 ^a	-70235,03	-37494,36
	TK	-44914,18	<,001 ^a	-61284,51	-28543,84
	Serum	11677,69	,359	-4692,64	28048,03
TK	Vollblut	54225,86	<,001 ^a	46536,97	70865,26
	Harvest	-8950,51	,482	-25589,92	7688,89
	Arthrex	44914,18	<,001 ^a	28543,84	61284,51
	Serum	56591,87	<,001 ^a	40221,54	72962,20
Serum	Vollblut	-2366,01	>,999	-18736,35	14004,32
	Harvest	-65542,38	<,001 ^a	-81912,72	-49172,05
	Arthrex	-11677,69	,359	-28048,03	4692,64
	TK	-56591,87	<,001 ^a	-72962,20	-40221,54

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: p < .01

Die WF-Mengen von TGF- β 1 zeigen nur geringe Differenzen in den Konzentrationsverhältnissen zwischen den einzelnen Probanden. Bei allen Testpersonen wurden deutlich erhöhte WF-Konzentrationen im PRP nach Harvest SmartPReP-2 gemessen, gefolgt vom PRP nach Arthrex ACP. Ausgenommen P1, wo lediglich das Vollblut eine leicht erhöhte Anzahl des WF TGF- β 1 gegenüber dem PRP nach Arthrex ACP aufweist (s. Abb. 14). Im statistischen Mehrfachvergleich der Probengruppen bestätigt sich die hoch signifikante Unterscheidung ($p < 0,001$) des PRPs nach Harvest SmartPReP-2 gegenüber dem PRP nach Arthrex ACP, dem Vollblut und dem Serum der BSG-Sedimenten (s. Tab. 19). Die niedrigste Menge an TGF- β 1 war im BSG-Serum nachweislich, mit Ausnahme von P3 und P4, dort enthält das Vollblut die geringste WF-Konzentration (s. Abb. 14).

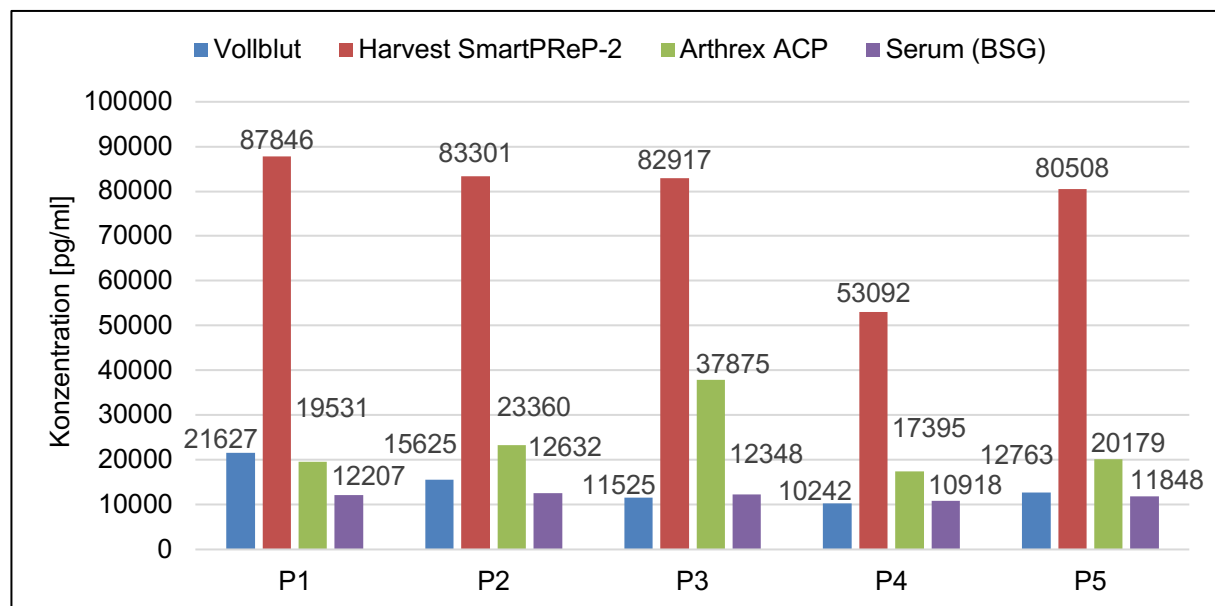


Abb. 14: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs TGF- β 1 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.6 Wachstumsfaktor IGF-1

In der Mehrheit der Probengruppen (Methode: MW \pm SD in pg/ml, TK: 2266 \pm 485 pg/ml, PRP nach Arthrex ACP: 1234 \pm 823 pg/ml, PRP nach Harvest SmartPReP-2: 1539 \pm 348 pg/ml, BSG-Serum: 120 \pm 69 pg/ml) wurde weniger an IGF-1 verglichen zur Referenz Vollblut (2317 \pm 711 pg/ml) gemessen. Im PRP-Pulver hingegen war kein WF IGF-1 detektierbar (s. Abb. 15, Tab. 20).

Tab. 20: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs IGF-1 aller Proben­gruppen.

Probengruppen	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	2317	1531	3365	± 711
Arthrex ACP (n = 5)	1234	526	2538	± 823
Harvest SmartPReP-2 (n = 5)	1539	1173	2039	± 348
TK (n = 5)	2266	1821	2833	± 485
PRP-Pulver (n = 1)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
Serum aus BSG (n = 5)	120	39	218	± 69

^an.d., nicht detektierbar.

Statistisch hoch signifikante Unterschiede werden beim Vollblut ($p < 0,001$), beim TK ($p < 0,001$) und beim PRP nach Harvest SmartPReP-2 ($p = 0,006$) gegenüber dem Serum aus den BSG-Sedimenten deutlich. Ein weiterer signifikanter Unterschied ($p = 0,048$) besteht zudem zwischen dem PRP nach Arthrex ACP und dem BSG-Serum. Keine eindeutig signifikanten Abweichungen lassen sich beim PRP nach Arthrex ACP im Vergleich zum Vollblut ($p = 0,059$) und zum TK ($p = 0,82$) erkennen. Außerdem besteht keine signifikante Differenz beim TK ($p > 0,999$) vergleichsweise zum Vollblut sowie zwischen den beiden PRP-Herstellungsmethoden nach Arthrex ACP und Harvest SmartPReP-2 ($p > 0,999$), ebenso wenig beim PRP nach Harvest SmartPReP-2 verglichen zum Vollblut ($p = 0,122$) und zum TK ($p = 0,160$) (s. Tab. 21).

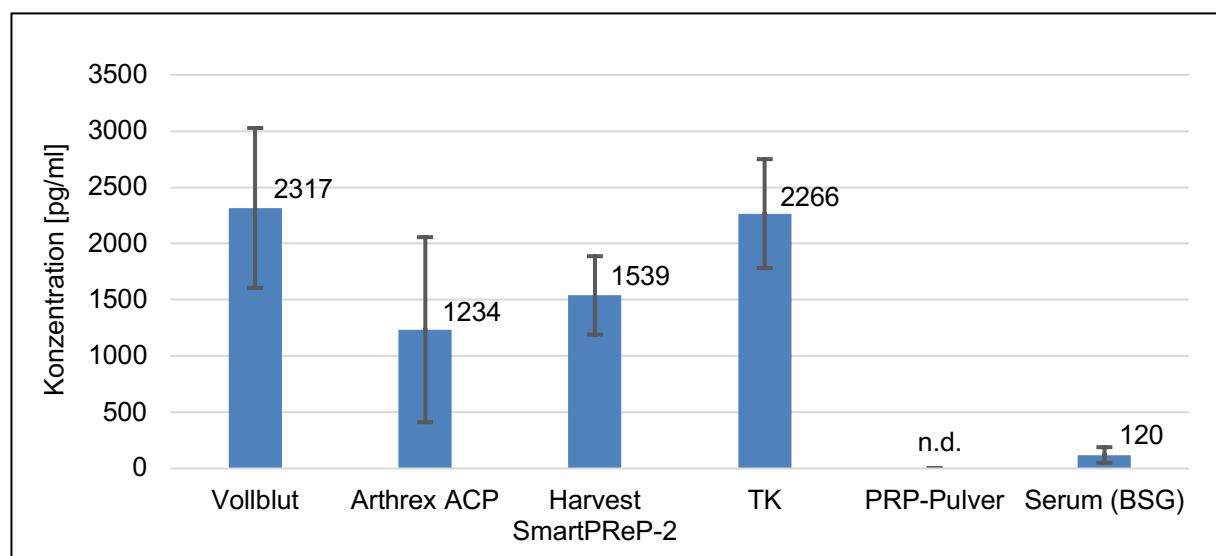


Abb. 15: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-1 aller Proben­gruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.

Tab. 21: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n = 5) des WFs IGF-1.

Abhängige Variable		IGF-1 in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	777,13	,122	-165,16	1719,42
	Arthrex	1082,42	,059 ^c	-25,91	2190,76
	TK	50,53	>,999	-891,76	992,83
	Serum	2196,57	<,001 ^a	1088,24	3304,91
Harvest	Vollblut	-777,13	,122	-1719,42	165,16
	Arthrex	305,30	>,999	-803,04	1413,63
	TK	-726,59	,160	-1668,88	215,70
	Serum	1419,45	,006 ^a	311,11	2527,78
Arthrex	Vollblut	-1082,42	,059 ^c	-2190,76	25,91
	Harvest	-305,30	>,999	-1413,63	803,04
	TK	-1031,89	,082 ^c	-2140,22	76,45
	Serum	1114,15	,048 ^b	5,82	2222,49
TK	Vollblut	-50,53	>,999	-992,83	891,76
	Harvest	726,59	,160	-215,70	1668,88
	Arthrex	1031,89	,082 ^c	-76,45	2140,22
	Serum	2146,04	<,001 ^a	1037,70	3254,38
Serum	Vollblut	-2196,57	<,001 ^a	-3304,91	-1088,24
	Harvest	-1419,45	,006 ^a	-2527,78	-311,11
	Arthrex	-1114,15	,048 ^b	-2222,49	-5,82
	TK	-2146,04	<,001 ^a	-3254,38	-1037,70

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < .01$ ^bStatistisch signifikanter Unterschied: $p < .050$

Der ungepaarte t-Test des WFs IGF-1 zwischen dem PRP-Pulver und den anderen Probengruppen ist nicht vergleichbar aufgrund des nicht nachweisbaren WF IGF-1 im PRP-Pulver. Das PRP-Pulver ist somit 0, ebenfalls die Werte der jeweils vergleichenden Probengruppe und deren Mittelwerte der Differenz.

Im Probandenvergleich zeigten die WF-Mengen von IGF-1 nur geringe Verschiedenheiten untereinander auf (s. Abb. 16). Bei allen Testpersonen präsentiert das Vollblut die höchste WF-Konzentration gefolgt vom PRP nach Harvest SmartPrep-2 sowie daran das PRP nach Arthrex ACP. Eine Ausnahme stellt P1 dar, wo das PRP nach der Arthrex-Methode am zweithöchsten war und danach das PRP der Herstellung nach Harvest SmartPrep-2 folgte. Die niedrigste Anzahl an WF IGF-1 weist bei allen Probanden das Serum aus den BSG-Sedimenten auf. Des Weiteren wird deutlich, dass die WF-Mengen zwischen den Probanden unterschiedlich hoch bzw. niedrig sind und zum Teil bis zu doppelt so hohe Konzentrationen aufweisen (s. Abb. 16).

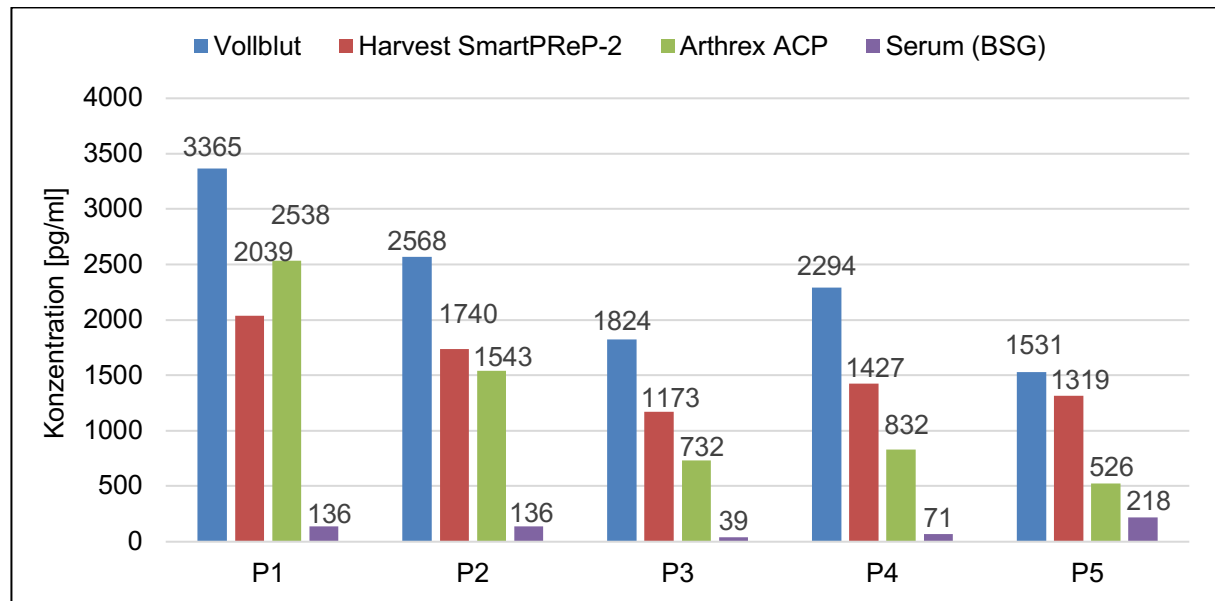


Abb. 16: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-1 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.7 Wachstumsfaktor IGF-BP3

Eine große Anzahl an WF IGF-BP3 (MW \pm SD in pg/ml) war in den TKs (37198 ± 6157 pg/ml) sowie im PRP der Herstellung nach Arthrex ACP (27213 ± 10593 pg/ml) festzustellen. Im Vollblut (13611 ± 4901 pg/ml), im PRP nach Harvest SmartPreP-2 (13765 ± 3814 pg/ml), im PRP-Pulver (6123 ± 344 pg/ml) und im Serum aus den BSG-Sedivetten (5836 ± 3015 pg/ml) fällt dies deutlich geringer aus. Die WF-Konzentration IGF-BP3 weist in den TKs nahezu eine Verdopplung zum Vollblut auf (s. Abb. 17, Tab. 22).

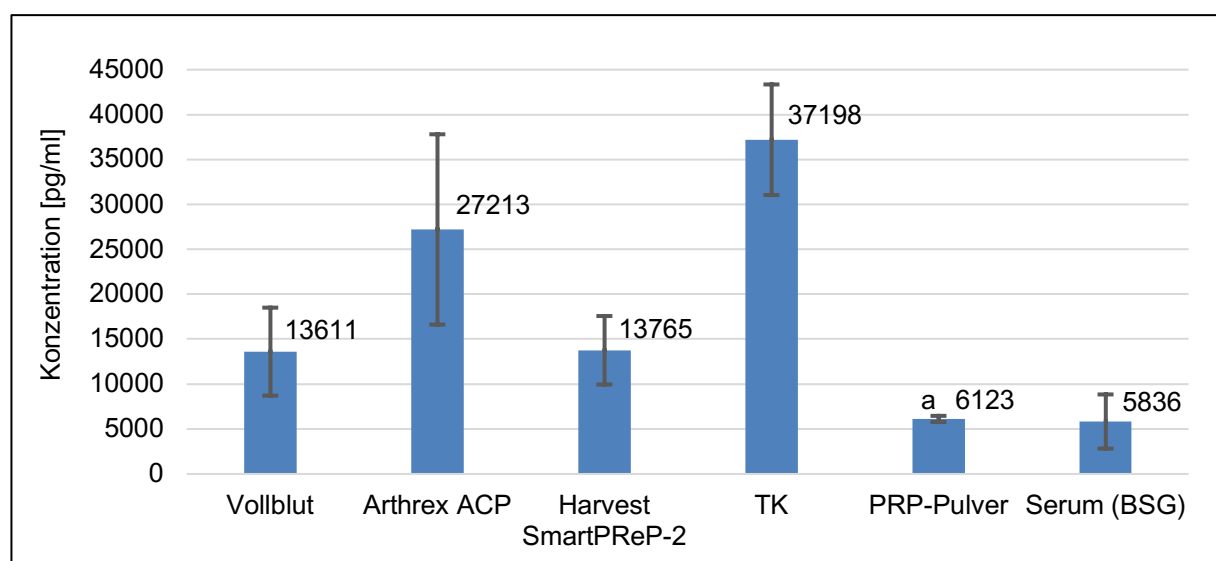


Abb. 17: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-BP3 aller Proben Gruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range (^aberechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung).

Tab. 22: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des WFs IGF-BP3 aller Probengruppen.

Probengruppe	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	13611	10073	22194	± 4901
Arthrex ACP (n = 5)	27213	18852	45292	± 10593
Harvest SmartPreP-2 (n = 5)	13765	9949	19891	± 3814
TK (n = 5)	37198	31017	45358	± 6157
PRP-Pulver (n = 1)	6123	6123	6123	± 344 ^a
Serum aus BSG (n = 5)	5836	3730	11069	± 3015

^aBerechnete technische Abweichung mittels der dreifachen OD-Messung.

Im Vergleich zur Referenz Vollblut besteht nur ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zu den TKs sowie eine signifikante Abweichung ($p = 0,027$) zum PRP-Pulver und PRP nach Arthrex ACP (s. Tab. 23, Tab. 24). Des Weiteren weisen die TKs eine hoch signifikante Differenz ($p < 0,001$) zum PRP nach Harvest SmartPreP-2 und zum BSG-Serum auf (s. Tab. 24). Weitere statistische signifikante Verschiedenheiten ($p = 0,011$) werden zudem zwischen dem PRP-Pulver und dem PRP der Herstellung nach Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2 deutlich (s. Tab. 23). Zugleich besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,030$) zwischen beiden PRPs nach Harvest SmartPreP-2 und Arthrex ACP (s. Tab. 24).

Keine Divergenz zeigt dagegen das Serum aus den BSG-Sedimenten zum Vollblut ($p = 0,647$), zum PRP der Methode nach Harvest SmartPreP-2 ($p = 0,600$) und zum PRP-Pulver ($p = 0,842$) (s. Tab. 23, Tab. 24). Zwischen den TKs und dem PRP nach Harvest SmartPreP-2 wird ebenfalls kein statistischer Unterschied ($p = 0,208$) deutlich (s. Tab. 24).

Tab. 23: Datenübersicht des ungepaarten t-Test des WFs IGF-BP3 mit einer Probengruppe (n = 5) und dem PRP-Pulver (n = 1).

IGF-BP3		PRP-Pulver = 6123 pg/ml (n = 1)			
Probengruppe (n = 5)	T	Signifikanz/ p-Wert (2-seitig)	Mittlere Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
Vollblut	3,417	,027 ^b	7488,24	1402,92	13573,56
Harvest SmartPreP-2	4,481	,011 ^b	7642,39	2906,64	12378,13
Arthrex ACP	4,452	,011 ^b	21090,49	7936,95	34244,04
TK	11,286	<,001 ^a	31075,50	23430,45	38720,55
Serum BSG	-,213	,842	-286,98	-4030,16	3456,20

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < .01$

^bStatistisch signifikanter Unterschied: $p < .050$

Tab. 24: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n = 5) des WFs IGF-BP3.

Abhängige Variable		IGF-BP3 in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	-154,15	>,999	-12697,73	12389,44
	Arthrex	-13602,25	,027 ^b	-26145,84	-1058,67
	TK	-23587,26	<,001 ^a	-36130,85	-11043,67
	Serum	7775,22	,647	-4768,37	20318,81
Harvest	Vollblut	154,15	>,999	-12389,44	12697,73
	Arthrex	-13448,10	,030 ^b	-25991,69	-904,52
	TK	-23433,11	<,001 ^a	-35976,70	-10889,53
	Serum	7929,37	,600	-4614,22	20472,95
Arthrex	Vollblut	13602,25	,027 ^b	1058,67	26145,84
	Harvest	13448,10	,030 ^b	904,52	25991,69
	TK	-9985,01	,208	-22528,59	2558,58
	Serum	21377,47	<,001 ^a	8833,89	33921,06
TK	Vollblut	23587,26	<,001 ^a	11043,67	36130,85
	Harvest	23433,11	<,001 ^a	10889,53	35976,70
	Arthrex	9985,01	,208	-2558,58	22528,59
	Serum	31362,48	<,001 ^a	18818,89	43906,07
Serum	Vollblut	-7775,22	,647	-20318,81	4768,37
	Harvest	-7929,37	,600	-20472,95	4614,22
	Arthrex	-21377,47	<,001 ^a	-33921,06	-8833,89
	TK	-31362,48	<,001 ^a	-43906,07	-18818,89

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < .01$

^bStatistisch signifikanter Unterschied: $p < .050$

In den Ergebnissen des WF IGF-BP3 präsentieren sich nur geringfügige Abweichungen zwischen den Probanden (s. Abb. 18). Deutlich wird, dass das PRP der Herstellungsmethode nach Arthrex ACP die höchste WF-Anreicherung bei allen Probanden aufweist und das Serum der BSG-Sedimenten die niedrigste Konzentration darstellt. Minimale Unterschiede treten zwischen dem Vollblut und dem PRP der Herstellung nach Harvest SmartPreP-2 auf. Die WF-Mengen im Vollblut sind bei den Probanden 1, 2 und 4 geringfügig höher als im PRP nach Harvest SmartPreP-2. Bei P3 und P5 stellt es sich andersherum dar. Ebenfalls wird ersichtlich, dass der P1 höhere WF-Konzentrationen aufzeigt als die anderen Probanden. Besonders auffallend ist, dass die WF-Menge bei allen Testpersonen im PRP nach Arthrex ACP fast doppelt so hoch aufkonzentriert ist verglichen zu den anderen Probengruppen (s. Abb. 18). Im statistischen Mehrfachvergleich der Probengruppen bestätigt sich die signifikante Unterscheidung des PRPs nach Arthrex ACP gegenüber dem PRP nach Harvest SmartPreP-2 ($p = 0,030$), Vollblut ($p = 0,027$) und BSG-Serum ($p < 0,001$) (s. Tab. 24).

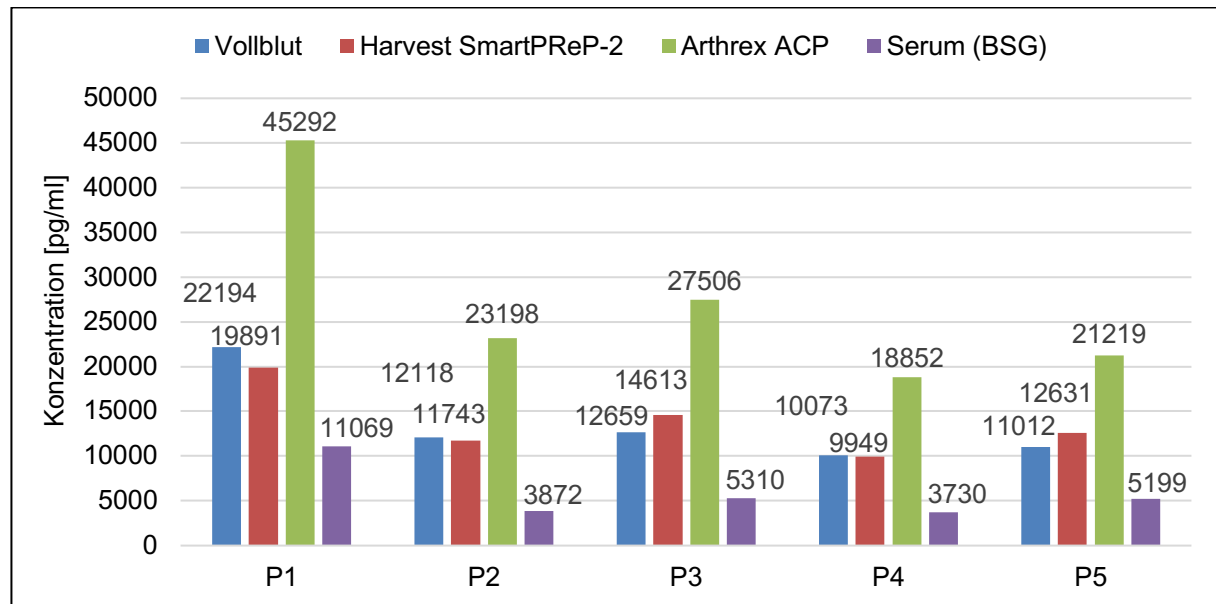


Abb. 18: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des WFs IGF-BP3 aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.8 Zytokin IL-1 α

Das Zytokin IL-1 α (MW \pm SD in pg/ml) war in den TKs und im PRP-Pulver nicht detektierbar im Gegensatz zum Vollblut (111 ± 35 pg/ml), Serum aus den BSG-Sedimenten (128 ± 34 pg/ml) sowie den herkömmlichen PRPs nach Arthrex ACP (125 ± 26 pg/ml) und Harvest SmartPreP-2 (119 ± 44 pg/ml) (s. Abb. 19, Tab. 25).

Bei den beiden PRP Herstellungsmethoden nach Arthrex ACP ($p > 0,999$) und Harvest SmartPreP-2 ($p > 0,999$) sowie beim BSG-Serum ($p > 0,999$) wurde das Zytokin IL-1 α in Bezug zur Referenz Vollblut nicht signifikant aufkonzentriert. Auch in den weiteren Mehrfachvergleichen zwischen den Proben Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,999$), abgesehen von den TKs, dort zeigte sich eine hoch signifikante Differenz ($p < 0,001$) zu den anderen Proben Gruppen mit Ausnahme vom PRP-Pulver (s. Tab. 26).

Tab. 25: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 α aller Proben Gruppen.

Proben Gruppen	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	111	59	149	± 35
Arthrex ACP (n = 5)	125	86	147	± 26
Harvest SmartPreP-2 (n = 5)	119	55	164	± 44
TK (n = 5)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
PRP-Pulver (n = 1)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
Serum aus BSG (n = 5)	128	77	162	± 34

^an.d., nicht detektierbar.

Ein statistischer Vergleich des Zytokins IL-1 α war mit Hilfe des ungepaarten t-Tests zwischen dem PRP-Pulver und den anderen Probengruppen nicht durchführbar, aufgrund des nicht detektierbaren Zytokins IL-1 α im PRP-Pulver (s. Abb. 19, Tab. 25). Im t-Test weist das PRP-Pulver folglich den Wert null auf, wodurch die weiterführenden Berechnungswerte der jeweils vergleichenden Gruppe und deren Mittelwerte der Differenz gleichfalls den Wert null ergaben.

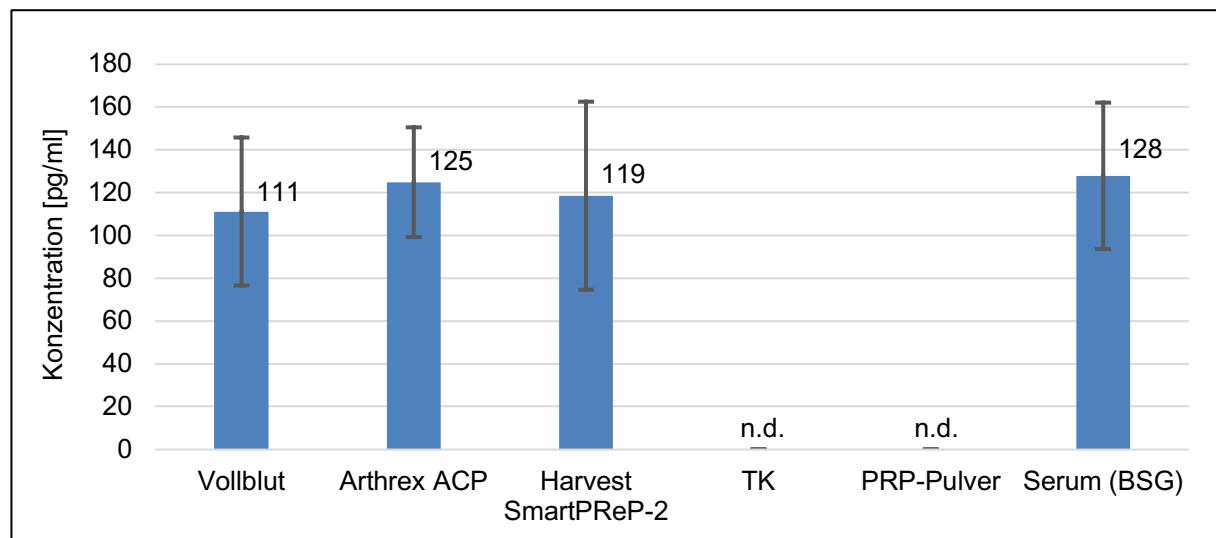


Abb. 19: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 α aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.

Im Vergleich der gemessenen Mengen an Zytokin IL-1 α zwischen den Spendern lassen sich einzelne Unterschiede in den Probengruppen sowie im Konzentrationsverhältnis darstellen (s. Abb. 20). Zwischen P1 und P2 bestehen keine wesentlichen Unterschiede mit Ausnahme von den Zytokinkonzentrationen. Der P1 weist die geringsten Mengen an Zytokin IL-1 α in allen vier Probengruppen aller Testpersonen auf, gefolgt von P2. Die höchsten Konzentrationen wurden bei P3 gemessen, ausgenommen vom PRP nach Arthrex ACP, die dort die niedrigste Menge darstellt. Bei P1, P2 und P5 präsentiert das PRP nach Arthrex ACP zudem die höchste Zytokinkonzentration im Probengruppenvergleich, angeschlossen vom BSG-Serum. P3 hat hingegen die größte Menge an Zytokin IL-1 α im PRP nach Harvest und P4 im Serum der BSG-Sedivetten. Die Zytokinkonzentrationen sind zwischen P4 und P5 nur unwesentlich unterschiedlich. Im Konzentrationsvergleich beider herkömmlich hergestellten PRPs nach Arthrex ACP und Harvest SmartPReP-2 sind die Zytokinmengen an IL-1 α im PRP nach Arthrex ACP bei der Mehrheit der Probanden am Höchsten, ausgenommen P3. Ein weiterer nachweislicher Konzentrationsunterschied besteht bei allen Testpersonen zwischen der Referenz Vollblut und dem BSG-Serum (s. Abb. 20).

Tab. 26: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n= 5) des Zytokin IL-1 α .

Abhängige Variable		IL-1 α in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	-7,37	>,999	-70,17	55,43
	Arthrex	-13,68	>,999	-76,48	49,12
	TK	111,22	<,001 ^a	48,42	174,02
	Serum	-16,65	>,999	-79,45	46,15
Harvest	Vollblut	7,37	>,999	-55,43	70,17
	Arthrex	-6,31	>,999	-69,11	56,49
	TK	118,59	<,001 ^a	55,79	181,39
	Serum	-9,28	>,999	-72,08	53,52
Arthrex	Vollblut	13,68	>,999	-49,12	76,48
	Harvest	6,31	>,999	-56,49	69,11
	TK	124,90	<,001 ^a	62,10	187,70
	Serum	-2,97	>,999	-65,77	59,83
TK	Vollblut	-111,22	<,001 ^a	-174,02	-48,42
	Harvest	-118,59	<,001 ^a	-181,39	-55,79
	Arthrex	-124,90	<,001 ^a	-187,70	-62,10
	Serum	-127,87	<,001 ^a	-190,67	-65,07
Serum	Vollblut	16,65	>,999	-46,15	79,45
	Harvest	9,28	>,999	-53,52	72,08
	Arthrex	2,97	>,999	-59,83	65,77
	TK	127,87	<,001 ^a	65,07	190,67

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: p < .01

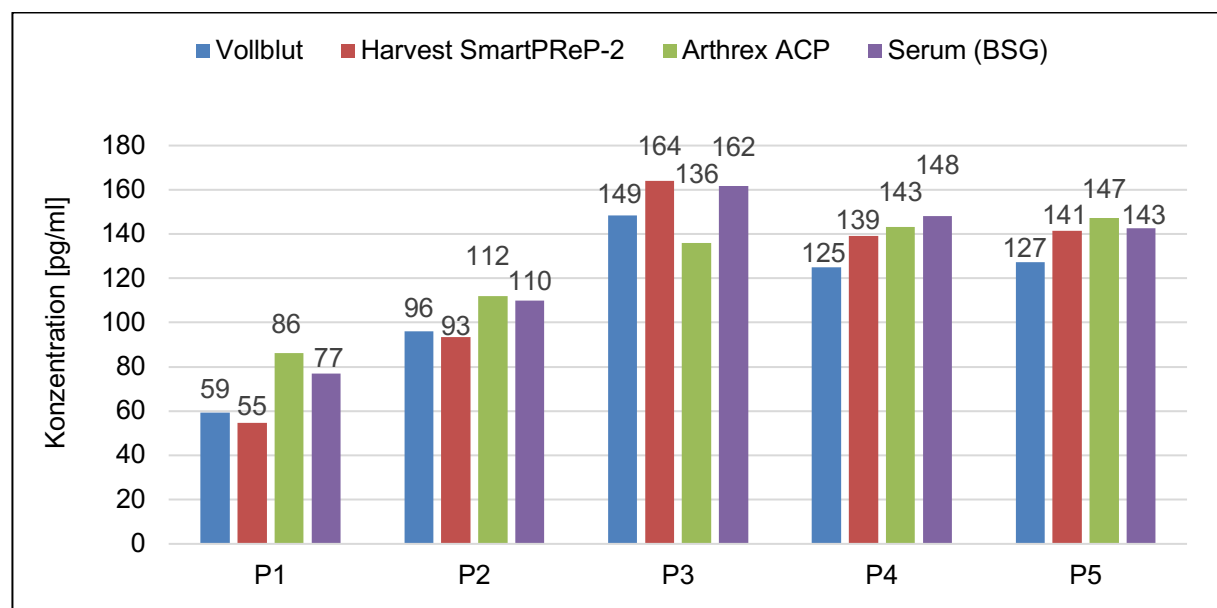


Abb. 20: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 α aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.9 Zytokin IL-1 β

Ebenso wie beim Zytokin IL-1 α war auch das Zytokin IL-1 β (MW \pm SD in pg/ml) in den TKs und im PRP-Pulver nicht detektierbar. In den beiden PRPs nach Arthrex ACP (18 \pm 25 in pg/ml) und Harvest SmartPRP-2 (31 \pm 24 in pg/ml) war es mit einer geringeren Menge als zum Vollblut (42 \pm 16 in pg/ml) messbar. Dies zeigte sich ebenfalls beim Serum aus den BSG-Sedimenten (20 \pm 28 in pg/ml) (s. Abb. 21, Tab. 27).

Tab. 27: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 β aller Proben Gruppen.

Probengruppen	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	42	26	67	\pm 16
Arthrex ACP (n = 5)	18	0	53	\pm 25
Harvest SmartPRP-2 (n = 5)	31	0	60	\pm 24
TK (n = 5)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
PRP-Pulver (n = 1)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
Serum aus BSG (n = 5)	20	0	57	\pm 28

^an.d., nicht detektierbar.

Tab. 28: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Proben Gruppen (n = 5) des Zytokin IL-1 β .

Abhängige Variable		IL-1 β in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	10,85	>,999	-31,64	53,34
	Arthrex	24,47	,844	-18,02	66,96
	TK	42,12	,053	-0,37	84,61
	Serum	21,64	>,999	-20,85	64,13
Harvest	Vollblut	-10,85	>,999	-53,34	31,64
	Arthrex	13,62	>,999	-28,87	56,11
	TK	31,27	,310	-11,22	73,76
	Serum	10,79	>,999	-31,70	53,28
Arthrex	Vollblut	-24,47	,844	-66,96	18,02
	Harvest	-13,62	>,999	-56,11	28,87
	TK	17,65	>,999	-24,84	60,15
	Serum	-2,83	>,999	-45,32	39,67
TK	Vollblut	-42,12	,053	-84,61	0,37
	Harvest	-31,27	,310	-73,76	11,22
	Arthrex	-17,65	>,999	-60,15	24,84
	Serum	-20,48	>,999	-62,97	22,01
Serum	Vollblut	-21,64	>,999	-64,13	20,85
	Harvest	-10,79	>,999	-53,28	31,70
	Arthrex	2,83	>,999	-39,67	45,32
	TK	20,48	>,999	-22,01	62,97

Das BSG-Serum ($p > 0,999$) als auch die beiden PRPs nach Arthrex ACP ($P = 0,844$) und Harvest SmartPreP-2 ($p > 0,999$) zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinkonzentration IL-1 β zur Referenz Vollblut. Selbst unter den beiden PRPs der Herstellung nach Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2 besteht keine repräsentative Differenz ($p > 0,999$). Im Weiteren lässt sich keine deutliche signifikante Abweichung zwischen den TKs und dem PRP nach Harvest SmartPreP-2 ($p = 0,310$) sowie zwischen dem Vollblut und den TKs ($p = 0,053$) feststellen. Alle weiteren Mehrfachvergleiche zwischen den Proben Gruppen legten keine signifikante Unterscheidung ($p > 0,999$) dar (s. Tab. 28).

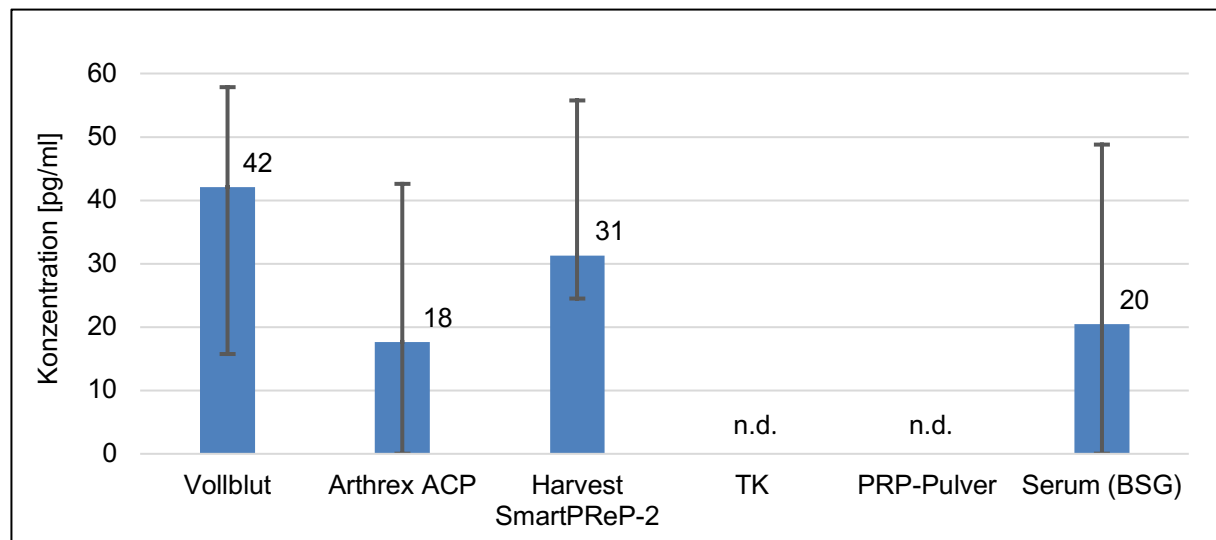


Abb. 21: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 β aller Proben Gruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.

Aufgrund des nicht detektierbaren Zytokin IL-1 β im PRP-Pulver (s. Tab. 27, Abb. 21) waren die berechneten Folgewerte der jeweils zu vergleichenden Proben Gruppe und deren Mittelwerte der Differenz im ungepaarten t-Test gleich null. Somit war eine statistische Gegenüberstellung des PRP-Pulvers mit den anderen Proben Gruppen nicht durchführbar.

Bei den gemessenen Konzentrationen des Zytokins IL-1 β im Probandenvergleich präsentieren sich eindeutige Gegensätze (s. Abb. 22). Nur bei P1 und P2 waren Mengen des Zytokin IL-1 β im BSG-Serum sowie im PRP der Herstellungsmethode nach Arthrex ACP messbar. Dabei weist das Serum aus den BSG-Sedivetten die höchste Konzentration im Probenvergleich bei P1 und P2 auf. Ebenso wird deutlich, dass nur bei P5 im PRP der Herstellung nach Harvest SmartPreP-2 kein Zytokin IL-1 β nachweisbar war. Bei den anderen Testpersonen zeigte sich eine höhere Zytokinkonzentration im PRP nach Harvest SmartPreP-2 als zur Referenz Vollblut, mit Ausnahme von P1 (s. Abb. 22).

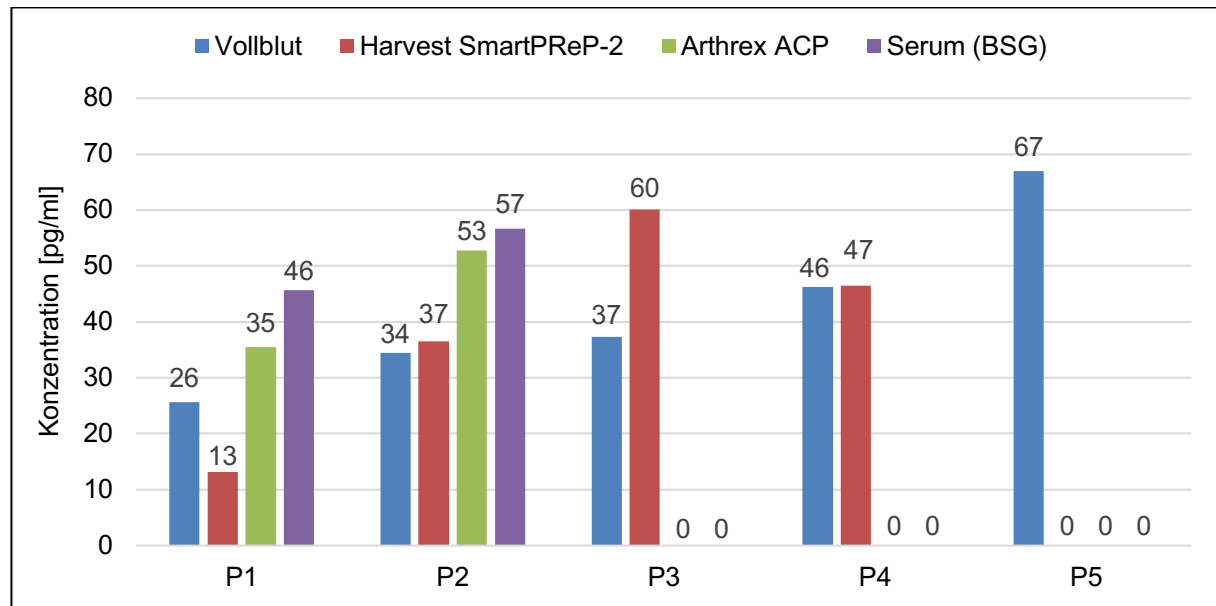


Abb. 22: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1 β aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

3.10 Zytokin IL-1RA

Das Zytokin IL-1RA (MW \pm SD in pg/ml) ließ sich in den TKs und im PRP-Pulver nicht detektieren. Die größten Mengen des Zytokin IL-1RA waren im Vollblut (767 ± 287 in pg/ml) und im PRP nach der Harvest-Methode SmartPreP-2 (473 ± 233 in pg/ml) nachzuweisen. Geringere Konzentrationen ließen sich im BSG-Serum (172 ± 236 in pg/ml) und im PRP der Herstellungsmethode nach Arthrex ACP (104 ± 146 in pg/ml) messen (s. Tab. 29, Abb. 23).

Tab. 29: Datenübersicht der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1RA aller Probengruppen.

Probengruppen	MW in pg/ml	Min. in pg/ml	Max. in pg/ml	SD in pg/ml
Vollblut (n = 5)	767	499	1128	± 287
Arthrex ACP (n = 5)	104	0	305	± 146
Harvest SmartPreP-2 (n = 5)	473	295	833	± 233
TK (n = 5)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
PRP-Pulver (n = 1)	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
Serum aus BSG (n = 5)	172	0	433	± 236

^an.d., nicht detektierbar.

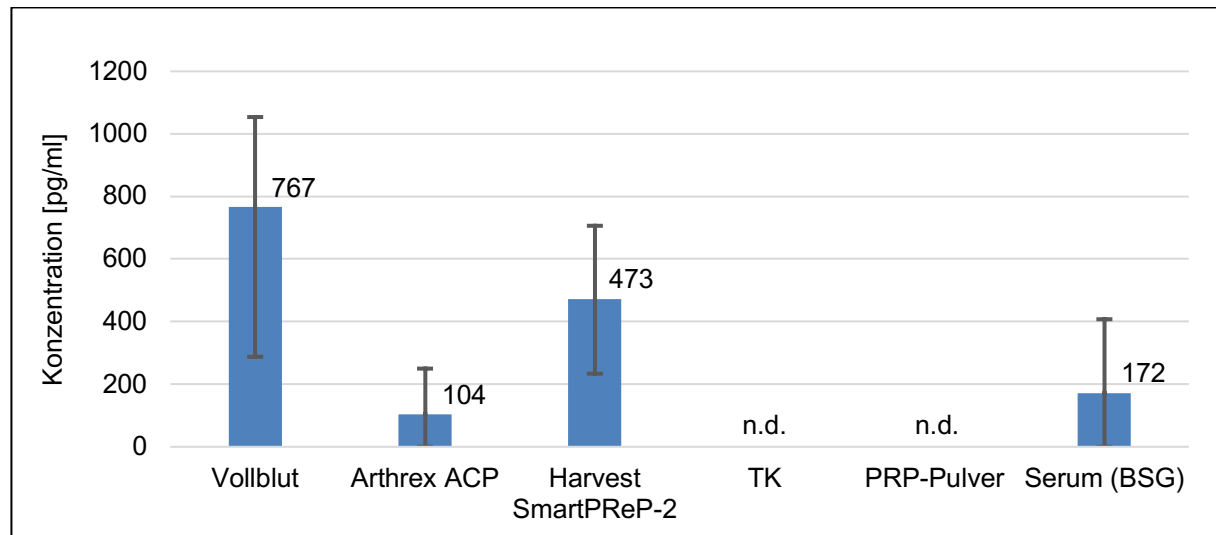


Abb. 23: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1RA aller Probengruppen. Abgebildet wurde der MW als Säule mit Wert und die SD-Range. Abkürzung: n.d., nicht detektierbar.

Tab. 30: Datenübersicht der Mehrfachvergleiche (Bonferroni-Post-hoc-Test) der Probengruppen (n = 5) des Zytokin IL-1RA.

Abhängige Variable		IL-1RA in pg/ml			
(A) Proben (n = 5)	(B) Proben (n = 5)	Mittlere Differenz (A-B)	Signifikanz/ p-Wert	95%-Konfidenzintervall der Differenz	
				Untergrenze	Obergrenze
Vollblut	Harvest	293,72	,362	-118,77	706,22
	Arthrex	662,71	,001 ^a	250,22	1075,21
	TK	766,73	<,001 ^a	354,24	1179,23
	Serum	594,67	,002 ^a	182,17	1007,16
Harvest	Vollblut	-293,72	,362	-706,22	118,77
	Arthrex	368,99	,106	-43,51	781,48
	TK	473,01	,017 ^b	60,51	885,51
	Serum	300,94	,323	-111,55	713,44
Arthrex	Vollblut	-662,71	,001 ^a	-1075,21	-250,22
	Harvest	-368,99	,106	-781,48	43,51
	TK	104,02	>,999	-308,47	516,52
	Serum	-68,04	>,999	-480,54	344,45
TK	Vollblut	-766,73	<,001 ^a	-1179,23	-354,24
	Harvest	-473,01	,017 ^b	-885,51	-60,51
	Arthrex	-104,02	>,999	-516,52	308,47
	Serum	-172,07	>,999	-584,56	240,43
Serum	Vollblut	-594,67	,002 ^a	-1007,16	-182,17
	Harvest	-300,94	,323	-713,44	111,55
	Arthrex	68,04	>,999	-344,45	480,54
	TK	172,07	>,999	-240,43	584,56

^aStatistisch hoch signifikanter Unterschied: $p < .01$

^bStatistisch signifikanter Unterschied: $p < .050$

Im Vergleich zur Referenz Vollblut besteht ein hoch signifikanter Unterschied zu den TKs ($p > 0,001$), dem PRP der Herstellungsmethode nach Arthrex ACP ($p = 0,001$) und dem Serum aus den BSG-Sedimenten ($p = 0,002$). Eine weitere signifikante Abweichung ($p = 0,017$) wird zwischen dem PRP der Herstellung nach Harvest SmartPreP-2 und den TKs deutlich. Keine repräsentativen Divergenzen bestehen hingegen beim PRP nach Harvest SmartPreP-2 zwischen dem PRP nach Arthrex ACP ($p = 0,106$), dem BSG-Serum ($p = 0,323$) sowie dem Vollblut ($p = 0,362$). Auch in den weiteren Mehrfachvergleichen zwischen den Proben Gruppen zeigte sich keine signifikante Differenz ($p > 0,999$) (s. Tab. 30).

Zwischen dem PRP-Pulver und den anderen Proben Gruppen war unter Verwendung des ungepaarten t-Tests ein statistischer Vergleich infolge des nicht detektierbaren Zytokin IL-1RA im PRP-Pulver nicht durchführbar (s. Tab. 29, Abb. 23). Im t-Test weist das PRP-Pulver infolgedessen den Wert null auf, wodurch die fortführenden Berechnungen der jeweils heranziehenden Gruppe und deren Mittelwerte der Differenz ebenfalls den Wert null ergaben.

Die Mengen des Zytokin IL-1RA zeigen nur geringe interindividuelle Differenzen der Testpersonen auf (s. Abb. 24). Allein bei P1 und P2 waren Konzentrationen des IL-1RA im PRP nach Arthrex ACP und im Serum der BSG-Sedimenten detektierbar. Bei P3 bis P5 hingegen waren keine IL-1RA-Mengen messbar. Zwischen P1 und P2 bestehen keine wesentlichen Unterschiede mit Ausnahme von den Zytokinkonzentrationen. Die höchste Zytokinmenge ließ sich in der Referenz Vollblut, gefolgt vom PRP der Herstellungsmethode nach Harvest SmartPreP-2 bei allen Testpersonen nachweisen. Des Weiteren wird erkennbar, dass die Konzentrationen des Zytokin IL-1RA im Vollblut und im PRP nach Harvest SmartPreP-2 bei P1 und P2 annähernd doppelt so hoch sind wie bei den restlichen drei Testpersonen (s. Abb. 24).

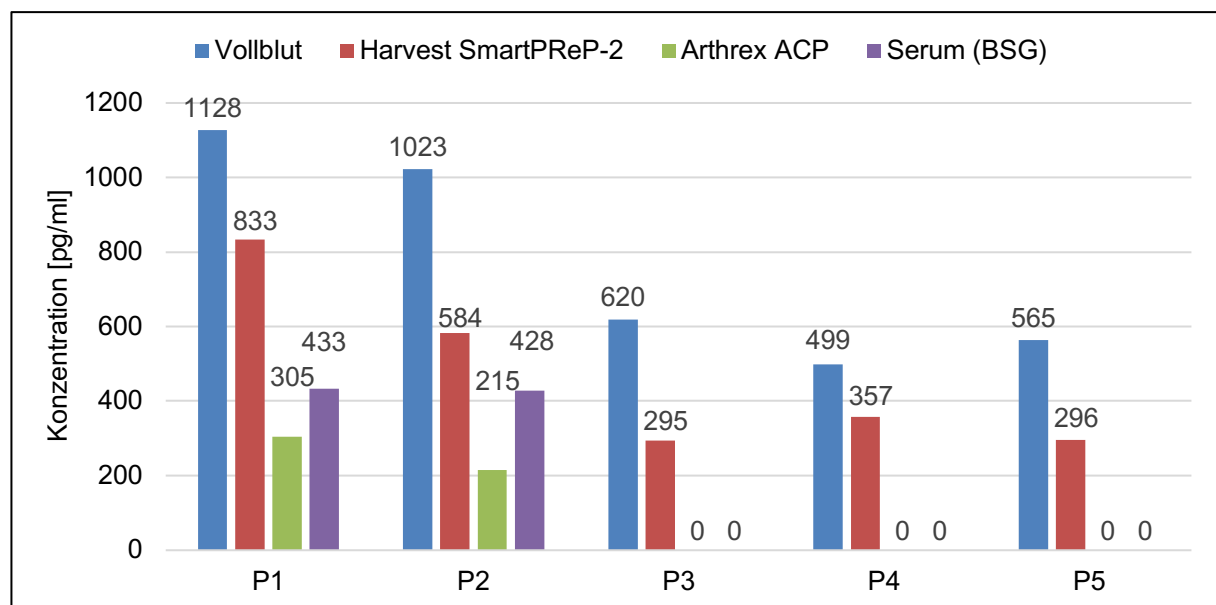


Abb. 24: Datendiagramm der Konzentrationsmengen des Zytokins IL-1RA aller Probanden. Abgebildet wurde die Konzentrationsmenge als Säule mit Wert.

4. Diskussion

Diese Arbeit im Gebiet der medizinischen Grundlagenforschung zeigt eine mögliche Methode zur besseren Standardisierung von PRP durch Herstellen eines direkt verwendbaren und lagerfähigen gepoolten PRP-Pulvers. Die Wachstumsfaktorzusammensetzung des PRP-Pulvers ist mit "klassischen" etablierten PRP-Produkten wie beispielsweise dem PRP nach Arthrex ACP oder Harvest SmartPreP-2 vergleichbar und könnte durch Erhöhen oder Verringern der verwendeten Pulvermenge individuell eingestellt werden.

Übliche PRP-Produkte unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und damit in ihrer biologischen Wirksamkeit. Unterschiede in den Ergebnissen klinischer Studien mit PRP können auf die zahlreichen verschiedenen PRP-Formulierungen zurückgeführt werden (72,115,116). Dies liefert unzureichende Evidenz für Metaanalysen sowie systematische Rezensionen, obwohl sich die Qualität klinischer Studien in den letzten Jahren verbessert hat (38,117–119).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es demzufolge, ein PRP-Derivat zu entwickeln, das hinsichtlich der WF-Konzentrationen sowie der Anzahl der Erythrozyten und Leukozyten standardisiert (31), als auch die Konsensaufforderung zur Standardisierung von PRP durch Kompensation der inter- und intraindividuellen Variabilität erfüllt (26,38). Es kann demnach standardisierte Studien zu den Auswirkungen von PRP zulassen, wodurch die Heterogenität aktueller experimenteller und klinischer Studien reduziert wird. Ein Vergleich von Mazzocca et al. zeigte große Unterschiede in der intraindividuellen Anzahl von Thrombozyten und Zellzahlen in 3 verschiedenen PRP-Herstellungssystemen (11). Dies ließ sich in dieser Studie ebenfalls darlegen. Es ist unklar, ob diese intraindividuellen Unterschiede, unabhängig von den Aufbereitungsmethoden, an individuelle Entzündungs- oder Heilungsprozessen angepasst oder für die Regeneration von Gewebe optimal sind, da auch die zeitliche Abstimmung eine wichtige Rolle spielt (120–122).

Die Standardisierung und der Vergleich von Grundlagenforschungen sowie klinischen Studien zu PRP, die für eine evidenzbasierte Medizin erforderlich sind, scheinen in Anbetracht der veröffentlichten wissenschaftlichen Daten zu PRP eine weit entfernte Vorstellung von Mazzocca et al. zu sein (11). Das PRP-Pulver erfüllt die Kriterien für einen standardisierten Herstellungsprozess und könnte unter Bezugnahme allgemein akzeptierter Klassifikationen wie folgt eingeordnet werden: 1.) PAW-Klassifizierungssystem (76) oder 2.) P-PRP (37,75).

Thrombozyten wurden seit ungefähr 60 Jahren lyophilisiert. Die Studie ist jedoch die erste, die die Lyophilisierung menschlicher Blutplättchen mit dem Ziel beschreibt, die Regeneration von Weichgewebe in der Sportmedizin zu beschleunigen (123). Frühere Ansätze waren auf militärische Opfer zurückzuführen und zielten darauf ab, die Blutung bei hämorrhagischen Patienten zu kontrollieren und die Wundheilung zu fördern (123,124). Im Gegensatz zu den positiven Wirkungen der lokalen (d.h. intratendinösen, peritendinösen oder intramuskulären)

Injektionen in der Sport- und Regenerationsmedizin waren diese Anwendungen entweder intravenös oder topisch.

4.1 Diskussion der Methoden

In dieser Studie wurden Proben von Vollblut, Serum aus BSG-Sedimenten, PRP der Herstellung nach Arthrex ACP und Harvest SmartPRP-2 von fünf männlichen Probanden in einem Alter von 27 bis 34 Jahren (MW $31 \pm 3,21$ Jahren) sowie fünf TKs von unbekannten Spendern nach der Gewinnung kryokonserviert. Um bei allen Probengruppen die Gerinnung der Thrombozyten zu verhindern, erfolgte eine einheitliche Verwendung von Citrat als Antikoagulant, um gleiche Ausgangsbedingungen zur Datenerhebung und deren Validität zu schaffen.

Unmittelbar vor der Konzentrationsbestimmung der WF und Zytokine mit Hilfe der Sandwich-ELISA-Assays wurden die Proben aufgetaut. Die Freisetzung der zellulären Inhaltsstoffe erfolgte mit der angewendeten Methode des Einfrieren-Auftauens, die eine geringe mechanische Belastung verursacht und als ein Standardverfahren zur Messung von Wachstumsfaktoren in vitro angesehen werden kann. Hier bewirkt dieser Prozess das Zerreißen der Thrombozytenmembran und die anschließende Freisetzung von Wachstumsfaktoren (125,126). Diese Methode ist in seiner Anwendung pragmatisch und einfach durchzuführen.

Um alle Proben unterschiedlicher Herstellungsmethoden und Herkunft valide vergleichen zu können, wurden sechs Wachstumsfaktoren und drei Zytokine mittels humanen ELISA-Kits zur Konzentrationsbestimmung ausgewählt und analysiert. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt, um eine hohe Datenqualität sicherzustellen.

Die WF-Konzentrationen können pro Milligramm des PRP-Pulvers oder nach Resuspension des PRP-Pulvers in pg/ml gemessen werden. Ein Vorteil von PRP-Pulver besteht darin, dass durch Änderung der aufgetragenen Pulvermenge die Konzentration an WF leicht geändert werden kann, da das PRP-Pulver in ausreichender Menge verfügbar ist. Demzufolge kann die WF-Konzentration an die klinischen Anforderungen angepasst werden. Das Bestreben nach sehr großen Thrombozytenzahlen ist nicht immer gerechtfertigt und hängt nicht direkt mit der Verbesserung der Heilung in vivo zusammen.

Als limitierende Faktoren dieser experimentellen Arbeit sind die geringe Anzahl an Teilnehmern als auch die durchgängig männliche Kohorte zu nennen. Des Weiteren stellt das zur Verfügung gestellte PRP-Pulver der Firma DOT GmbH aus nur einer Charge, bestehend aus einem Pool von zwölf TKs, einen weiteren limitierenden Faktor dar. Die Konzentrationsbestimmung wurde dreifach optisch gemessen, um eine hohe Datenqualität sicherzustellen. Infolgedessen war die statistische Analyse beim PRP-Pulver beschränkt und nur die Berechnung einer technischen Abweichung anstelle einer Standardabweichung möglich. Im Weiteren wurde das PRP-Pulver mit nur zwei herkömmlichen PRP-Herstellungskits, Harvest SmartPRP-2 sowie Arthrex ACP, verglichen und nicht mit

weiteren "klassischen" PRP-Herstellungssystemen. Eine mögliche Fehlerquelle kann zudem eine unterbrochene Kühlkette im Transport der humanen ELISA-Kits sein, die zu fehlerhaften ELISAs führen könnte und somit zu verfälschten Ergebnissen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie präsentiert die hämatologische Analyse des Vollbluts der fünf Spender annähernd gleiche Werte, die im Normbereich liegen. Die Hämatokritwerte der Probanden 1 bis 5 betrugen 48%, 42%, 47%, 48% bzw. 45% (s. Tab. 6). Erkrankungen wie beispielsweise eine Anämie oder Infektion zeigten sich nicht.

In den Hämogrammen weisen die beiden herkömmlichen PRP-Herstellungssets unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen zur Referenz Vollblut auf. Die PRP-Herstellung nach Harvest SmartPreP-2 zeigt eine 4,15-fach höhere Thrombozytenaufkonzentration gegenüber der PRP-Herstellungsmethode nach Arthrex ACP ($901 \pm 66,27$ vs. $217 \pm 27,81 \times 10^9/L$) und eine 4-fache zum Vollblut ($901 \pm 66,27$ vs. $223 \pm 19,3 \times 10^9/L$) auf. In den Studien von Weibrich et al. sowie Fitzpatrick et al. zeigt sich eine etwa 4,5-fache Thrombozytenanreicherungen im PRP nach Harvest SmartPreP-2 zum Vollblut (127,128). Bei der PRP-Herstellung nach Arthrex ACP zeigt sich in dieser Studie eine minimale Abnahme der Thrombozyten auf das 0,97-fache verglichen zur Referenz Vollblut ($217 \pm 27,81$ vs. $223 \pm 19,3 \times 10^9/L$) (s. Tab. 7). Die Studien von Magalon et al. und Fitzpatrick et al. präsentieren dagegen eine 1,31-fache und 1,53-fache Aufkonzentration der Thrombozyten im PRP nach Arthrex ACP zum Vollblut (128,129). Gegenüber beiden herkömmlichen PRP-Herstellungssets, ebenso dem Vollblut, weisen die TKs höhere Konzentrationen an Thrombozyten auf, was infolge des komplexen und zeitlich aufwendigerem Herstellungsprozesses mit Hilfe der Apherese reproduzierbar ist (s. Tab. 7). Bei den Erythrozyten lässt sich dagegen eine drastische Reduzierung bei beiden PRP-Herstellungsmethoden (Arthrex: Faktor 0,008x / $0,04 \pm 0,02$ vs. $5,19 \pm 0,3 \times 10^{12}/L$; Harvest: Faktor 0,18x / $0,91 \pm 0,32$ vs. $5,19 \pm 0,3 \times 10^{12}/L$) dem gegenübergestellten Vollblut feststellen. Ähnliche Resultate legen Magalon et al. sowie Fitzpatrick et al. in ihren wissenschaftlichen Arbeiten dar (128,129). Eine komplette Entfernung der Erythrozyten ließ sich bei allen fünf Probanden in beiden PRP-Herstellungssets nicht feststellen (s. Tab. 7). Ursache für die unterschiedlichen verbliebenen Erythrozytenzahlen in beiden PRPs sind die verschiedenen Arbeitsvorgänge während des PRP-Herstellungsprozesses gemäß dem PRP-Herstellungssystem.

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden PRP-Herstellungskits wird bei der Anzahl der Leukozyten deutlich. Das PRP nach Harvest SmartPreP-2 enthielt die Buffy Coat Fraktion, die leukozyten- und thrombozytenreich ist und dadurch eine 2,4-fach höhere Leukozytenzahl gegenüber der Referenz Vollblut ($15,96 \pm 4,09$ vs. $6,56 \pm 0,26 \times 10^9/L$) aufweist. Ein ähnliches Ergebnis präsentiert Fitzpatrick et al. mit einer 2,8-fachen Leukozytenanreicherung beim PRP nach Harvest SmartPreP-2 (128). Beim PRP nach Arthrex ACP zeigt sich dies gegensätzlich zum Vollblut ($1,63 \pm 0,97$ vs. $6,56 \pm 0,26 \times 10^9/L$) mit einem 0,25-fachem Faktor (s. Tab. 7). Eine größere Leukozytenreduktion weisen dagegen die beiden Arbeiten

von Magalon et al. (0,06-fache) und Fitzpatrick et al. (0,15-fache) beim PRP nach Arthrex ACP gegenüber dem Vollblut auf (128,129).

Zellzahlen im Serum aus den BSG-Sedimenten wurden mit dem Messgerät nicht ermittelt. Alle korpuskulären Bestandteile sind innerhalb von 2 Stunden in der senkrechtstehenden Position der BSG-Sedimenten abgesunken, so dass keine Zellen mehr im Serum enthalten waren. Dennoch waren einige WF im Serum aus den BSG-Sedimenten in den ELISAs nachweisbar. Das im Blut enthaltene Thrombin aktivierte offenbar die Freisetzung einiger WF aus den Thrombozyten ins Serum.

An den Hämogrammen dieser Studie wird deutlich, dass die beiden herkömmlichen PRP-Herstellungssets keine einheitliche Standardisierung aufgrund der großen individuellen und intraindividuellen Konzentrationsschwankungen aufweisen (s. Tab. 7). Dies belegen zugleich andere Studien sowie die dadurch aufgekommene Anstrengung, nach einer einheitlichen Standardisierung zu streben (11,128,129). Eine Standardisierung des PRP-Pulvers wurde durch Apherese und Zusammenfügen der erzeugten Suspensionen aus den einzelnen zwölf TKs der verschiedenen Spender erreicht. Durch das Poolen aller Suspensionen wurde eine große Ausgangsmenge zur Herstellung des PRP-Pulvers erzeugt ebenso bestehende Unterschiede und spenderbedingte Schwankungen zwischen den einzelnen Spendern eliminiert, wie z. B. unterschiedliche Thrombozytenzahlen. Infolgedessen konnte durch die anschließende Lyophilisierung des Suspensionspools eine Charge von identischen 1000 Präparaten mit bekannten WF-Konzentrationen aus zwölf TKs hergestellt werden (Abb. 6). Das PRP-Pulver erfüllt somit die Konsensaufforderung zur Standardisierung von PRP durch die Kompensation der inter- und intraindividuellen Variabilität (26,38).

Die Daten der deskriptiven Analyse dieser experimentellen Studie zeigten, dass das PRP-Pulver stets höhere WF-Konzentrationen von VEGF (s. Abb. 7), FGF-2 (s. Abb. 9), PDGF-AB (s. Abb. 11) und TGF- β 1 (s. Abb. 13) gegenüber zwei regulären kommerziellen PRP-Herstellungssystemen (Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2), dem TK, dem Serum aus BSG-Sedimenten und zur Referenz Vollblut beibehielt. Die abschließende Statistik zeigt im Weiteren, dass mehrheitlich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen dem PRP-Pulver und den herkömmlichen PRP-Herstellungsmethoden nach Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2 sowie zum Vollblut für die WF VEGF (s. Tab. 9), FGF-2 (s. Tab. 12), PDGF-AB (s. Tab. 15), TGF- β 1 (s. Tab. 18) und IGF-BP3 (s. Tab. 23) bestehen. Das PRP-Pulver lässt im Vergleich zum TK keine eindeutige signifikante Differenz ($p < 0,1$) für die WF VEGF (s. Tab. 9) und PDGF-AB (s. Tab. 15) erkennen. Zwischen dem PRP-Pulver und dem PRP nach Harvest SmartPreP-2 bestehen keine signifikanten Abweichungen für die WF FGF-2 ($p = 0,318$) und TGF- β 1 ($p = 0,185$).

Im Gegensatz zum PRP-Pulver erzeugten die PRP-Herstellungskits von Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2 große Schwankungen in den Konzentrationen der WF VEGF (s. Abb. 7) und FGF-2 (s. Abb. 9), wie es ebenfalls weitere Studien berichten (32,35,129). Die Mengen der WF VEGF, FGF-2 und IGF-1 waren besonders abhängig vom Spender, wobei sich zwischen den einzelnen WF-Werten des Vollbluts und PRPs nach beiden kommerziellen Herstellungssystemen große interindividuelle Unterschiede zeigten (s. Abb. 8, Abb. 10, Abb. 16). Das PRP-Pulver weist dagegen keine Schwankungen auf, da es

standardisiert ist. Eine signifikante Differenz lässt sich in den Daten dieser Arbeit zwischen den beiden herkömmlichen PRP-Herstellungssystemen für die WF VEGF und FGF-2 nicht feststellen ($p > 0,999$). Der WF VEGF ist für die Angiogenese und Lymphangiogenese verantwortlich. Der WF FGF-2 spielt eine Rolle bei der Zellproliferation und Angiogenese. Demzufolge könnten diese Unterschiede die verschiedenen Resultate nach Behandlungen mit PRP-Präparaten erklären (130–132).

Nachweislich signifikant ($p < 0,01$) höhere PDGF-AB- und TGF- β 1-Konzentrationen zeigten das PRP nach Harvest SmartPReP-2 und das TK gegenüber dem Vollblut (s. Tab. 16, Tab. 19). Außerdem auffällig war die etwa 5-fach erhöhte TGF- β 1-Anreicherung beim PRP-Pulver, PRP nach Harvest SmartPReP-2 und TK im Verhältnis zum Vollblut (s. Abb. 13). Gegensätzlich dazu schienen die WF-Konzentrationen PDGF-AB und TGF- β 1 von der PRP-Aufbereitungsmethode nach Arthrex ACP und Harvest SmartPReP-2 nicht wesentlich betroffen zu sein. Selbst der Einfrier- und Auftauprozess konnte den WF PDGF-AB nicht zerstören. Diese Informationen könnten darauf hindeuten, dass mechanischer Stress während der Herstellung von PRP für die Freisetzung des PDGF-AB wichtiger ist als die Aktivierung durch Thrombin und Calciumchlorid (142). Es besteht Einigkeit darüber, dass die Aktivierungsmethode zur Degranulation von Thrombozyten zu unterschiedlichen WF-Mengen führen kann. Außerdem ist die Messung von WF-Konzentrationen schwierig (134,135). Daher kann die Methode des Einfrieren-Auftauens zur Bestimmung von WF in vitro als Standardverfahren angesehen werden (126). Obwohl sich die wahren Werte unterschieden, erhöhte ein Anstieg der mechanischen Belastung die PDGF-Konzentrationen (136). Im Gegensatz zu den Daten von Kushida et al. zeigte der WF TGF- β 1 (s. Abb. 13) eine homogene Verteilung zwischen den einzelnen Proben und eine annähernd direkte Korrelation mit den Konzentrationen von PDGF (s. Abb. 11) (32). Die demonstrierten Daten in dieser Arbeit stützen die Hypothese nicht, dass die Konzentrationen von PDGF-AB und TGF- β 1 in Konzentrationen mit Leukozyten höher sind (143), da die Konzentrationen von PDGF-AB und TGF- β 1 im PRP-Pulver sowie in den TKs höher sind als im leukozytenreichem PRP nach Harvest SmartPReP-2 (s. Abb. 11, Abb. 13).

Die höchsten WF-Konzentrationen an IGF-1 zeigen das Vollblut (2317 ± 711 pg/ml) und das TK (2266 ± 485 pg/ml). Unerwartet wurden die Konzentrationen des WF IGF-1 in der PRP-Herstellung nach Harvest SmartPReP-2 (1539 ± 348 pg/ml) und Arthrex ACP (1234 ± 823 pg/ml) gegenüber dem Vollblut (2317 ± 711 pg/ml) gesenkt (s. Abb. 15). In der Studie von Weibrich et al. zeigt sich dagegen beim PRP nach Harvest SmartPReP eine deutlich höhere Menge an IGF-1 (91400 ± 21300 pg/ml) (127). Im PRP-Pulver hingegen wurde kein IGF-1 detektiert (s. Abb. 15). Eine Ursache dafür könnte sein, dass die wenig vorhandene freie Form des WF IGF-1 in seiner Proteinstruktur während des Lyophilisierungsprozesses bei der Herstellung des PRP-Pulvers denaturierte und der andere unfreie Anteil am WF IGF-BP3 gebunden war (3,48). Der WF IGF-BP3 war dagegen in geringen Konzentrationen im PRP-Pulver (6123 ± 344 pg/ml) nachweisbar (s. Abb. 17, Tab. 22). Des Weiteren waren die IGF-BP3-Mengen im PRP nach Arthrex ACP und im TK signifikant ($p < 0,05$) höher als zur Referenz Vollblut (s. Tab. 24).

Im übrigen waren Abweichungen zwischen dem PRP nach Harvest SmartPReP-2 und dem TK für die WF VEGF, PDGF-AB, IGF-1 und IGF-BP3 erkennbar, wobei die größeren Mengen beim TK zu verzeichnen waren (s. Abb. 7, Abb. 11, Abb. 15, Abb. 17). Die niedrigste

Konzentration zeigte das TK beim WF FGF-2 (s. Abb. 9). Bei den WF PDGF-AB, TGF- β 1 und IGF-BP3 weisen die beiden herkömmlichen PRP-Herstellungssysteme Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2 zum Teil erwartend signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) auf (s. Tab. 16, Tab. 19, Tab. 24). Deutlich verschiedene WF-Konzentrationen präsentieren dagegen Magalon et al. im PRP nach Arthrex ACP bei PDGF-AB und TGF- β 1 sowohl Weibrich et al. im PRP nach Harvest SmartPreP bei PDGF-AB im Vergleich zu den Daten dieser Arbeit (129,127). Eine annähernd gleiche TGF- β 1-Konzentration weist wiederum das PRP nach Harvest SmartPreP in Weibrich et al. mit dieser Studie auf (127).

Bei den Zytokinen bestanden indessen keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden herkömmlichen PRP-Aufbereitungsmethoden (s. Tab. 26, Tab. 28, Tab. 30). Oh et al. haben kürzlich verschiedene Zytokinspiegel beim Vergleich grundlegender Präparationstechniken veranschaulicht, die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigten sowie der Mittelwert niedriger war als die der Kontrollgruppe Vollblut. Außerdem korrelierte die IL-1-Konzentration nicht mit der Leukozyten- oder Thrombozytenkonzentration (137). Dass das standardisierte PRP effizienter ist als die derzeit erhältlichen kommerziellen Kits, zeigte Kreuz et al. (138). Die Zytokine IL-1 α und IL-1 β , ein katabolischer Faktor, blieben bei der PRP-Herstellung nach Harvest SmartPreP-2 ungefähr auf Vollblutkonzentration, schienen jedoch im TK und im PRP-Pulver entweder durch Gammastrahlensterilisation und/oder Lyophilisierung zerstört worden zu sein (s. Abb. 19 und Abb. 21). Die einzigen signifikanten Unterschiede ($p < 0,01$) verzeichnet das TK beim Zytokin IL-1 α zu den anderen Probengruppen mit Ausnahme vom PRP-Pulver (s. Tab. 26). Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit denen von McCarrel und Fortier überein (122). Zugleich war das Zytokine IL-1RA im PRP-Pulver und TK nicht detektierbar. Es kann gleichermaßen angenommen werden, dass es durch den Gammastrahlensterilisations- und/oder Lyophilisierungsprozess zerstört wurde. Die höchste IL-1RA-Konzentration wurde im Vollblut gemessen sowie geringe Mengen in beiden herkömmlichen PRP-Herstellungskits und im BSG-Serum (s. Abb. 23). Eine bestehende Signifikanz ($p < 0,05$) wird deutlich zwischen dem Vollblut in Bezug zum PRP nach Arthrex ACP, TK und dem Serum aus den BSG-Sedimenten. Eine weitere signifikante Differenz ($p < 0,05$) liegt zwischen dem PRP nach Harvest SmartPreP-2 und den TKs vor (s. Tab. 30). Da keine Zytokine im PRP-Pulver detektierbar waren, können keine Aussagen über eine bestehende Signifikanz des PRP-Pulvers gegenüber den anderen Probengruppen erhoben werden.

Aufgrund des Studiendesigns kann in dieser experimentellen Studie keine Vorhersage über die Aktivität der WF im biologischen Umfeld getätigt werden. McCarrel und Fortier zeigten jedoch in einem Tiermodell, dass lyophilisierte Thrombozyten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Applikation zu einer verstärkten Freisetzung von WF, gefolgt von einem stabilen niedrigen Niveau führten (122). Im Gegensatz dazu zeigt das PRP nach Harvest SmartPreP-2 im Zeitverlauf zumindest einen Trend zu höheren WF.

Da viele weitere WF im Blut vorhanden sind, muss die In-vivo-Bioaktivität in weiteren Grundlagenforschungen und klinischen Studien bewertet werden. Es bleibt zudem unklar, ob Nicht-Blutgruppen-identische TKs eine relevante Immunmodulation bewirken können. Obwohl die Erythrozyten während der Verarbeitung vollständig entfernt wurden, sollte das

Potenzial der Immunreaktion gegen Rhesus negativ (RhD) bei Schwangeren analysiert werden. Für klinische Anwendungen ist Sicherheit von größter Bedeutung. PRP gilt aufgrund seines autologen Charakters für die Anwendung ohne nachteilige Wirkungen wie allergische Reaktionen und Hautnekrosen als sicher (139,140). Als Lösung für die zuvor genannten widersprüchlichen Beweise und klinischen Ergebnisse berücksichtigen Experten allogene PRP-Produkte (141). Das in dieser Arbeit vorgestellte gepoolte PRP-Pulver ist heterologen Ursprungs und könnte eine allergische Immunreaktion auslösen. Es besteht auch die Möglichkeit der Übertragung von infektiösen und ansteckenden Krankheiten (142). Daher sind spezifische Maßnahmen erforderlich, um das allergene Potenzial zu reduzieren und alle Krankheitserreger zu inaktivieren. Demzufolge umfasst die Produktion des PRP-Pulvers Gegenmaßnahmen gegen Immunreaktionen (28). Um diese Bedenken auszuräumen, wurde bei jedem verwendeten TK in dieser Studie eine Leukozytendepletion durchgeführt (143). Zusätzlich wurden alle zwölf TKs vor der Verarbeitung einmalig mit 30 Gy gammabestrahlt, was die transfusions-assoziierte Graft-versus-Host-Reaktion (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion) verhindern sollte (101,144). Im weiteren Herstellungsprozess wurden die Thrombozyten durch geeignete Verfahren aus dem Plasma und den verschiedenen Plasmaproteinen getrennt. Durch die Verarbeitung der TKs zu PRP-Pulver wurden zudem Infektionserreger entfernt und durch die Waschvorgänge der Proteingehalt reduziert, was zu allergischen Reaktionen führen könnte. Die WF-Konzentrationen wurden durch die Leukozytendepletion und die Gammastrahlensterilisation nicht negativ beeinflusst. Ebenso in Übereinstimmung mit Pan et al. zeigen die vorgelegten Daten, dass die WF-Konzentration durch die Lyophilisierung nicht beeinträchtigt wurde (145). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass alle potenziell allergenen Proteine durch Verarbeitung von TKs zu einer Trockensubstanz wie dem getesteten PRP-Pulver denaturiert werden. Bode und Fischer nannten fixierte und gefriergetrocknete Thrombozyten sogar als das erste wirklich sterile zelluläre Transfusionsprodukt, weil gezeigt wurde, dass der Prozess Viren und Bakterien zerstört (123). In einem interspezifischen Tiermodell wurden nach mehrfacher intravenöser Infusion von lyophilisierten Blutplättchen bei Hunden keine Antikörper detektiert (146). Dies muss jedoch in weiteren Studien bestätigt werden. Darüber hinaus fanden Anitua et al. eine indirekte Korrelation zwischen höheren Leukozytenkonzentrationen und der Biosicherheit (147,148). Leukozyten erhöhen die Expression von katabolischen Signalmolekülen (149). Da PRP-Pulver keine Erythrozyten oder Leukozyten enthält, können im Vergleich zu PRP-Präparaten nach Harvest und Arthrex in vivo weniger unerwünschte Ereignisse wie Schmerzen und Schwellungen auftreten.

Im Weiteren ist angesichts des allogenen Charakters des PRP-Pulvers ein Risikoausschluss zur Entstehung maligner Tumore notwendig sowie eine eingehende Prüfung der Produktsicherheit vor dem breiten Einsatz in der Klinik erforderlich. Denn WF haben außerdem in der Bildung von Tumoren einen wesentlichen Einfluss auf Proliferation, Malignität und Metastasierung von Tumorzellen (40). Ebenfalls ist die Beeinflussung einer rekombinanten Genexpression auszuschließen. Denn die Anwendung von bakteriell hergestellten rekombinanten WF zeigte ein erhöhtes Risiko in der Bildung von Immunogenitäten und eine geringe Produktstabilität (27,150). Ferner war das Fehlen weiterer Chargen des PRP-Pulvers eine limitierende Größe in der statistischen Auswertung dieser Studie.

5. Ausblick

Das PRP-Pulver eröffnet neue Möglichkeiten in der PRP-Grundlagenforschung und in der klinischen Anwendung. Die bekannten Probleme des üblichen PRPs wie fehlende Standardisierung sowie Mangel an Konsistenz in Studien können durch das PRP-Pulver behoben werden. Es lässt zudem eine bessere Vergleichbarkeit von klinischen Studien sowie Spezifikation von Softwaretests (z. B. Black-Box-Tests) aufgrund der standardisierten Wachstumsfaktorkonzentration zu. Somit sind jetzt definierte Behandlungen ohne intra- und interindividuelle Schwankungen potentiell möglich.

Ein Vorteil des PRP-Pulvers liegt in der sofortigen Verfügbarkeit ohne nennenswerte Blutverarbeitung. Je nach Methode dauert die Herstellung von PRP etwa 10 bis 20 Minuten und erfordert eine Zentrifuge. Das PRP-Pulver wäre in der klinischen Praxis sofort verfügbar und damit das schnellste aller PRP-Kits. Dies könnte außerdem zu einer Kosteneffizienz führen. Einige Autoren empfehlen die Verwendung von PRP innerhalb von drei Stunden nach dessen Herstellung, da sich im Laufe der Zeit die Bioaktivität von Thrombozyten verändert (139). Das PRP-Pulver könnte dagegen bis zu zwölf Monate gelagert und Injektionen jederzeit nach Resuspension durchgeführt werden, wodurch die Verabreichung während der Wundheilungsphase ermöglicht werden würde. Darüber hinaus ist die Verwendung für Spitzensportler während einer Trainings- oder Wettkampfreise einfacher, da keine Zentrifuge transportiert werden müsste.

Im Weiteren gibt es Daten, die die Hypothese bekräftigen, dass hitzeempfindliche Plasmaproteine (z. B. Komplementfaktoren) anstelle von Thrombozyten oder Leukozyten für eine antibakterielle Aktivität verantwortlich sind (120). Interessanterweise zeigten ähnliche Produkte wie das untersuchte PRP-Pulver, dass diese Fähigkeit auch nach der Verarbeitung von Thrombozytenkonzentraten zu PRP-Pulver erhalten bleibt (120,151). Anstelle der Übertragung von Infektionskrankheiten können einige PRP-Derivate bakterizide Eigenschaften gegen einige Bakterienstämme wie *Escherichia coli* aufweisen. Dies könnte zu erweiterten Indikationen für die klinische Anwendung führen, die über die Sportmedizin hinausgehen, wie z. B. zur Wundheilung. Trotz Fortschritten beim Verständnis von PRP gibt es noch viele Variablen, die die Behandlung bei Erkrankungen des Bewegungsapparates beeinflussen und somit berücksichtigt werden müssen (72). Bereits im Anschluss dieser experimentellen Studie erfolgten erste Zellkulturversuche an Chondrozyten mit dem PRP-Pulver. Diese zeigten eine positive Wirkung auf die Zellproliferation der Chondrozyten (152). Ferner kann möglicherweise die Grundsubstanz zur weiteren Sequenzierung und Herstellung einzelner Wachstumsfaktorpräparate oder zur Fertigung von individuell angepassten Wachstumsfaktorpräparaten mit verschiedenen Wachstumsfaktorkonzentrationen, die optimal auf die jeweilige Pathologie zur besseren Heilung abgestimmt sind, genutzt werden.

Vor dem routinemäßigen klinischen Einsatz müssen regulatorische Fragen geklärt werden. Die Behörden in den USA sowie der Europäischen Union müssen festlegen, ob dieses

Produkt unter das Bluttransfusionsgesetz fällt und als Arzneimittel oder Medizinprodukt gelten kann.

Zusammenfassung

Die Anwendung von autologen Wachstumsfaktoren (WF) in Form von Thrombozytenreichem Plasma (Platelet-Rich Plasma/PRP) rückte in den letzten zwei Jahrzehnten immer mehr in den Fokus der Medizin und ist in der Sportorthopädie in der Therapie bei Arthrose, Sehnenerkrankungen, Muskelverletzungen und Knochenheilungsstörungen weit verbreitet. Die bisherige Herstellung von PRP folgte keiner festen Standardisierung und zeigt daher stark schwankende Konzentrationen von WF sowohl intra- als auch interindividuell. Die Gründe hierfür sind vielfältig, u.a. verschiedene Herstellungssysteme, biologische Varianz und diverse PRP-Formulierungen. Die Frage nach der dringend benötigten Standardisierung ist daher bislang nicht gelöst. Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig in der vorliegenden Studie ein standardisiert hergestelltes Wachstumsfaktorpräparat aus allogenen Thrombozytenkonzentraten (TK) mit der Benennung PRP-Pulver (Fa. DOT GmbH, Rostock, DEU) im Vergleich zu herkömmlichen PRP-Herstellungsmethoden zu untersuchen und auszuwerten. Durch das Zusammenfassen und Verarbeiten von zwölf allogenen TK wurde eine homogene Trockensubstanz hergestellt, die durch Resuspendierung mit Natriumchlorid ungefähr 1000 identische "klassische" PRP-Anwendungen von jeweils 3 ml liefert.

Insgesamt wurden sechs verschiedene WF-Konzentrate verglichen: PRP-Pulver ($n = 1$), allogene TK ($n = 5$), Vollblut ($n = 5$), Serum aus BSG-Sedimenten (Serum-BSG, $n = 5$), PRP nach Harvest SmartPreP-2 ($n = 5$) und PRP nach Arthrex ACP ($n = 5$). Es erfolgte eine hämatologische Analyse der Proben Gruppen auf Anzahl der enthaltenen Erythro-, Leuko- und Thrombozyten. Im Weiteren wurden die WF-Konzentrationen des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor - 2 (FGF-2), Platelet-Derived Growth Factor - AB (PDGF-AB), Transforming Growth Factor - beta 1 (TGF- β 1), Insulin-like Growth Factor - 1 (IGF-1) und Insulin-like Growth Faktor - Binding Protein 3 (IGF-BP3) sowie der Zytokine Interleukin - 1 alpha (IL-1 α), Interleukin - 1 beta (IL-1 β) und Interleukin - 1 Receptor Antagonist (IL-1RA) mit Hilfe von Sandwich-ELISA-Assays (Fa. R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK) bestimmt. Die daraus resultierten Messdaten wurden anschließend deskriptiv mit dem Programm Excel (Fa. Microsoft Corp. Redmond, USA) dargestellt und in der schließenden Statistik von gepaarten Mehrfachvergleichen unter Verwendung der Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Bonferroni-Post-hoc-Test sowie dem ungepaarten t-Test im Programm SPSS 20.0 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA) analysiert und interpretiert.

Die hämatologische Analyse beider herkömmlichen PRP-Herstellungssets weisen unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen zur Referenz Vollblut auf. Das PRP nach Harvest SmartPreP-2 zeigt eine 4,15-fach höhere Aufkonzentration gegenüber dem PRP nach Arthrex ACP (901 vs. 217 $\times 10^9/l$) und eine 4-fache zum Vollblut (901 vs. 223 $\times 10^9/l$). Bei der Bestimmung der WF-Konzentrationen wurden folgende Werte (Mittelwert \pm Standardabweichung / ^atechnische Abweichung in pg/ml) für Vollblut, PRP nach Arthrex ACP, PRP nach Harvest SmartPreP-2, TK, PRP-Pulver und Serum-BSG ermittelt: VEGF (574 \pm 147; 222 \pm 99; 528 \pm 233; 1087 \pm 535; 1722 \pm 50^a; 174 \pm 170), FGF-2 (198 \pm 164; 242 \pm 203; 410 \pm 259; 151 \pm 99; 542 \pm 12^a; 258 \pm 218), PDGF-AB (2394 \pm 451; 2473 \pm 643; 17846 \pm 3087; 18461 \pm 4455; 23023 \pm 630^a; 7325 \pm 1900) und TGF- β 1 (14356 \pm 4527;

23668 ± 8225; 77533 ± 13918; 68582 ± 7388; 87495 ± 457^a; 11990 ± 663). Das PRP-Pulver weist überwiegend signifikant ($p < 0,05$) höhere WF-Konzentrationen von VEGF, FGF-2, PDGF-AB und TGF- β 1 gegenüber dem Großteil der Probangruppen auf. Entgegen der Annahme waren die WF-Konzentrationen von IGF-1 in Bezug auf Vollblut (2317 ± 711 pg/ml) und TK (2266 ± 485 pg/ml) im PRP nach Arthrex ACP (1234 ± 823 pg/ml), PRP nach Harvest SmartPreP-2 (1539 ± 348 pg/ml) und Serum-BSG (120 ± 69 pg/ml) niedriger. Im PRP-Pulver war IGF-1 dagegen nicht detektierbar, dafür aber in geringer Menge der WF IGF-BP3 (6123 ± 344 pg/ml) nachweislich. Besonders abhängig vom Probanden waren die WF-Konzentrationen von VEGF, FGF-2 und IGF-1, wobei zwischen den einzelnen Vollblutwerten sowie den beiden kommerziellen PRP-Herstellungssets große interindividuelle Differenzen bestanden. Ebenfalls zeigten die beiden herkömmlichen PRP-Herstellungssysteme signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei den WF PDGF-AB, TGF- β 1 und IGF-BP3. Bei den Zytokinen bestanden indessen keine signifikanten Abweichungen. Darüber hinaus waren die Zytokine IL-1 α , IL-1 β und IL-1RA in geringen Mengen im Vollblut, Serum-BSG, PRP nach Arthrex ACP und Harvest SmartPreP-2 nachweisbar. Im TK und PRP-Pulver waren sie dagegen nicht detektierbar.

Diese Studie zeigt eine mögliche Methode zur besseren Standardisierung von PRP durch Erstellen eines direkt verwendbaren und lagerfähigen PRP-Pulvers. Die Wachstumsfaktorzusammensetzung des PRP-Pulvers ist mit "klassischen" etablierten PRP-Produkten vergleichbar und kann durch Erhöhen oder Verringern der verwendeten Pulvermenge individuell eingestellt werden. Übliche PRP-Produkte unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und damit in ihrer biologischen Wirksamkeit. Unterschiede in den Ergebnissen klinischer Studien mit PRP können auf die vielen verschiedenen PRP-Formulierungen zurückgeführt werden. Dies liefert eine unzureichende Evidenz für Metaanalysen und systematische Rezensionen. Das PRP-Pulver erfüllt die Konsensaufforderung zur Standardisierung von PRP durch Kompensation der inter- und intraindividuellen Variabilität. Die Daten dieser Studie zeigten, dass das PRP-Pulver hauptsächlich WF-Konzentrationen im oberen Bereich gegenüber zweier kommerzieller PRP-Präparaten beibehält. Im Gegensatz zum PRP-Pulver erzeugten die beiden herkömmlichen PRP-Herstellungskits starke Schwankungen in den VEGF- und FGF-2-Konzentrationen. Dagegen schienen die PDGF-AB- und TGF- β 1-Konzentrationen von den beiden PRP-Herstellungssets nicht betroffen zu sein. Andere Studien zeigten bei TGF- β 1 eine homogene Verteilung zwischen den einzelnen Proben und eine direkte Korrelation mit den PDGF-AB-Werten. Die demonstrierten Daten in dieser Arbeit stützen die Hypothese nicht, dass die Mengen von TGF- β 1 und PDGF-AB in Konzentrationen mit Leukozyten höher sind. Die WF-Konzentration von IGF-1 war unerwartet im PRP nach Harvest SmartPreP-2 gesenkt und im PRP-Pulver nicht detektierbar. Der Grund dafür ist möglicherweise die Denaturierung der Proteinstruktur der freien Form des IGF-1 während des Lyophilisierungsprozesses bei der Herstellung des PRP-Pulvers. Die unfreie Form des IGF-1 ist offenbar am WF IGF-BP3 gebunden, das in geringer Menge im PRP-Pulver nachgewiesen werden konnte. Die Zytokine IL-1 α und IL-1 β , ein katabolischer Faktor, blieben im PRP nach Harvest SmartPreP-2 ungefähr auf Vollblutkonzentration, schienen jedoch im TK und PRP-Pulver entweder durch Gammabestrahlung und / oder Lyophilisierung denaturiert worden zu sein.

Aufgrund des Studiendesigns kann keine Vorhersage über Aktivität der WF im biologischen Umfeld getätigt werden. Das vorgestellte PRP-Pulver ist heterologen Ursprungs und kann möglicherweise eine allergische Immunreaktion auslösen. Um diese Bedenken auszuräumen, wurden bei den verwendeten zwölf TKs zur Herstellung des PRP-Pulver eine Leukozytendepletion sowie eine Gammabestrahlung mit 30 Gy durchgeführt. Diese Maßnahmen sollen das allergene Potenzial senken und alle Krankheitserreger inaktivieren. Limitierungen der vorliegenden Studie waren, dass das PRP-Pulver nur mit zwei herkömmlichen PRP-Herstellungssystemen verglichen wurde. Auch die statistische Analyse war aufgrund von nur einer verfügbaren Charge des PRP-Pulvers begrenzt. Im Weiteren befinden sich noch viele weitere WF im Blut, daher muss die In-vivo-Bioaktivität des PRP-Pulvers in weiteren Grundlagenforschungen und klinischen Studien bewertet werden.

Die Herstellung von gepooltem PRP mittels Lyophilisierung ermöglicht dem Arzt, unter Verwendung einer bestimmten Menge des PRP-Pulvers eine definierte Wachstumsfaktorkonzentration anzuwenden. Zusätzlich besteht keine Spenderabhängigkeit mehr. Das PRP-Pulver ist als Trockensubstanz ohne Notwendigkeit der Zentrifugation überall in beliebiger Menge verfügbar und lagerstabil. Dies spart Zeit inklusive Personalressourcen und könnte zu Kosteneffizienz in der klinischen Praxis führen. Es ist damit das schnellste aller PRP-Kits.

Die leitende Hypothese dieser experimentellen Studie, dass eine große Menge eines PRP-Derivats hergestellt werden könnte, das langfristig beständig konstante einheitliche Wachstumsfaktorkonzentrationen aufweist und mit herkömmlichen PRP-Herstellungsprodukten vergleichbar ist, wurde mit dem PRP-Pulver bestätigt.

Literaturverzeichnis

1. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2011. xvi+272. (Der Experimentator).
2. Sauerbier S, Schmelzeisen R. Tissue Engineering. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M, editors. Zahn-Mund-Kieferheilkunde Bd1: Chirurgische Grundlagen. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme Verlag; 2008. p. 360–8.
3. Lippert H, Altmann S, editors. Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2012. 390 p.
4. Qureshi AH, Chaoji V, Maiguel D, Faridi MH, Barth CJ, Salem SM, et al. Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. PloS One. 2009 Oct 27;4(10):e7627.
5. Schippinger G, Studencnik G, Fankhauser F. PRP bei sportmedizinischen Indikationen – eine Literaturübersicht. Sports Orthop Traumatol Sport-Orthop - Sport-Traumatol [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2017 Dec 18];31(1):45–53. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0949328X14001860>
6. Leitner L, Hirzberger D, Vavken P, Amerstorfer F, Bernhardt G, Vielgut I, et al. Platelet-rich Plasma: Wirkprinzip und Behandlung von Erkrankungen des Bewegungsapparates. Sports Orthop Traumatol Sport-Orthop - Sport-Traumatol [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2017 Dec 18];31(4):272–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0949328X15001726>
7. Lim WB, Park SH, Moon YL. Platelet-rich Plasma: Applications in Sports Medicine. Sports Orthop Traumatol Sport-Orthop - Sport-Traumatol [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2017 Dec 18];31(3):206–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0949328X15001337>
8. Damit zusammenwächst, was zusammengehört - Kommunikation und Marketing - Universität Heidelberg [Internet]. [cited 2017 Dec 15]. Available from: <https://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/2012-1/05ortho.html>
9. Schwenzer N, Eckelt U, editors. Zahnärztliche Chirurgie. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2009. xii+320.
10. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. Growth Factors [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2017 Dec 19];22(4):233–41. Available from: <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>
11. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowanec DM, Dugdale EM, Hansen D, Cote MP, et al. The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. Am J Sports Med. 2012 Aug;40(8):1742–9.
12. Weibrich G, Kleis W, Wagner W. Platelet-rich Plasma (Thrombozytenkonzentrate) in der präprothetischen Chirurgie und Implantologie - eine aktuelle Literaturübersicht. Deutsche Gesellschaft für Implantologie imZahn-, Mund- und Kieferbereich e.V., Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund-, editors. Z Für Zahnärztliche Implantol [Internet]. 2003 [cited 2017 Dec 20];(3/2003):168–74. Available from: https://www.online-zzi.de/media/pdf/webarchiv/2003/ZZI_03_2003.pdf

13. Anitua E, Alkhraisat MH, Orive G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2012 Jan 10;157(1):29–38.
14. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638–46.
15. Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2010 Feb;26(2):269–78.
16. Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med Auckl NZ.* 2009;39(5):345–54.
17. Weber J. Anti-Aging Rostock Mesotherapie transdermale Therapie Anti-Aging [Internet]. Ästhetik-Klinik. [cited 2019 Mar 3]. Available from: <https://www.aesthetik-klinik.de/leistungen/mesotherapie.html>
18. Aust M, Jamchi S, Busch K. Platelet-Rich Plasma – Eine alternative Methode zur Behandlung alternder Haut am Unterlid. In *German Medical Science* GMS Publishing House; 2016. p. Doc034.
19. Regenerative Medizin in der Plastisch-Ästhetischen Chirurgie | Surgical Tribune [Internet]. [cited 2019 Mar 3]. Available from: http://www.surgical-tribune.com/articles/specialities/overview/9273_regenerative_medizin_in_der_plastisch-aesthetischen_chirurgie.html
20. Therapie mit körpereigenem plättchenreichem Plasma (PRP) [Internet]. Dermatologie Dr. Jennifer Quist und Prof. Dr. Dr. Sven Quist. 2016 [cited 2019 Sep 3]. Available from: <https://dermatologie-quist.de/2016/08/26/therapie-mit-koerpereigenem-plaettchen-reichem-plasma-prp/>
21. Schulte W. Die Eigenblutfüllung: eine neue Methode zur Versorgung größerer Knochendefkte nach intraoralen Eingriffen. *Dtsch Zahnärztliche Z.* 1960;(12):910–4.
22. Schulte W. Die Retraktion des Blutgerinnsels und ihre Bedeutung Für die primäre Heilung von Kieferknochen. München: Carl Hans; 1964.
23. Schulte W. Zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung großer Knochendefekte - eine Modifikation der Eigenblutmethode. *Dtsch Zahnärztliche Z.* 1969;(10):854–7.
24. Yamamoto K, Hayashi J, Miyamura H, Eguchi S. A comparative study of the effect of autologous platelet-rich plasma and fresh autologous whole blood on haemostasis after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg.* 1996;(4):9–14.
25. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294–9.
26. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Feb 15;94(4):308–16.
27. Schliephake H. Wachstumsfaktoren. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M, editors. *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Bd 1: Chirurgische Grundlagen*. 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: THIEME; 2008. p. 369–78.

28. Kieb M, Sander F, Prinz C, Adam S, Mau-Möller A, Bader R, et al. Platelet-Rich Plasma Powder: A New Preparation Method for the Standardization of Growth Factor Concentrations. *Am J Sports Med.* 2016 Nov;45(4):954–60.
29. Laudy ABM, Bakker EWP, Rekers M, Moen MH. Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2015 May;49(10):657–72.
30. Mishra AK, Skrepnik NV, Edwards SG, Jones GL, Sampson S, Vermillion DA, et al. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. *Am J Sports Med.* 2014 Feb;42(2):463–71.
31. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014 Jan;4(1):3–9.
32. Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs Off J Jpn Soc Artif Organs.* 2014 Jun;17(2):186–92.
33. Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Feb 15;94(4):298–307.
34. Baksh N, Hannon CP, Murawski CD, Smyth NA, Kennedy JG. Platelet-rich plasma in tendon models: a systematic review of basic science literature. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2013 Mar;29(3):596–607.
35. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med.* 2011 Feb;39(2):266–71.
36. Schippinger G, Studencnik G, Fankhauser F. PRP bei sportmedizinischen Indikationen – eine Literaturübersicht. *Sports Orthop Traumatol Sport-Orthop - Sport-Traumatol* [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Oct 8];31(1):45–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0949328X14001860>
37. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014 Jan;4(1):3–9.
38. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Dec 23;(12):CD010071.
39. Engebretsen L, Steffen K. To PRP or not? *Br J Sports Med* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2017 Sep 24];44(15):1071–1071. Available from: <http://bjsm.bmj.com/content/44/15/1071>
40. Pathologie: mit rund 150 Tabellen ; 5., vollständig überarbeitete Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012.
41. Matzdorff A, Fritze D. Hämatologie. In: *Innere Medizin.* 3., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2013. (Duale Reihe).
42. Piper W. *Innere Medizin.* 2., überarb. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer Medizin; 2013. ix+981. (Springer-Lehrbuch).

43. Hallbach J. Klinische Chemie und Hämatologie: biomedizinische Analytik für MTLA und Studium ; 154 Tabellen ; 3., überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2011. xvi+503.
44. Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, editors. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cited 2017 Feb 28]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-12765-6>
45. Klinische Chemie und Hämatologie. 8., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2013. (Taschenlehrbuch).
46. Analyseverzeichnis / Laborkatalog – Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin [Internet]. [cited 2017 Jul 24]. Available from: <https://ilab.med.uni-rostock.de/zentrallabor/analyseverzeichnis-laborkatalog/>
47. Lippert H, Kramer A. Wundatlas: Wunde, Wundbehandlung und Wundheilung ; mit 105 Tabellen. Heidelberg: Barth; 2001. ix+174.
48. Weimann E, Kiess W. Wachstumsfaktoren: Grundlagen und klinische Anwendung. 2., überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer; 1995. xvi+179.
49. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc. 2008 Oct;16(5):585–601.
50. Loppnow H. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. Internist [Internet]. 2001 Jan 25 [cited 2020 Aug 15];42(1):13–27. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001080050720>
51. Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis: Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz [Internet]. 2004 Jan [cited 2020 Aug 15];47(1):73–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00103-003-0758-3>
52. Horn F. Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium. 7., korrigierte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019.
53. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7., Auflage, korrigierter Nachdruck 2014. Berlin: Springer Spektrum; 2014. 1093 p.
54. Schütt C, Broecker B. Grundwissen Immunologie. 2nd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009. 272 p.
55. Nuernberger J. Tourette-Syndrom: Immunologische Untersuchungen von Monozyten und Zytokinen [Dissertation]. [München]: Ludwig-Maximilians-Universität zu München; 2008.
56. Andia I, Sánchez M, Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. Expert Opin Biol Ther. 2012 Jan;12(1):7–22.
57. Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. Am J Sports Med. 2013 Feb;41(2):356–64.
58. Cerza F, Carni S, Carcangiu A, Di Vavo I, Schiavilla V, Pecora A, et al. Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. Am J Sports Med. 2012 Dec;40(12):2822–7.
59. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Di Matteo B, Merli ML, Cenacchi A, et al. Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial. BMC Musculoskelet Disord. 2012 Nov 23;13:229.

60. Mei-Dan O, Carmont MR, Laver L, Mann G, Maffulli N, Nyska M. Platelet-rich plasma or hyaluronate in the management of osteochondral lesions of the talus. *Am J Sports Med.* 2012 Mar;40(3):534–41.
61. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1774–8.
62. Thanasis C, Papadimitriou G, Charalambidis C, Paraskevopoulos I, Papanikolaou A. Platelet-rich plasma versus autologous whole blood for the treatment of chronic lateral elbow epicondylitis: a randomized controlled clinical trial. *Am J Sports Med.* 2011 Oct;39(10):2130–4.
63. Gosens T, Peerbooms JC, van Laar W, den Ouden BL. Ongoing positive effect of platelet-rich plasma versus corticosteroid injection in lateral epicondylitis: a double-blind randomized controlled trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2011 Jun;39(6):1200–8.
64. Radice F, Yáñez R, Gutiérrez V, Rosales J, Pinedo M, Coda S. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2010 Jan;26(1):50–7.
65. Orrego M, Larrain C, Rosales J, Valenzuela L, Matas J, Durruty J, et al. Effects of platelet concentrate and a bone plug on the healing of hamstring tendons in a bone tunnel. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2008 Dec;24(12):1373–80.
66. Vavken P, Sadoghi P, Murray MM. The effect of platelet concentrates on graft maturation and graft-bone interface healing in anterior cruciate ligament reconstruction in human patients: a systematic review of controlled trials. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2011 Nov;27(11):1573–83.
67. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andia I. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2010 Apr;26(4):470–80.
68. de Almeida AM, Demange MK, Sobrado MF, Rodrigues MB, Pedrinelli A, Hernandez AJ. Patellar tendon healing with platelet-rich plasma: a prospective randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* 2012 Jun;40(6):1282–8.
69. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011 Jun;20(4):518–28.
70. Everts PA, Devilee RJJ, Brown Mahoney C, van Erp A, Oosterbos CJM, Stellenboom M, et al. Exogenous application of platelet-leukocyte gel during open subacromial decompression contributes to improved patient outcome. A prospective randomized double-blind study. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* 2008;40(2):203–10.
71. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jun;13(7):1207–30.

72. Amin I, Gellhorn AC. Platelet-Rich Plasma Use in Musculoskeletal Disorders: Are the Factors Important in Standardization Well Understood? *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2019;30(2):439–49.
73. Mautner K, Malanga GA, Smith J, Shiple B, Ibrahim V, Sampson S, et al. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R*. 2015 Apr;7(4 Suppl):S53–9.
74. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Jun;13(7):1185–95.
75. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009 Mar;27(3):158–67.
76. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2012 Jul;28(7):998–1009.
77. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2011 Oct;39(10):2135–40.
78. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Oct 3;94(19):e143(1-8).
79. Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegard JJ, Luong R, et al. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med*. 2012 Jun;40(6):1274–81.
80. Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2005 Mar;23(2):281–6.
81. Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramirez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2004 Nov;10(5):844–54.
82. Bachl N, Derman W, Engebretsen L, Goldspink G, Kinzlbauer M, Tschann H, et al. Therapeutic use of growth factors in the musculoskeletal system in sports-related injuries. *J Sports Med Phys Fitness*. 2009 Dec;49(4):346–57.
83. Borriero P, Gianfrancesco AD, Pereira MT, Pigozzi F. Platelet-rich plasma in muscle healing. *Am J Phys Med Rehabil*. 2010 Oct;89(10):854–61.
84. Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, et al. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*. 2010 Dec;44(15):1072–81.
85. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann J, Overvest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006 Jun;38(2):174–87.
86. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009 Nov;37(11):2259–72.
87. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg*. 2004 Jul;29(4):551–63.

88. Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D. Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 Oct;7(3):249–58.
89. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J Hand Surg.* 2002 Jul;27(4):615–20.
90. Kovacevic D, Fox AJ, Bedi A, Ying L, Deng X-H, Warren RF, et al. Calcium-phosphate matrix with or without TGF- β 3 improves tendon-bone healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med.* 2011 Apr;39(4):811–9.
91. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med Auckl NZ.* 2003;33(5):381–94.
92. Philippou A, Maridaki M, Halapas A, Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *Vivo Athens Greece.* 2007 Feb;21(1):45–54.
93. Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, Staverosky JA, Dünker N, Schweitzer R. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation. *Dev Camb Engl.* 2009 Apr;136(8):1351–61.
94. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Jun;14(3):357–62.
95. Harvest Technologies | PRP Platelet Rich Plasma | Procedure Kits [Internet]. [cited 2017 Mar 29]. Available from: <https://www.harvesttech.com/clinician/clinician-home/prp/products>
96. Arthrex ACP® Double Syringe - Application - jbzGp1C3pkKpWQFALrfMMg.pdf [Internet]. [cited 2017 Mar 21]. Available from: https://d1psc3qesfsa61.cloudfront.net/pdfs/jbzGp1C3pkKpWQFALrfMMg/jbzGp1C3pkKpWQFALrfMMg.pdf?Expires=1490121465&Signature=VzeSyYpA7OmN9m73akCqv5QAKYbZQKpCNKsr%7EOY%7EFTK4RF9T3fnfHbQU1FS7BPYg6cyOYfNBijqE80Q5sKIWjUvwdYM1GYU4zHubRd8Zmx9Ee4whgzqJ6oo3iTn0Y2rXZO9t4cccEBKx5AYShrt1Ww3fEOtNgb16CpZhSKOU-bs-eMLq2kRrNxk5X%7EXzYGWxl6ORzhN0yz-4ubiTSLE08z9PWZ00qVxIm4FodNESykILXzqveJLOQhtqENEkW14uA7xnR3LvBN-E7LmBoG1gjVwD-PbbfK973KdGnoXkFxFWQyTX%7EaoYVAfLFKRdKdE3CrU4AJellF0INbZHTjaOFQ__&Key-Pair-Id=APKAJMGJRW6JX5OBM5LA
97. Rump G, Braun R, Jahn U-R, Krakowitzky P, Sibrowski W. *Transfusionsmedizin compact*. 1st ed. Stuttgart: Thieme; 2003. 190 p.
98. Bundesärztekammer. *Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)*. neu bearb. Fassung 2000. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2000. 144 p.
99. S-Sedivette® 3.5ml 4NC - Sarstedt [Internet]. [cited 2017 Jun 19]. Available from: <https://www.sarstedt.com/produkte/diagnostik/blutsenkung/blutentnahmesysteme/produkt/06.1690.001/>
100. Kiefel, Volker, Greinacher, Andreas. *Transfusionsmedizin Uni Rostock* [Internet]. [cited 2017 Feb 19]. Available from: <https://transfusion.med.uni-rostock.de/fileadmin/Institute/tmed/tmed.pdf>

101. Bundesärztekammer. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie): Aufgestellt gemäß Transfusionsgesetz von ... 2005, mit Richtlinienanpassung 2010. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2010. 129 p.
102. Bundesärztekammer. Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten: Herausgegeben von der Bundesärztekammer auf Empfehlung ihres Wissenschaftlichen Beirats. 4th ed. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2008. 272 p.
103. Singbartl G, Walther-Wenke G. Transfusionspraxis. 2nd ed. Berlin: Springer; 2014. 274 p.
104. Kreil, Ursula. Gepoolte versus Apherese- Thrombozytenkonzentrate. In Wien; 2018 [cited 2020 Aug 9]. p. 3. Available from: https://plattformblut.at/wienerbluttage/wp-content/Abstracts_WBT_2018/PP/Thrombozytenkonzentrate_Kreil.pdf
105. Human VEGF DuoSet ELISA DY293B-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Apr 28]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-vegf-duoset-elisa_dy293b#assay-procedure
106. Human PDGF-AB DuoSet ELISA DY222: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-pdgf-ab-duoset-elisa_dy222#assay-procedure
107. Human FGF basic DuoSet ELISA DY233-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-fgf-basic-duoset-elisa_dy233#assay-procedure
108. Human IGF-I DuoSet ELISA DY291-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 2]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-igf-i-duoset-elisa_dy291#assay-procedure
109. Human IL-1 alpha/IL-1F1 DuoSet ELISA DY200-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-il-1-alpha-il-1f1-duoset-elisa_dy200#assay-procedure
110. Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA DY201-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-il-1-beta-il-1f2-duoset-elisa_dy201#assay-procedure
111. Human IL-1ra/IL-1F3 DuoSet ELISA DY280-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-il-1ra-il-1f3-duoset-elisa_dy280#assay-procedure
112. Human IGFBP-3 DuoSet ELISA DY675: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-igfbp-3-duoset-elisa_dy675#assay-procedure
113. Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA DY240-05: R&D Systems [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-tgf-beta-1-duoset-elisa_dy240#assay-procedure
114. 2015-08_Gute_ELISA_Praxis_Handbuch_DE_Web.pdf [Internet]. [cited 2017 May 13]. Available from: http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/540/2015-08_Gute_ELISA_Praxis_Handbuch_DE_Web.pdf
115. Filardo G, Di Matteo B, Di Martino A, Merli ML, Cenacchi A, Fornasari P, et al. Platelet-Rich Plasma Intra-articular Knee Injections Show No Superiority Versus Viscosupplementation: A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2015 Jul;43(7):1575–82.

116. Sánchez M, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz Recalde E, Garcia Gutierrez A, et al. A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2012 Aug;28(8):1070–8.
117. Andia I, Maffulli N. Muscle and tendon injuries: the role of biological interventions to promote and assist healing and recovery. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2015 May;31(5):999–1015.
118. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Dec;9(12):721–30.
119. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JAN, Bierma-Zeinstra SMA, et al. Platelet-rich plasma injections in acute muscle injury. *N Engl J Med*. 2014 Jun 26;370(26):2546–7.
120. Burnouf T, Chou M-L, Wu Y-W, Su C-Y, Lee L-W. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion (Paris)*. 2013 Jan;53(1):138–46.
121. Denapoli PMA, Stilhano RS, Ingham SJM, Han SW, Abdalla RJ. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing. *Am J Sports Med* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2019 Apr 14];44(8):1962–71. Available from: <https://doi.org/10.1177/0363546516646100>
122. McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2009 Aug;27(8):1033–42.
123. Bode AP, Fischer TH. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2007;35(1):125–33.
124. Sum R, Hager S, Pietramaggiori G, Orgill DP, Dee J, Rudolph A, et al. Wound-healing properties of trehalose-stabilized freeze-dried outdated platelets. *Transfusion (Paris)*. 2007 Apr;47(4):672–9.
125. Martínez CE, Smith PC, Palma Alvarado VA. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Front Physiol*. 2015;6:290.
126. Weed B, Davis MDP, Felty CL, Liedl DA, Pineda AA, Moore SB, et al. Autologous platelet lysate product versus placebo in patients with chronic leg ulcerations: A pilot study using a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Wounds* [Internet]. 2004 Sep [cited 2020 Jan 12];16(9):273–82. Available from: <https://mayoclinic.pure.elsevier.com/en/publications/autologous-platelet-lysate-product-versus-placebo-in-patients-wit>
127. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRP-PTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. Comparison of a semiautomatic method with a more complex method for the preparation of platelet concentrates. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2003 Apr [cited 2020 Aug 12];14(2):233–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0501.2003.140215.x>
128. Fitzpatrick J, Bulsara MK, McCrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of Platelet-Rich Plasma Extraction. *Orthop J Sports Med* [Internet]. 2017 Jan 3 [cited 2020 Aug 12];5(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5302100/>

129. Magalon J, Bausset O, Serratrice N, Giraudo L, Aboudou H, Veran J, et al. Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2014 May;30(5):629–38.
130. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett*. 2006 May 22;580(12):2879–87.
131. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med*. 2008 May;42(5):314–20.
132. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br*. 2000 Jan;82(1):131–7.
133. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, et al. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg*. 2013 Sep;40(5):530–5.
134. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria. *J Oral Implantol*. 2014 Aug;40(4):511–21.
135. Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther*. 2012 Aug 8;14(4):219.
136. Passaretti F, Tia M, D'Esposito V, De Pascale M, Del Corso M, Sepulveres R, et al. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets*. 2014;25(4):252–6.
137. Oh JH, Kim W, Park KU, Roh YH. Comparison of the Cellular Composition and Cytokine-Release Kinetics of Various Platelet-Rich Plasma Preparations. *Am J Sports Med*. 2015 Dec;43(12):3062–70.
138. Kreuz PC, Krüger JP, Metzlaß S, Freymann U, Endres M, Pruss A, et al. Platelet-Rich Plasma Preparation Types Show Impact on Chondrogenic Differentiation, Migration, and Proliferation of Human Subchondral Mesenchymal Progenitor Cells. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2015 Oct;31(10):1951–61.
139. Bausset O, Giraudo L, Veran J, Magalon J, Coudreuse J-M, Magalon G, et al. Formulation and Storage of Platelet-Rich Plasma Homemade Product. *BioResearch Open Access [Internet]*. 2012 Jun [cited 2019 Apr 14];1(3):115. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559222/>
140. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225–8.
141. Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther [Internet]*. 2015 Jul [cited 2019 Apr 27];15(7):987–99. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/25891080>
142. Keller-Stanislawski B, Lohmann A, Günay S, Heiden M, Funk MB. The German Haemovigilance System--reports of serious adverse transfusion reactions between 1997 and 2007. *Transfus Med Oxf Engl*. 2009 Dec;19(6):340–9.
143. Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Institutes über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion. Langen, Germany: Paul- Ehrlich-Institut; 2000. [Internet]. 2000 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <https://www.pei.de/SharedDocs/bekanntmachungen/2000/banz-174-14-09-2000-s18396.html?nn=3250064>

144. Frisch A. Bestrahlung leukozytendepletierter Erythrozytenkonzentrate in der additiven Lösung SAG-M aus dem Blutspendedienst Suhl zu verschiedenen Zeitpunkten. Department of Surgery, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 2012.
145. Pan L, Yong Z, Yuk KS, Hoon KY, Yuedong S, Xu J. Growth Factor Release from Lyophilized Porcine Platelet-Rich Plasma: Quantitative Analysis and Implications for Clinical Applications. *Aesthetic Plast Surg*. 2016 Feb;40(1):157–63.
146. Fischer TH, Merricks E, Raymer R, Nichols T, Bode A, Read M. Multiple infusions of rehydrated, lyophilized platelets does not induce antiplatelet antibodies or thrombocytopenia in a canine model system. *Blood*. 2000;96(11 Part II).
147. Anitua E, Sanchez M, De la Fuente M, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA*. 2012 Sep;20(9):1657–65.
148. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A, et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA*. 2012 Oct;20(10):2082–91.
149. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth Factor and Catabolic Cytokine Concentrations Are Influenced by the Cellular Composition of Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2018 Mar 3];39(10):2135–40. Available from: <https://doi.org/10.1177/0363546511417792>
150. Freimark D, Jérôme V, Freitag R. A GFP-based method facilitates clonal selection of transfected CHO cells. *Biotechnol J* [Internet]. 2010 Jan [cited 2020 Jan 21];5(1):24–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200800264>
151. Su CY, Kuo YP, Lin YC, Huang CT, Tseng YH, Burnouf T. A virally inactivated functional growth factor preparation from human platelet concentrates. *Vox Sang* [Internet]. 2009 Aug [cited 2019 Apr 27];97(2):119–28. Available from: <https://tmu.pure.elsevier.com/en/publications/a-virally-inactivated-functional-growth-factor-preparation-from-h>
152. Hahn O, Kieb M, Jonitz-Heincke A, Bader R, Peters K, Tischer T. Dose-Dependent Effects of Platelet-Rich Plasma Powder on Chondrocytes In Vitro. *Am J Sports Med*. 2020 Jun;48(7):1727–34.

Anhang



Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Prof. Dr. med. habil. Thomas Tischer
Universitätsmedizin Rostock
Orthopädische Klinik und Poliklinik
Sektion Sportorthopädie & Prävention
Doberaner Str. 142
18057 Rostock

**Ethikkommission an der
Medizinischen Fakultät der
Universität Rostock**

Vorsitzender:
Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Büttner
andreas.buettner@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9900

Geschäftsstellenleiterin:
Swaantje Kohlschein
kautz@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9904

Geschäftsstelle:
ethik@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9939
Fax: +49 381 494-9902
Homepage:
www.ethik.med.uni-rostock.de

25.01.2016

ethical approval

study title: Platelet rich plasma (PRP) powder – a new preparation method for standardization of growth factor concentration.

Investigator: Prof. Dr. med. habil. Thomas Tischer
Universitätsmedizin Rostock
Orthopädische Klinik und Poliklinik

our sign: (Bei Schriftwechsel bitte stets angeben) **A 2016-0024**
application from: 04.01.2016

Dear professor Tischer,

the chairman of the ethics committee of the medical faculty of the university of Rostock (Germany) has examined the submitted documents for the commission.

Please be informed that we have **neither legal nor ethical concerns** against the execution of the study.

Independently from this vote the ethics committee kindly emphasizes that the ethical and legal responsibility for the study conduct remains with the principal investigator.

We wish you the best of luck.

Kind regards,

Univ.- Prof. Dr. med. A. Büttner
chairman

Frank Stoiken
office

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frank Sander
E-Mail: frank.sander@uni-rostock.de

Bildungsweg

04/2013 – 08/2021	Promotion zum Thema „Vergleichende Untersuchung eines standardisiert hergestellten, allopathen Wachstumsfaktorextraktes“
10/2008 – 12/2015	Medizinstudium an der Universität Rostock
10/2004 – 03/2010	Lehramtsstudium Sport und Biologie für Gymnasialstufe mit Abschluss des 1. Staatsexamens
Abitur 07/2000	CJD / Christophorusschule Rostock

Beruflicher Werdegang

02/2018 – dato	Assistenzarzt der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsmedizin Rostock
01/2018 – 01/2018	Assistenzarzt im Zentrum für Unfallchirurgie und Orthopädie, Klinik für Orthopädie des KMG Klinikum Güstrow GmbH
02/2016 – 12/2017	Arzt bei Plasma Service Europe GmbH – Zentrum Rostock
11/2011 – dato	Freiberuflicher Lehrer an der privaten beruflichen Schule Ecolea
08/2000 – 09/2004	Zeitsoldat der Sportfördergruppe der Bundeswehr

Danksagung

Ich möchte mich zuallererst bei meiner Familie für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und die Ermutigung bedanken.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank Prof. Thomas Tischer für die Möglichkeit, mich wissenschaftlich in der Sportorthopädie einbringen zu dürfen sowie für seine intensive Betreuung. Er ermutigte mich zu wissenschaftlicher Arbeit und unterstützte mich bei einer Vielzahl von Publikationen.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Kirsten Peters für alles, was ich von ihnen lernen durfte, und die Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Cornelia Prinz, Dr. Matthias Kieb und allen Mitarbeiter/-innen des Arbeitsbereich Zellbiologie der Universitätsmedizin Rostock für ihre freundliche Unterstützung in der praktischen Umsetzung und den hilfreichen fachlichen Diskussionen.

Publikationen

1. Originalarbeiten

- 1) Sander F. Problematik des Dopings. Staatsexamensarbeit, Universität Rostock, Phil. Fakultät, 2009.
- 2) Kieb M, Sander F, Prinz C, Adam S, Mau-Möller A, Bader R et al. Platelet-Rich Plasma Powder: A New Preparation Method for the Standardization of Growth Factor Concentrations. Am J Sports Med. 2016 Nov; 45(4):954–60.

2. Zeitschriftenbeiträge ohne Impactfactor

- 1) Sander F, Tischer T, Krüger S. Sportmedizinische Aspekte des Wasserspringens. Sports Orthop. Traumatol. 34(2018)3. München: Elsevier, Urban & Fischer. 2018: p. 244-252.
- 2) Sander F. Für Sie gelesen - Konservative versus operative Behandlung von Rotatorenmanschettenrupturen. Z Orthop Unfall. 158(1). Stuttgart: Thieme. 2020: p. 20-20.

3. Buchbeiträge

- 1) Delaloye J-R, Sander F, Murar J, Tischer T, Erstbrunner L. Water jumping sports (p. 651-657). In Injury and Health Risk Management in Sports - A Guide to Decision Making (ESSKA). Eds. Krutsch W et al. Berlin/Heidelberg: Springer. 2020: p. XXII – 804.

4. Abstracts

- 1) Sander F, Kieb M, Prinz C, Bader R, Peters K, Tischer T. Entwicklung eines standardisierten PRP-Pulvers aus gepoolten Thrombozyten. Sports Orthop. Traumatol. 31(2017)2. München: Elsevier, Urban & Fischer. 2017: p. 170.
- 2) Sander F, Neuse N, Lutter C, Tischer T. In vivo-Belastungsmessungen im Wakeboardsport: Implikation für Belastungssteuerung und präventive Ansätze. Sports Orthop. Traumatol. 36(2020)2. München: Elsevier, Urban & Fischer. 2020: p. 172-173.

Thesen der Dissertation

„Vergleichende Untersuchung eines standardisiert hergestellten, allogenen Wachstumsfaktorextraktes“

1. Durch das Bündeln und Lyophilisieren von mehreren allogenen Thrombozytenkonzentraten ist es möglich, ein standardisiertes PRP-Produkt zu erzeugen.
2. Es kann eine große Menge eines PRP-Derivats hergestellt werden, das langfristig beständig konstante einheitliche Wachstumsfaktorkonzentrationen aufweist und mit herkömmlichen PRP-Herstellungsprodukten vergleichbar ist.
3. Das PRP-Pulver weist eine einheitliche Standardisierung auf und die dringend benötigte Standardisierung konnte durch die herkömmlichen PRP-Herstellungssysteme bisher nicht gelöst werden.
4. Bei etablierten PRP-Herstellungsverfahren lassen sich inter- und intraindividuelle Unterschiede in der PRP-Zusammensetzung sowie in deren Wachstumsfaktorkonzentrationen feststellen.
5. Das PRP-Pulver weist höhere Wachstumsfaktorkonzentrationen zu PRPs aus etablierten Herstellungsverfahren auf.
6. Konzentrationen an Zytokine lassen sich im PRP-Pulver nicht nachweisen.
7. Die Wachstumsfaktorkonzentrationen von PDGF-AB und TGF- β 1 sind in etablierten PRP-Produkten mit größerer Leukozytenzahl höher.