

Aus der Klinik für Unfallchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Seekamp)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DER EINFLUSS VON PLATELET-RICH PLASMA
AUF DIE IMMUNOLOGISCH INDUZIERTERTE
KNIEGELENKARTHRITIS IM GROSSTIERMODELL**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
HOLGER HAAS
aus Saugau

Kiel 2013

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Sebastian Lippross
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Yahya Ail
Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2014
Zum Druck genehmigt: 08.10.2014

gez. Prof. Dr. med. Andreas Seekamp
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	6
1.2 Aktuelle Therapiekonzepte der rheumatoiden Arthritis.....	9
1.3 Platelet-rich Plasma und dessen Herstellung.....	12
1.4 Ziel dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Ethikvotum	15
2.2 Versuchstiere	15
2.3 Autoimmun induzierte Arthritis (AIA) als Modell für Rheumatoide Arthritis.....	15
2.4 Produktion und Modell zur PRP-Injektion.....	16
2.4.1 Produktion von PRP.....	16
2.4.2 Modell zur PRP-Injektion.....	17
2.5 Vorbereitung zur Probenentnahme und Untersuchung	18
2.6 Kalzifizierte Histologie	23
2.6.1 Vorbereitung der Hartschliffe für die Einbettung.....	23
2.6.2 Herstellung der Hartschliffe	24
2.6.3 Färbung der Hartschliffe mit Toluidinblau.....	24
2.6.4 Mikroradiographie der Hartschliffe	25
2.7 Entkalzifizierte Histologie	26
2.7.1 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE).....	26
2.7.2 Färbung mit Safranin-Orange.....	27
2.7.3 Immunhistochemische Färbungen von Il-6, VEGF, Kollagen II.....	27
2.8 Auswertung der Histologie	28
2.8.1 Auswertungskriterien der kalzifizierten Histologie (Hartschliffe)	28
2.8.2 Beurteilung der Mikroradiographie	29
2.8.3 Kriterien der Auswertung der entkalzifizierten Histologie	29
2.8.4 Safranin-Orange Färbung	30
2.8.5 Immunhistochemie.....	30

2.9	Proteinanalyse mit Luminex	31
2.10	Genexpressionsanalysen	31
2.10.1	Vorbereitung der Proben zur Genexpressionsanalyse	31
2.10.2	Reverse Transkription der RNA	32
2.10.3	Real Time-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)	32
2.11	Statische Analyse	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Etablierung des Modells für die immunologisch induzierte Arthritis	34
3.1.1	Ergebnisse der kalzifizierten Histologie (Hartschliffe)	34
3.1.2	Entkalzifizierte Histologie	36
3.1.3	Proteinanalysen mit Luminex	36
3.1.4	Genexpressionsanalysen	37
3.2	Der Effekt von PRP auf die immunologisch induzierte Arthritis	37
3.2.1	Kalzifizierte Histologie (Hartschliffe)	37
3.2.2	Entkalzifizierte Histologie	37
3.2.3	Proteinanalysen mit Luminex	43
3.2.4	Genexpression	46
4.	Diskussion	47
4.1	Einführung	47
4.2	Modell der AIA	47
4.3	Effekte der Behandlung der AIA mit PRP	48
4.4	Aussagekraft des Studiendesigns	49
4.5	Zusammenfassung	51
5.	Veröffentlichungen	52
6.	Materialverzeichnis	53
6.1	Antikörper	53
6.2	Chemikalien	53
6.3	Geräte	55
6.4	Kits	56
6.5	Medikamente	56
6.6	Verbrauchsmaterialien	56

7. Abkürzungsverzeichnis	57
8. Literaturverzeichnis	60
9. Danksagung.....	66
10. Versicherung	68
11. Erklärung	69
12. Curriculum Vitae	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Eröffnetes Kniegelenk	19
Abbildung 2:	Entnahmeweise der Knorpel-Knochen-Proben	20
Abbildung 3:	Femurkondylen nach Probenentnahme	21
Abbildung 4:	Entnommene Knorpel-Knochen-Präparate aus den Femurkondylen	22
Abbildung 5:	Patella mit partieller Resektion der Synovialmembran	22
Abbildung 6:	Beispiel Hartschliffpräparat, Toluidinblau-Färbung.....	34
Abbildung 7:	Beispiel Mikroradiographie	38
Abbildung 8:	Veränderung Synovialmembran, Arthritis vs. PRP, HE	39
Abbildung 9:	Beispiel für Synovialmembranprobe und Knorpel- Knochen-Probe, HE	40
Abbildung 10:	Veränderung Knorpel, Arthritis vs. PRP, Safranin-O, Kollagen Typ II	41
Abbildung 11:	Veränderung Synovialmembran Arthritis vs. PRP; Immunhistochemie	42
Abbildung 12:	Veränderung im Knorpel, Immunhistochemie	43
Abbildung 13:	Veränderung Synovialmembran Arthritis vs. PRP, Luminexassay ..	44
Abbildung 14:	Veränderung Knorpel Arthritis vs. PRP, Luminexassay	45
Abbildung 15:	Veränderung Synovialmembran Arthritis vs. PRP, Genexpressionsanalyse	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematische Auflistung der Therapeutika.....	10
Tabelle 2: Chronologische Darstellung des Versuchsablaufs	17
Tabelle 3: Morphologische Beurteilung des subchondralen Knochens und Gelenkknorpels.....	28
Tabelle 4: Ergebnistabelle	35

1. Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA) ist die am weitesten verbreitete entzündliche Gelenkerkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1 %. Die Angaben variieren in der Literatur von 0,24 % bis 1,0 %. Bei Zwillingen liegt die Inzidenz bei 2 % bis 4 % (1). RA ist eine systemische autoimmunologische Erkrankung, die sowohl zur Zerstörung des Gelenks als auch des angrenzenden Knochens führt. Häufige Manifestationsorte sind die Kniegelenke. Neben diesen können auch andere Gelenke, wie zum Beispiel die Gelenke der Hände und Füße, Gelenke der Wirbelsäule oder die Hüftgelenke betroffen sein. Zum Arztbesuch führen meistens Symptome der Gelenkzerstörung wie Schmerzen, Bewegungseinschränkungen, Stabilitätsverlust, Abweichung der Gelenkachsen oder Deformierungen der Gelenke. Häufig wird dabei auch eine Beteiligung der Sehnenscheiden beobachtet (2). Zusätzlich leiden viele Patienten an einer Zerstörung des Bindegewebes. Diese führt zu extraartikulären Manifestationen wie Skleritis, Serositis, Amyloidablagerungen, Episkleritis und so genannten Rheumaknoten. Langfristig kann die inflammatorische Bindegewebsbeteiligung zu nephrologischen Erkrankungen und Lymphomen führen (3). Die Zerstörung der Gelenke kann schwerwiegende Bewegungseinschränkungen und Schmerzen hervorrufen, so dass ein prothetischer Gelenkersatz unumgänglich wird. Besonders problematisch ist dies bei jüngeren Patienten, da die Standzeit der Prothesen inzwischen zwar deutlich länger, aber oftmals weit von der Lebenserwartung entfernt ist.

Die klinischen Symptome der RA sind über Jahrhunderte relativ umfassend beschrieben worden, wohingegen die Pathophysiologie erst mit dem Verständnis der Molekularbiologie genauer untersucht werden konnte. Die meisten Autoren stimmen bei den wichtigsten ursächlichen Merkmalen, die alle Arten der RA charakterisieren, überein (4). Ausgehend von einer Entzündungsreaktion auf einen immunologischen Stimulus kommt es zur progredienten Zerstörung artikulärer Strukturen. Initial bestehen die deutlichsten Veränderungen aus Gewebsproliferation, vermehrter Vaskularisierung und Infiltration durch Entzündungszellen wie Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten in der Synovialmembran. Dies führt zur Synovialitis mit deutlicher villöser Hyperplasie der Synovialis, Bildung von Formationen lymphknotenähnlicher

Struktur und vermehrter Exsudation von Gelenkflüssigkeit. Im weiteren Verlauf der Erkrankung bedecken aktivierte synoviale Makrophagen und proliferierende Fibroblasten den Gelenkknorpel mit Pannus und ersetzen den Gelenkknorpel. Daraus resultiert eine erosive Veränderung des subchondralen Knochens, die letztlich eine vollständige Gelenkzerstörung bewirken kann.

Bei einer autoimmun induzierten Arthritis (AIA) treten bestimmte nachweisbare molekularbiologische Veränderungen im Gewebe auf, welche hier erläutert werden.

In den letzten Jahren haben sich in weitreichenden Forschungsarbeiten zwei molekulare Mechanismen herauskristallisiert, die eine Schlüsselrolle spielen. Zum einen scheint das Ungleichgewicht zwischen der Expression und Sekretion der Matrix Metalloproteinasen (MMP) und der Tissue-inhibitors of Matrix Metalloproteinase (TIMP) ein ausschlaggebender Prozess für die Intaktheit des Gelenkes zu sein (5). TIMP sind gewebsschutzende Antagonisten der MMP. Zu Beginn des destruktiven Prozesses setzen Fibroblasten enorme Mengen proteolytischer Enzyme frei, die diesen Prozess aufrecht erhalten. Die Entdeckung von proteoglycan- und kollagenabbauenden MMP führte zu einem besseren Verständnis des zellulären Umsatzes in vielen Geweben. Zum anderen spielen inflammatorische Zytokine, hauptsächlich Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha), Interleukin 1 (Il-1) und Interleukin 6 (Il-6), multiple Rollen und scheinen sowohl verantwortlich für destruktive, als auch für reparative Prozesse zu sein (6). So können Osteoklasten aktiviert werden und zum Verlust von subchondralem Knochen führen.

TNF-alpha selbst induziert proinflammatorische Zytokine, aktiviert Leukozyten, Killerzellen und zytotoxische T-Zellen. Desweiteren fördert TNF-alpha die Osteoklastenaktivität, hemmt die Kollagensynthese und fördert die Knorpeldestruktion. TNF-alpha ist in der Synovialmembran und in der Synovia bei der rheumatoiden Arthritis stark exprimiert. Es induziert desweiteren die Synthese proinflammatorischer Zytokine und Metalloproteinasen der synovialen Fibroblasten und vermindert die Proteoglykansynthese der Chondrozyten (7). Il-1-beta wird bei Patienten mit aktiviertem Immunsystem vermehrt sezerniert. Il-1-beta wird, wie auch TNF-alpha, von vielen Zellen des Immunsystems produziert. Es induziert unter anderem die Produktion von TNF-alpha, Il-1-beta, Il-6 und weiterer Zytokine, stimuliert die Osteoklastengengese, fördert die Expression von knorpelzerstörenden Metalloproteasen, fördert die Chemokinproduktion und spielt eine Rolle in der Neoangiogenese. Man kann Il-1-beta vermehrt

in der Synovia, dem Synovialen Gewebe und im Serum bei der rheumatoiden Arthritis nachweisen (7). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese von Blutgefäßen und der Vergrößerung lymphatischer Gefäße bei vielen Autoimmunerkrankungen wie der RA. Viele Studien konnten zeigen, dass die VEGF-Expression hier hochreguliert ist. Des Weiteren spielt VEGF eine Rolle in der Reaktion auf entzündliche Prozesse, in der Wundheilung und beim Tumorwachstum. Ebenso wird vermutet, dass VEGF durch die Veränderung der Blut- und lymphatischen Gefäßsituation auf die Immunantwort der Lymphknoten Einfluss haben könnte (8). Il-6 wird unter anderem in T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen produziert. Es wurden hohe Konzentrationen bei RA beobachtet. Ebenso wird vermutet, dass Il-6 zur Produktion von Autoantikörpern beitragen könnte, indem es die B-Zell-Proliferation steigert. Lokal kann Il-6 von unterschiedlichen Zellen der entzündeten Synovialmembran gebildet werden. Ebenso könnte Il-6 selbst für die Pannusbildung verantwortlich sein. Il-6 fördert Knochenabbau und hemmt Knochenaufbau (7). Für Insulin-like Growth Factor (IGF-1) wurde ein starker Einfluß auf die Knorpelzellregeneration beziehungsweise -zerstörung nachgewiesen. Ebenso wurden erhöhte Konzentrationen in der synovialen Flüssigkeit entzündeter Kniegelenke gefunden (9, 10). Zytokine vermitteln inflammatorische Prozesse, dagegen reguliert IGF-1 die Proteoglykanproduktion der Knorpelzellen (11). So kann die erhöhte Bindungsfähigkeit für IGF-1 bei Arthritis erklärt werden (12). Unter den hier genannten Faktoren erweckten in der Vergangenheit Il-6 und VEGF die höchste Aufmerksamkeit (13-17). Dabei spielt VEGF eine Schlüsselrolle bei der Hypervaskularisation in entzündetem Gewebe und repräsentiert überdies einen frühen Marker der Arthritis und Synovialitis (16). Die Blockierung von VEGF ist daher ebenfalls ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung der Entzündungsreaktion. Im Gegensatz dazu wurde die Rolle von TNF-alpha zur Regulierung der Zytokinkaskade schon längst erkannt. Das Zytokinkonzept wurde in vitro und in vivo erforscht und hatte zum Ziel Il-1-beta und Il-6 zu blockieren (18). Als Konsequenz ergab sich für diese Studie ein Hauptfokus auf die Untersuchung von Il-1-beta und Il-6 im Zusammenhang mit TNF-alpha.

1.2 Aktuelle Therapiekonzepte der rheumatoiden Arthritis

Therapeutische Konzepte zur Behandlung der RA umfassen die ganze Breite medizinischer Interventionsmöglichkeiten. Diätetische Maßnahmen sowie Physiotherapie spielen eine wichtige Rolle. Pharmakologische Maßnahmen reichen von unspezifischer antiinflammatorischer Medikation bis zur spezifischen Hemmung molekularer Mechanismen. Als Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARDs) bezeichnet man Medikamente, die für die Standardbehandlung von RA verwendet werden. Sie verlangsamen die Progression der Erkrankung bzw. lindern die Symptome. DMARDs werden entweder alleine oder in Kombination mit neueren, sogenannten „Biologicals“ verwendet. „Biologicals“ sind spezifische Inhibitoren und Antagonisten von Entzündungsmediatoren. DMARDs neigen dazu ihre Wirksamkeit im Laufe der Zeit zu verlieren, sodass die Patienten nur selten länger als zwei Jahre Gebrauch davon machen können und führen häufig langfristig zu schwerwiegenden Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt (19, 20) (Tab. 1). Neben klassischen Antiphlogistika wie Ibuprofen und Diclofenac war lange Zeit Methotrexat (MTX) als antiinflammatorisches Agens die effektivste Medikation (21-23). Nachteile dieser Therapie sind starke Nebenwirkungen und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, wodurch eine hohe Rate an Therapieabbrüchern verzeichnet wird. Zusätzlich besteht ein enges therapeutisches Spektrum bezüglich der therapeutischen Dosis.

„Biologicals“ sind spezifisch antientzündlich wirkende Medikamente. Durch die spezifische Inhibition von inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. TNF-alpha, sollen Pathomechanismen der RA blockiert werden (19). Die Entwicklung der „Biologicals“ hat eine verbesserte Wirkung, sowie eine Reduktion von Nebenwirkungen zum Ziel. Dennoch entstehen unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie zum Beispiel eine erhöhte Infektionsneigung bis hin zur Sepsis, Reaktivierung von Tuberkulose oder Verschlechterung einer Herzinsuffizienz (24). Klinische Studien unterstützen den Einsatz von Antikörpern wie z.B. Etanercept, Infliximab und Rituximab (19).

Ziel aller therapeutischen Konzepte ist es, die klinische Remission zu erreichen (25, 26). Entzündungssymptome sollen vermindert, sowie das Allgemeinbefinden des Patienten verbessert werden. In den meisten Fällen wird heute medikamentöse Therapie mit physikalischer und Physiotherapie kombiniert.

Tabelle 1: Systematische Auflistung der Therapeutika

Wirkstoffgruppe	Medikament	Wirkmechanismus des Medikaments
1. Glukokortikoide		
Prednisolon		Antiphlogistisch, -allergisch, immunsuppressiv,
2. DMARDs		
2.1 Immunsuppressiva		
MTX		Folsäureantagonist mit antineoplastischer und immunsuppressiver Wirkung
Azathioprin		T-Zellapoptoseregulierung, immunsuppressiv
Ciclosporin A		Hemmung zellvermittelnder Reaktionen, immunsuppressiv
Leflunomid	Avara®	Dehydroorotat-Dehydrogenase-Blocker, Hemmung aktivierter Lymphozyten
2.2 Alkylantien		
Cyclophosphamid		Zytostatikum
2.3 Sonstige		
Sulfasalazin	Azulfidine RA®	Antimalariamittel, Antirheumatische Wirkung evtl. über immunsuppressive Wirkung erklärbar
Hydroxychloroquin	Quensyl®	
Goldtherapie (oral /parenteral)		Wirkmechanismus unvollständig geklärt, hemmt Antigenprozessierung
3. „Biologicals“		
3.1 Anti-TNF-alpha-Therapie		
Infliximab	Remicade®	Monoklonarer chimärer Ak gegen TNF-alpha
Adalimumab	Humira®	Antikörper (Ak) gegen TNF-alpha
Etanercept	Enbrel®	Bindet proinflammatorisches Zytokin des TNF-alpha und TNF-beta und hemmt dadurch die Bindung an den zugehörigen Rezeptor
Certolizumabpegrol		Pegyliertes Fab Fragment gegen TNF-alpha
3.2 andere „Biologicals“		
Tocilizumab	Actemra®	Humanisierter Ak gegen löslichen und membrangebundenen Il-6-Rezeptor
Anakrina	Kinet®	Il-1-beta-Rezeptor-Antagonisten, antiinflammatorisch
Rituximab	MabThera®	Anti-CD20(+) –Ak
Abatacept	Orencia®	CTLA4-Ig-Fusionsprotein, Hemmung der T-Zell-Kostimulation

Wirkstoffgruppe	Medikament	Wirkmechanismus des Medikaments
4. Nichtsteroidale Antiphlogistika (nichtsteroidale Antirheumatika, NSAR)		
4.1 Unselektive Cyclooxygenase-1/2 (COX-1/2)-Inhibitoren (Hemmung der Prostaglandinsynthese)		
Propionsäurederivate	Ibuprofen®	Hemmung der Prostaglandinsynthese über COX-1/2
Arylessigsäurederivate	Diclofenac®	
Naproxen		
Acetylsalicylsäure (ASS) findet keinen Einsatz in der Therapie!		Bemerkung: zu hohe Dosierungen notwendig, daher viele Nebenwirkungen bei geringem Nutzen
4.2 Selektive COX-2-Inhibitoren (Coxibe)		
Celecoxib	Celebrex®	Selektive COX-2-Hemmung über Prostaglandine
Rofecoxib		Auf Grund von kardiovaskulärer Nebenwirkungen vom Markt genommen
Valdecoxib		
5. Weitere Medikamente		
5.1 Immunglobuline		
IgG und IgA		Neutralisation von Antigenen, Markierung von Antigenen, Aktivierung des Komplementsystems
5.2 Parathormon(-analoge) und Bisphosphonate		
Parathormon(-analoge)	Teriparatid	Regulation Kalzium- und Phosphatstoffwechsel bzw. Freisetzung / Resorption in der Niere, aus dem Knochen, beeinflusst Osteoklasten
Bisphosphonat	Alendronat	Verminderte Knochenresorption, bilden Kalziumkomplexe, beeinflusst Osteoklasten
	Risedronat	
Hyaluronate		Intraartikuläre Injektion verbessert vermutlich die funktionellen Eigenschaften der Gelenkflüssigkeit und der Hyaluronsäureschicht auf der Oberfläche des Gelenkknorpels
5.3 D-Penicillamin (D-Pen)		
D-Pen		Chelatbildner, Reduzierung der T-Lymphozyten im Synovialgewebe (tierexperimentell nachgewiesen)

Quelle: Leitlinie Rheumatologie der DGRh 2007 (27), Fachinformation für Ärzte und Apotheker (28) und Herold, Innere Medizin 2009 (24)

Neben der physikalischen und pharmakologischen Therapie werden auch chirurgische Therapieformen angewendet. Bei therapieresistenter Synovialitis kann die

Synovektomie zur Linderung der Symptome führen (24, 27). Die Pathogenese der Erkrankung wird durch diese Therapieform jedoch nicht adressiert, und das Fortschreiten kann daher nicht verhindert werden. Bei ausgedehnter Zerstörung artikulärer Strukturen und hohem Leidensdruck des Patienten bleibt oft nur der prothetische Gelenkersatz. Die endoprothetische Chirurgie bei RA stellt hohe Anforderungen an den Operateur, da die Gelenkanatomie und Knochenstruktur durch die chronische Entzündung und deren medikamentöse Behandlung wesentlich verändert sein kann (2, 29). Insbesondere durch die immunsuppressive Therapie mit Prednison und anderen Immunsuppressiva kann es zu Problemen bei der Verankerung von Prothesen durch Osteoporose kommen (2, 30, 31).

1.3 Platelet-rich Plasma und dessen Herstellung

Platelet-rich Plasma (PRP) ist ein autologes Thrombozytenkonzentrat, das aus peripherem Venenblut gewonnen werden kann. Zu Beginn dieses Jahrhunderts ist PRP erstmals zur Unterstützung von Gewebeheilung klinisch eingesetzt worden. Die Substanz kann autolog und damit ohne immunologische Risiken appliziert werden (32).

Thrombozyten und die Wachstumsfaktoren, die sie ausschütten, sind essentiell für die Regulierung der zellulären Abläufe nach Gewebeschädigung. Nach einer Gewebeerletzung werden sie an der subendothelialen Schicht der verletzten Gefäße aktiviert und bilden mit Fibrin, unter der Aktivierung der Gerinnungskaskade, einen Thrombus, welcher zur Blutstillung beiträgt. Durch das gebildete Fibrinnetz entsteht für geweberegenerierende Zellen die Möglichkeit, einzuwandern (32, 33). Des Weiteren kommt es durch die Thrombozytenaktivierung zur Degranulation von sogenannten Alpha-Vesikeln und somit zur Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (34). Zu den bisher bekannten in Thrombozyten enthaltenen Faktoren gehören Platelet-derived Growth Factor (PDGF und Isoformen), Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta1 und -beta2 Isoformen), Platelet Factor 4 (PF4), Interleukin-1 (IL-1), Platelet-derived Angiogenesis Factor (PDGF), VEGF, Epidermal Growth Factor (EGF), IGF, Osteocalcin (Oc), Osteonectin (On), Fibrinogen (Fg), Vitronectin (Vn), Fibronectin (Fn) und Thrombospondin-1 (TSP-1) (32, 35-38). Viele dieser Faktoren haben positive Einzelwirkungen auf unterschiedliche geweberegenerierende Prozesse (39-48).

Klinisch ist PRP zunächst in der Maxillofazialchirurgie eingesetzt worden, hauptsächlich als autologes Additiv für Knochen- und Weichgewebetransplantate (49, 50). Hier bewirken die in den Thrombozyten enthaltenen Faktoren eine deutlich schnellere Regeneration des Gewebes nach Zahnextraktion oder der Einbringung von Titanimplantaten (50).

Neuere Anwendungsmöglichkeiten sind für viele Gebiete beschrieben worden. So kann PRP z.B. in der Therapie chronischer Ulcera zu einer verbesserten Wundheilung führen (32, 51). Im orthopädischen Bereich konnte eine Verbesserung der lumbalen Fusion erreicht werden (32, 52). Bei Pseudarthrosen, die intraoperativ zusätzlich mit PRP behandelt wurden, konnte radiologisch eine durchschnittlich frühere Ausheilung erzielt werden (53, 54). Auch entzündliche und degenerative Prozesse werden experimentell und klinisch mit PRP-Applikation behandelt. Ebenfalls wird PRP intraoperativ verwendet, um postoperative Komplikationen zu reduzieren (55). Einsatzgebiete sind z.B. die Behandlung chronischer Ansatzdysplasien (56), oder die Behandlung von Achillessehnenrupturen (57). Weitere Verwendung findet PRP in der Arthroskopie und Sportmedizin (58). Neben antiinflammatorischen und regenerativen Wirkungen sind auch antiinfektive Effekte von PRP beschrieben worden (59, 60).

Die neueste Anwendung von PRP ist die intraartikuläre Injektion in das Kniegelenk bei degenerativer Arthritis (Arthrose). Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass Injektionen im Initialstadium der Arthrose zur kurzfristigen Besserung der klinischen Symptome führen (61, 62). Die Pathogenese von Arthrose und Arthritis stimmt in vielen Punkten überein (63, 64). Im amerikanischen Sprachgebrauch wird daher der Oberbegriff „Arthritis“ für degenerative, sowie autoimmune gelenkschädigende Prozesse verwendet (65).

PRP kann heute durch von Firmen (GPS® System, Biomet (66)) entwickelte Systeme zeitsparend, unkompliziert und mit niedrigen Kosten aus Vollblut hergestellt werden (67, 68). Da PRP aus autologem Material gewonnen wird, ist der Einsatz bezüglich Immunreaktionen und Infektionen unbedenklich. Dies erleichtert den Einsatz in der klinischen Praxis erheblich. Daher hat die Verwendung von PRP und autologer Thrombozytenkonzentrate in der Vergangenheit, auch aufgrund der vielfältigen Einsetzbarkeit in chirurgischen Prozeduren, zunehmend an Popularität gewonnen. In der Maxillofazialchirurgie wird PRP schon routinemäßig eingesetzt (32, 69).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Vorliegende Arbeiten legen nahe, dass die intraartikuläre PRP-Injektion die intraartikuläre Entzündung beeinflusst (61, 62). In einem Tiermodell sollte daher überprüft werden, ob die autoimmun induzierte Arthritis (AIA) durch intraartikuläre PRP-Injektion moduliert werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein immunologisches Arthritis-Modell im Schweineknie etabliert. Im zweiten Teilversuch wurden die molekularen Effekte von PRP auf Entzündung und damit auf Arthritis untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Versuchsdurchführung erfolgte am Institut für Rechtsmedizin der Semmelweis Universität Budapest unter Aufsicht von Dr. E. Felzeghy im Tierstall Herceghalom. Die Studie wurde im Pest Megyei Allategészségügyi és élelmiszer ellenőrző allomás (Ministry of Agriculture and Rural Development) durch das Komitat Pest Animal Health and Food Control Station (Versuchstiergenehmigung Nr.: 1053/eoh/2007) Budapest, Ungarn genehmigt.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstier wurde das Hausschwein (Hungarpig) im Alter von 6 bis 6,5 Monaten ausgewählt. Das Hausschwein gehört zu den Wirbeltieren. In Bezug auf anatomische, biomechanische und physiologische Eigenschaften ähnelt es dem Menschen mehr als beispielsweise Nager und Hunde (70-73). Die Eignung des Schweins, als Modelltier, für die humanmedizinische Forschung wurde in der Literatur schon mehrfach gezeigt (70-75). Die 15 Hausschweine wurden im Stall gehalten und konnten sich darin uneingeschränkt bewegen.

2.3 Autoimmun induzierte Arthritis (AIA) als Modell für rheumatoide Arthritis

In früheren Studien an Beagles konnte gezeigt werden, dass Arthritis durch intraartikuläre Injektion von bovinem Serumalbumin (BSA) erzeugt werden kann. Daher wurde in dieser Studie ebenso BSA als immunisierendes Agens verwendet (76). Eine Immunisation der Tiere mit BSA war notwendig, um später, bei der intraartikulären BSA-Injektion, eine Reaktion auf BSA zu erreichen. Demzufolge wurde bei nicht immunisierten Tieren keine intraartikuläre Reaktion auf die lokale BSA-Injektion erwartet.

Um den Tieren größeren Stress zu ersparen und um gute Bedingungen zur intraartikulären Injektion zu erhalten, wurden die Tiere mittels intramuskulärer Injektion mit Midazolam (0,5 mg/kg Körpergewicht) (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und Ketamin

(15-20 mg/kg Körpergewicht) (Pfizer Pharma, Berlin, Deutschland) narkotisiert. Die intravenösen und intraartikulären Injektionen erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Postoperativ erhielten die Tiere zur Analgesie in der Aufwachphase 250 mg Metamizol (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) intramuskulär, und am ersten Tag postoperativ 2 mal 500 mg Paracetamol (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) pro Tag als Analgetikazusatz im Futter.

Einteilung der Studiengruppen:

Gruppe 1 (Hausschwein 1-5):

Fünf Tiere wurden in Woche 0 bis 2 durch intravenöse Gabe von BSA (0,8 ml/kg) (77) immunisiert. In Woche 4 bis 6 erfolgten intraartikuläre NaCl- bzw. BSA-Injektionen (5 mg/ml) in das linke und rechte Kniegelenk (Tab. 2).

Gruppe 2 (Hausschwein 6-10):

Kontrollgruppe: Fünf Tiere, ohne intravenöse BSA-Injektion, erhielten eine BSA-Injektion (in Woche 4 bis 6) in das linke und eine NaCl-Injektion in das rechte Kniegelenk (Tab. 2).

Die Tiere der Gruppe 3 (Hausschwein 11-15) wurden zuerst analog der Tiere in Gruppe 1 behandelt. In einem zweiten Schritt wurde zusätzlich PRP intraartikulär injiziert (siehe 2.4.2).

2.4 Produktion und Modell zur PRP-Injektion

2.4.1 Produktion von PRP

PRP wurde aus 50 ml Vollblut durch Punktion der Vena jugularis interna der Schweine gewonnen. Zur Entnahme wurden Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin- (CPDA-) beschichtete Monovetten (Saerstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Das Vollblut wurde durch Zentrifugation mit 200 g in eine Thrombozytenhaltige und eine Zellhaltige Fraktion unterteilt (78).

Mit einer zweiten Hochgeschwindigkeitszentrifugation (2000 g) (Biomet, Warsaw, USA) wurden die Thrombozyten sedimentiert und auf 1/10 des initialen Blutvolumens verdünnt (78, 79). Diese Methode ergab eine Thrombozytenkonzentration von circa 1 Mio. Thrombozyten/ μ l. Es wurden 5 ml PRP gewonnen. Diese konnten zu verschiedenen Zeitpunkten, wie in Tabelle 2 dargestellt, intraartikulär, nach Induktion der Arthritis, in das Knie injiziert werden.

2.4.2 Modell zur PRP-Injektion

Gruppe 3 (Hausschwein 11-15):

Fünf Tieren wurde in Woche 0 bis 2 intravenös BSA appliziert und in Woche 4 bis 6 intraartikulär in beide Kniegelenke injiziert. In das rechte Kniegelenk wurde in Woche 8 bis 10 frisch hergestelltes PRP injiziert (Tab. 2).

Tabelle 2: Chronologische Darstellung des Versuchsablaufs

Woche	Datum	Tier 1 bis 5	Tier 6 bis 10	Tier 11 bis 15
0	29. Oktober 2007	BSA Immunisierung	∅	BSA Immunisierung
1	01. November & 05. November			
2	08. November & 12. November			
3	15. November & 18. November			
4	22. November & 26. November			
5	03. Dezember	BSA Injektion Linkes KG, NaCl rechtes KG		BSA Injektion beide KG
6	10. Dezember			
7	17. Dezember			
8	24. Dezember			
9	31. Dezember			
10	07. Januar 2008	Tötung der Tiere		PRP Injektion rechtes KG
11	14. Januar			∅
12	21. Januar			PRP Injektion rechtes KG
13	28. Januar			∅
14	04. Januar			Tötung der Tiere

BSA = Bovines Serum Albumin, KG = Kniegelenk, NaCl = physiologische Kochsalzlösung, ∅ = kein Eingriff am KG.

2.5 Vorbereitung zur Probenentnahme und Untersuchung

Zwei Wochen nach der letzten intraartikulären Injektion wurden alle Tiere getötet und die Kniegelenke entnommen. Diese wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei einer Temperatur von minus 20°C gelagert. Zur anschließenden Probenentnahme wurden die Kniegelenke angetaut. Die Gelenkkapsel wurde mit einem Einmalskalpell (Dr. Junghans Medical, Bad Lausick, Deutschland) eröffnet. Gelenkknorpel-Knochenstücke wurden mit einer Diamantbandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) entnommen (Abb. 1-4). Eine ständige Wasserkühlung verhinderte eine Schädigung des Gewebes durch Überhitzung.

Die Entnahme der Gelenkknorpel-Knochen-Proben erfolgte an den Femurkondylen. Die Entnahme der Synovialmembranproben und des Gelenkknorpels ohne subchondralen Knochen erfolgte an verschiedenen Stellen mit dem Einmalskalpell (Abb. 5). Die Proben wurden in Paraformaldehyd (J. T. Baker, Phillipsburg, USA) oder in Kryogefäßen (Genaxxon BioScience, Ulm, Deutschland) bei einer Temperatur von minus 20°C fixiert. Eine unterschiedliche Behandlung der Proben musste bereits zu diesem Zeitpunkt erfolgen, da die Durchführung immunologischer Gewebeuntersuchungen bei Fixierung in Paraformaldehyd erschwert wäre.

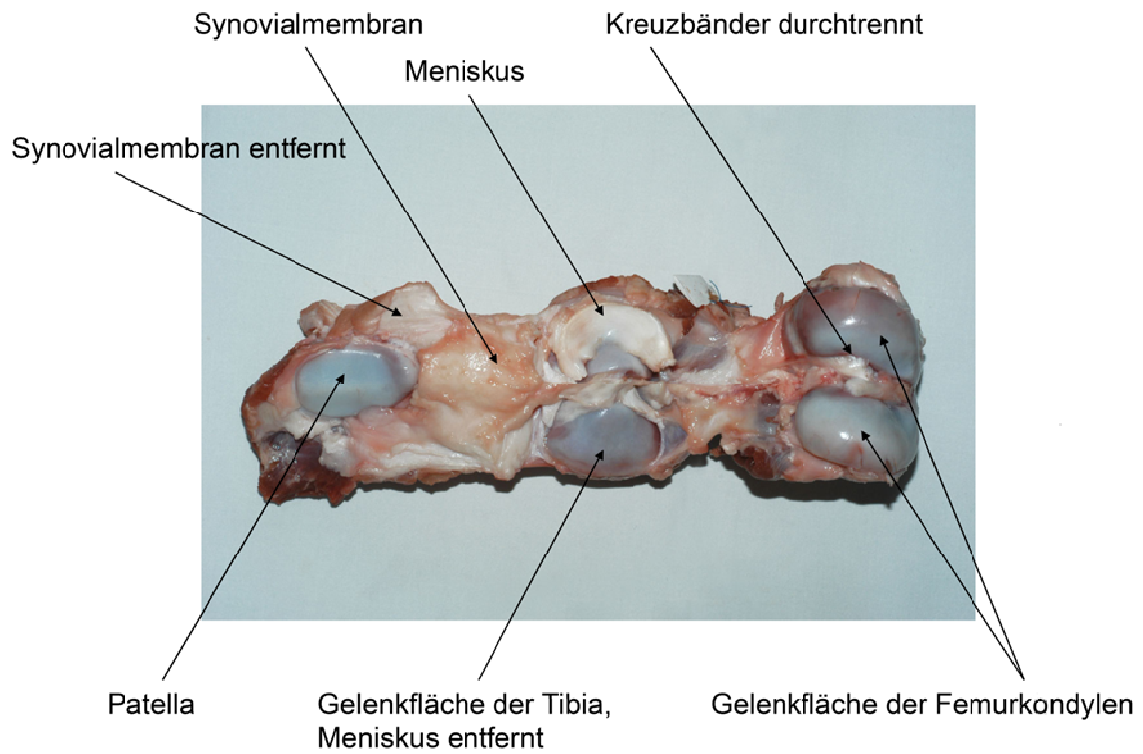


Abbildung 1: Eröffnetes Kniegelenk

Eröffnetes rechtes Kniegelenk, Patella, Tibiaplateau (Präparatmitte), Synovialmembran (teilweise) und Meniskus medialis (total entfernt), Kreuzbänder (durchtrennt), Femurkondylen rechts, weiße Markierung zur Unterscheidung der Kniegelenke (rechts über Meniskus in Abbildung)

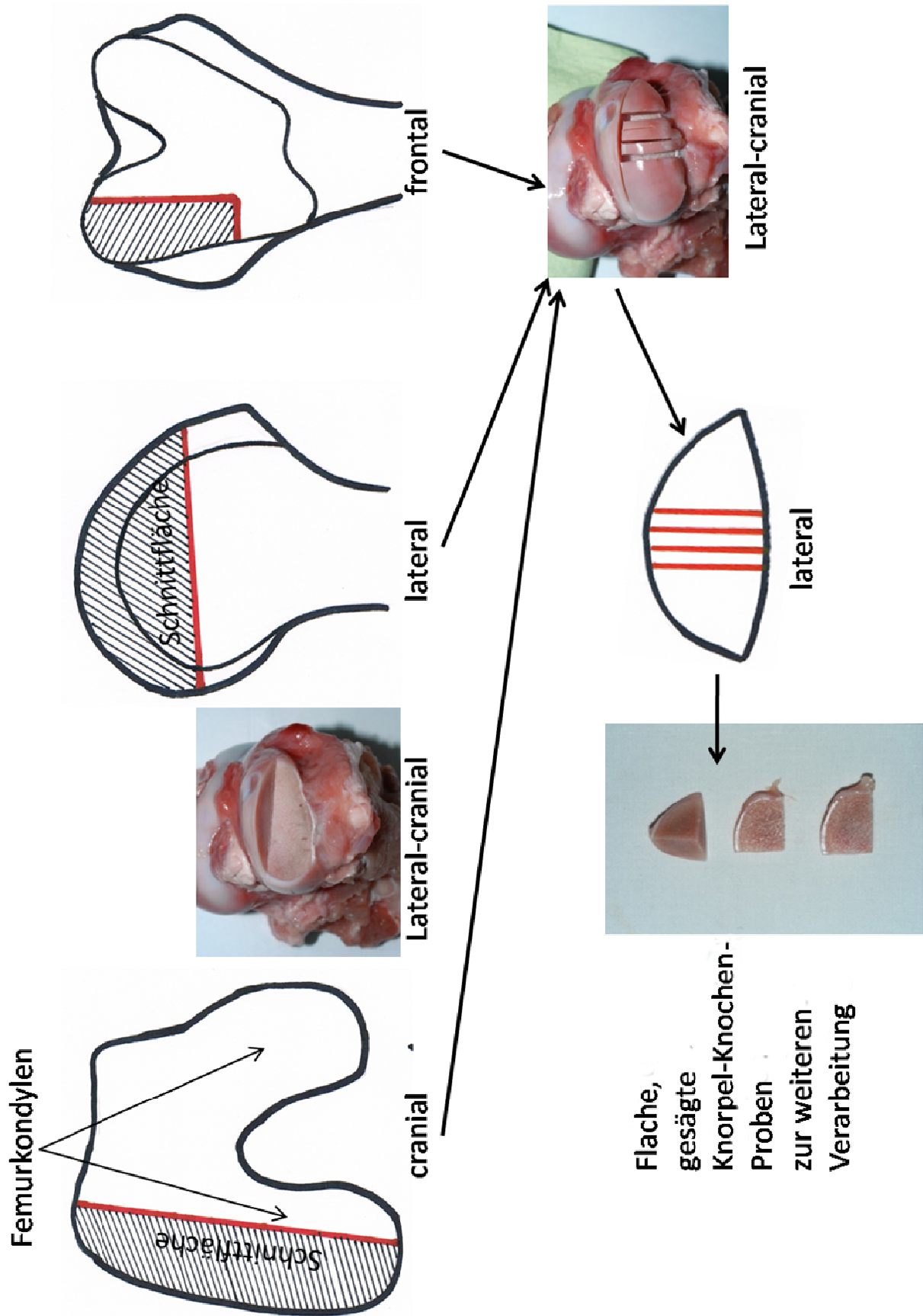


Abbildung 2: Entnahmeweise der Knorpel-Knochen-Proben

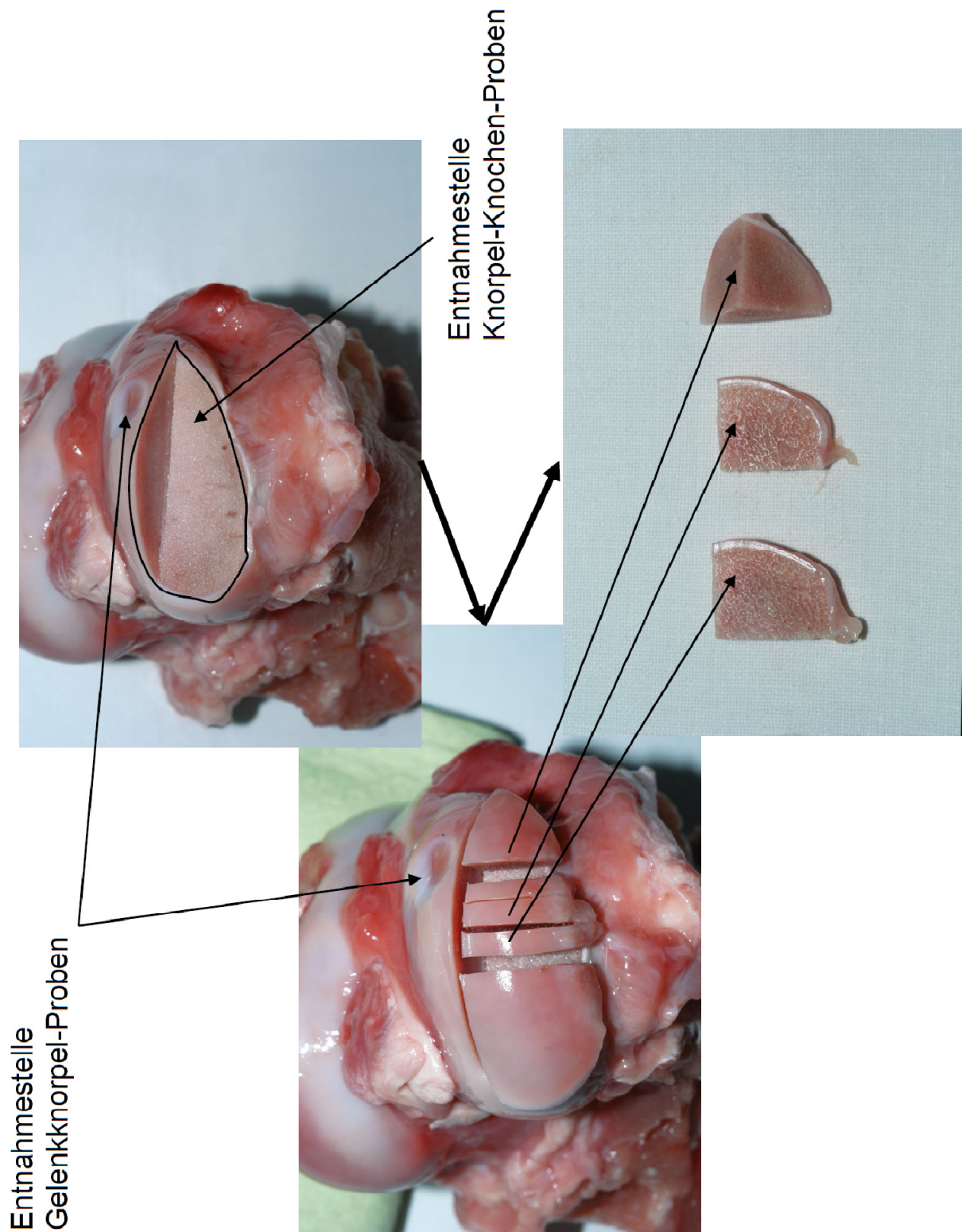


Abbildung 3: Femurkondylen nach Probenentnahme

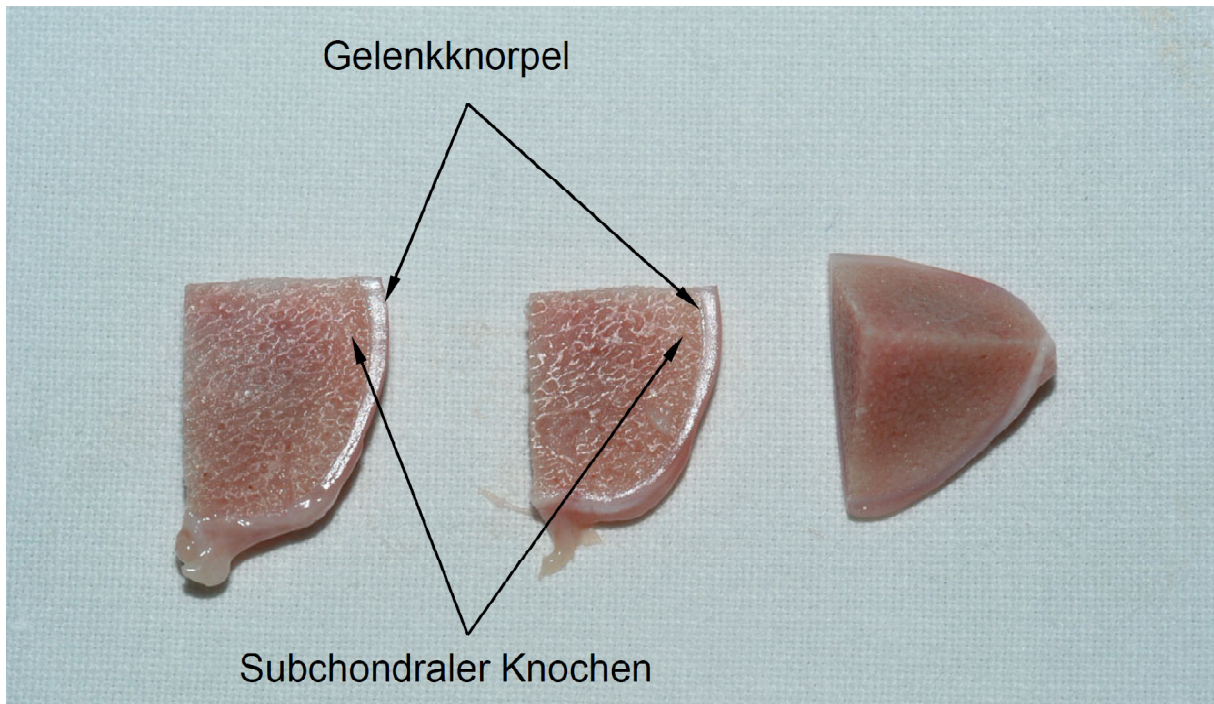
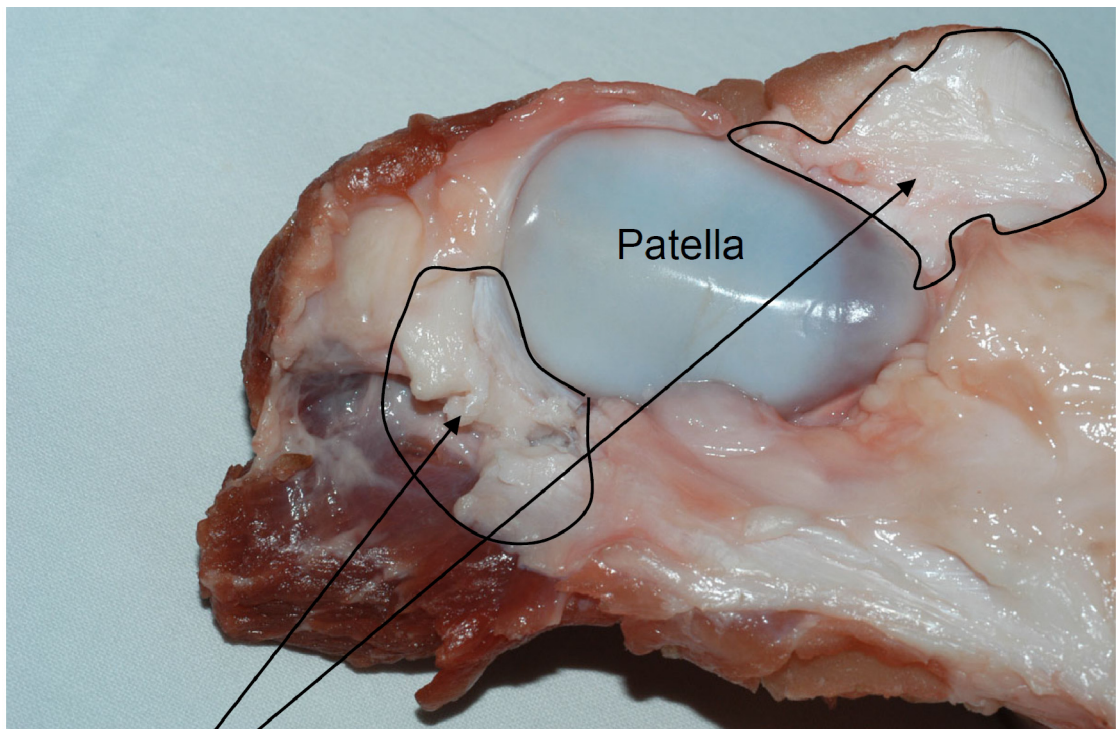


Abbildung 4: Entnommene Knorpel-Knochen-Präparate aus den Femurkondylen



Synovialmembran entfernt

Abbildung 5: Patella mit partieller Resektion der Synovialmembran

2.6 Kalzifizierte Histologie

Zur Darstellung der Knochenstruktur wurden die Proben in Polymethylmetacrylat (PMMA) (Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA) eingebettet. Bei dieser Methode werden die Proben nicht dekalzifiziert. Die Strukturen des Knochens blieben somit erhalten.

2.6.1 Vorbereitung der Hartschliffe für die Einbettung

Die Proben für die kalzifizierte Histologie wurden in 10 %igem, gepuffertem Formalin (J. T. Baker, Phillipsburg, USA) fixiert. Je nach Präparategröße benötigte man 10 bis 14 Tage. Die Proben wurden durch ansteigende Ethanolreihen (BüFa Chemikalien, Hude/ Altmoorhausen, Deutschland) dehydriert und in PMMA eingebettet.

Dehydratation:

1. 60 %	vergälltes Ethanol	2 Stunden
2. 80 %	vergälltes Ethanol	2 Stunden
3. 90 %	vergälltes Ethanol	4 Stunden
4. 96 %	vergälltes Ethanol	5 Stunden
5. 100 %	vergälltes Ethanol	4 Stunden
6. 1:1	Aceton: Ethanol	1 Stunden
7. 1:1	Aceton: Ethanol	4 Stunden
8. 100 %	vergälltes Ethanol	1 Stunden
9. 100 %	vergälltes Ethanol	4 Stunden
10. 100 %	vergälltes Ethanol	3 Stunden

Einbettung in PMMA:

11. reines PMMA 10-24 Stunden
12. Einbettgemisch sofort über ca. 3 bis 5 Tage kühl gelagert

Die Proben wurden in einem Glasgefäß in einem Gemisch aus PMMA, Weichmacher (Sigma-Aldrich/ Fluka, St.Louis, USA) und einem Katalysator (Sigma-Aldrich/ Fluka, St.Louis, USA) eingebettet. Die Fixierung der Präparate auf dem Boden der Einbettungsgefäße verhinderte ein Abheben des Gewebes. In einem warmen Wasserbad erfolgte die Polymerisation des Kunststoffes. Die ausgehärteten Blöcke mit den darin enthaltenen Proben wurden durch Zerschlagen des Glasgefäßes befreit.

Gefahren bei der Dehydratation sind Zerreißen, Schrumpfen, Härten oder Lipidextraktion der Präparate (80). Es ist unbedingt notwendig, das Einbettungsgemisch sofort nach der Einbettung kühl zu lagern. Bei zu warmer Lagerung besteht die Gefahr der Auspolymerisation und die Proben sind nicht mehr bewertbar.

2.6.2 Herstellung der Hartschliffe

Um dünne Präparatscheiben zu erhalten wurden die Präparate nach der Probenentnahme mit der Diamantbandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) weiter in quadratische Probenblöcke zugeschnitten. Die Oberfläche wurde poliert und der Probenblock auf einen mit Spezialfolie (Neschen, Bückeberg, Deutschland) beklebten Objektträger mit Sekundenkleber (Loctite/ Henkel, Garching, Deutschland) aufgeklebt. Um während der Trockenphase des Klebers Blasenbildung zwischen Präparat und Objektträger zu vermeiden, wurden die Präparateblöcke mit Druck auf den beschichteten Objektträger aufgepresst. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Exakt, Norderstedt, Deutschland) wurden die Präparate in eine Sägevorrichtung eingespannt. Es erfolgte das Einstellen des Oszillationskippwinkels und der Distanz zum Sägeblatt, um ca. 200 µm dicke Präparate zu erhalten. Um die Solldicke von ca. 80 µm bis 100 µm (für die Mikroradiographie) oder 40 µm (für die Toluidinblaufärbung) zu erreichen, wurden die Präparate mit der Schleifmaschine (Exakt, Norderstedt, Deutschland) (1200er Körnung) geschliffen. Mit Hilfe eines Handmessgerätes (Tesa/ Etalon, Renens, Schweiz) wurde die Präparatdicke kontrolliert. Die weiteren Schleifvorgänge erfolgten bis zur Politur per Hand auf Tellerschleifern mit steigend gekörntem Schleifpapier (2400er und 4000er Körnung). Bei zu hohen Drehzahlen der Schleifteller oder zu hohem Anpressdruck der Präparate sind Schäden des Gewebes möglich. Zur Gewebeschonung fanden alle Säge- und Schleifvorgänge wassergekühlt statt. Um Schäden rechtzeitig zu erkennen, Schleifspuren zu entfernen und den Fortschritt bewerten zu können, erfolgte eine ständige Kontrolle unter dem Mikroskop.

Nach diesen Arbeitsschritten wurden die Proben für die Mikroradiographie verwendet oder mit Toluidinblau gefärbt.

2.6.3 Färbung der Hartschliffe mit Toluidinblau

Toluidinblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) ist ein basischer Thiazinfarbstoff. Mit ihm lassen sich unterschiedliche Gewebe im Labor färben. Die mineralisierte Hartgewebematrix stellt sich blassblau dar. Zellen und Weichteilgewebe sind unterschied-

lich blau, Knorpelmatrix und Mastzellengranula erscheinen metachromatisch rotviolett und die verkalkte Knorpelmatrix ist dunkelblau gefärbt. Zur Färbung mit Toluidinblau wird die Technik nach Romeis (80) modifiziert. Zum Entkalken der Schlifffläche und zur Verbesserung der Anfärbbarkeit der Knochenmatrix wurden die Präparate für 2 bis 4 Minuten mit 0,1 %iger Ameisensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet und anschließend mit Aqua dest (Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült. Das Einlegen der Präparate für 60 bis 120 Minuten in 20 %iges Methanol (J. T. Baker, Phillipsburg, USA) verbessert die Zell- und Weichgewebefärbung. Ein längeres Lagern kann zum Verquellen der Zellen führen. Anschließend folgte eine weitere Spülung mit Aqua dest. Die Hartschliffpräparate wurden nun für 3 Minuten in das filtrierte Toluidinblau eingelegt und mit Aqua dest gespült. Es fand eine Differenzierung unter dem Mikroskop mit HCl-Alkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Toluidinblau statt, um die Strukturen optimal darzustellen.

2.6.4 Mikroradiographie der Hartschliffe

Die Lichtempfindlichkeit der Röntgenplatten (HTA Enterprises Microtome Technology Products, Remede Lane, USA) erforderte ein Arbeiten in der Dunkelkammer bei Rotlicht. Die vorbereiteten Präparate wurden vom Objektträger (Gerhard Menzel GmbH/ Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) mit der Spezialfolie abgezogen und mit Klebeband (Tesafilm) auf die beschichtete Seite der Mikroradiographieröntgenplatte geklebt. Die Bestrahlungsintensität betrug 3 mA und 25 kV.

Entwicklung und Fixierung der Mikroradiographieröntgenplatten:

1. Entwickler: Stocklösung (Dürr Periomat Intra/ Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) 100 ml plus 300 ml Aqua dest bei genau 20°C für 5 Minuten
2. Stoppbad: 4 ml Eisessig plus 400 ml Fixierer (Kodak, Stuttgart, Deutschland) plus Spüllösung AGEPON (Agfa-Gevaert, Leverkusen, Deutschland) für 2 Minuten
3. Fixierungsbad: 100 ml Fixierer plus 300 ml Aqua dest für 10 Minuten
4. 10 Minuten unter fließendem Wasser abspülen
5. Eintauchen des Präparates in Spüllösung AGEPON zur Vermeidung von Kalkflecken
6. Einbettung in Eukitt (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 2 Tage Lagerung unter dem Abzug

Unter dem Mikroskop erscheint älterer Knochen heller als jüngerer Knochen, da älterer Knochen stärker mineralisiert ist.

2.7 Entkalkifizierte Histologie

Ein Teil der Knochenproben wurde in 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei pH 7,4 dekalzifiziert und anschließend in Paraffin (McCormick Scientific/ Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingebettet. Schnitte mit einer Dicke von 5 µm wurden mit einem Schlittenmikrotom (HTA Enterprises Microtome Technology Products, Remuda Lane, USA) aus repräsentativen Teilbereichen der Femurkondylen hergestellt und auf Superfrost plus Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden bei 37°C getrocknet.

Entparaffinierung vor der Färbung mit Antikörpern bzw. mit Hämatoxylin-Eosin:

1. Einlegen der Proben in Xylol für 3 x 3 Minuten
2. in 100 % Ethanol für 3 x 3 Minuten
3. in 90 % Ethanol für 2 x 3 Minuten
4. in 80 % Ethanol für 2 x 3 Minuten
5. in 70 % Ethanol für 1 x 3 Minuten
6. in 50 %igem Ethanol für 1 x 3 Minuten
7. Spülen mit Aquadest für 2 x 3 Minuten

2.7.1 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE)

Präparate der Knorpel-Knochen-Proben und der Proben der Synovialmembran wurden zur Standardübersicht mit HE (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hämatoxylin färbt negativ geladene Strukturen, wie zum Beispiel die Desoxyribonukleinsäure (DNA) des Kernchromatins oder die Ribonukleinsäure (RNA) des rauen endoplasmatischen Retikulums, blau. Eosin färbt positiv geladene, azidophile Strukturen, wie zum Beispiel Eiweiße (Zytoplasma), rot.

Die Präparate wurden zur Färbung für 3 Minuten in saures Hämatoxylin nach Mayer eingetaucht (81), 10 Minuten unter fließendem kaltem Leitungswasser gespült, um dann für 30 Sekunden in 1 %iges Eosin alkoholisch getaucht zu werden. Die Präparate wurden kurz in 70 %igem Ethanol, 80 %igem Ethanol und 100 %igem Ethanol eingetaucht und mit einem alkohollöslichen Eindeckmittel (Eukitt) und Deckglas abgedeckt (Abb. 9).

2.7.2 Färbung mit Safranin-Orange

Bei Safranin-Orange (Safranin-O) (Merck, Darmstadt, Deutschland) handelt es sich um einen basischen Azofarbstoff, der das Schnittpräparat lichtmikroskopisch kontrastreich rot anfärbt (80). Er eignet sich daher gut für eine Übersichtsfärbung. Die Anfärbbarkeit der Glycosaminoglycane (GAG) im Knorpel ist proportional zu deren Vorkommen. Bei dieser Färbung ist der Azin-Farbstoff positiv geladen, wodurch der Knorpel intensiv rot angefärbt wird, während der Knochen sich nur blass rot darstellt. Eine semiquantitative Aussage über den GAG-Gehalt im Knorpel ist ermöglicht (82).

Die Präparate wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in destilliertes Wasser überführt (siehe 2.7). Nach einer 8-minütigen Einlagerung der Schnitte in die Färbelösung (Safranin-O) wurden diese in eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol (BüFa Chemikalien, Hude/ Altmoorhausen, Deutschland) gebracht und mit Eukitt eingedeckt.

2.7.3 Immunhistochemische Färbungen von Il-6, VEGF, Kollagen II

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Objektträger mit den Proben für 3 mal 10 Minuten in Xylol eingetaucht. Zur Entparaffinierung wurde die Alkoholreihe wie in Abschnitt 2.7 beschrieben durchgeführt und 5 Minuten mit Aqua dest gespült. Die Präparate wurden jeweils 10 Minuten mit Phosphate Buffered Saline (PBS) und mit Tris Buffered Saline (TBS) behandelt.

Die enzymatische Demaskierung erfolgte mit Protease-Induced Epitope Retrieval (PIER) (Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA). Bei 37°C wurden die Präparate auf den Objektträgern mit Proteinase K (Dako, Glostrup, Dänemark) für 10 Minuten angedaut. Sie wurden 3 mal 10 Minuten mit TBS gewaschen und mit „Protein Block serum-free“ (Dako, Glostrup, Dänemark) 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.

Die immunozytochemischen Färbungen der demaskierten Proben wurden mit Kaninchen polyklonalen primären Antikörpern gegen Il-6 (1:1000, ab6672, Abcam, Cambridge, UK), VEGF (1:500, ab46154, Abcam, Cambridge, UK) und Kollagen II (1:1000, ab54236 prediluted, Abcam, Cambridge, UK) in Antikörperverdünnung (S3022, Dako, Glostrup, Dänemark) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Proben wurden dann 3 mal mit TBS für 7 Minuten gewaschen. Der Inkubationsschritt mit dem Sekundärantikörper und der alkalische Phosphatase Nachweis wurden nach der Herstelleranleitung mit Dako LSAB + System-AP Kit (Dako, Glostrup, Denmark) durch-

geführt. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben mit Aquatex (Boehringer, Mannheim, Deutschland) fixiert. Negativkontrollen der Proben wurden unter Auslassung der primären Antikörper inkubiert. Als Positivkontrollen wurden Proben des Schweineohrs (II-6), Schweinegehirn (II-6, VEGF) und Schweineknorpel (Kollagen II) verwendet. Diese Proben wurden unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet (Abb. 10 - 12).

2.8 Auswertung der Histologie

2.8.1 Auswertungskriterien der kalzifizierten Histologie (Hartschliffe)

Die aufbereiteten Proben des subchondralen Knochens wurden mit HE, bzw. mit Toluidinblau gefärbt. Die Auswertung erfolgte nach den in Tabelle 3 dargestellten Kriterien.

Tabelle 3: Morphologische Beurteilung des subchondralen Knochens und Gelenkknorpels

	0	1	2	3	4
I. Oberfläche	diskontinuierlich, uneinheitlich	glatt, durchgängig			
II. Matrix	Fasergewebe (Fibrous tissue)	Faserknorpel		Mischung aus Hyalin und Faserknorpel	Hyalin
III. Zellverteilung	Einzelzellen bzw. desorganisiert	Anhäufungen (Cluster)	Mischung aus Säulen und Anhäufungen (Cluster)	säulenartig	
V. Subchondraler Knochen	abgelöst oder frakturierter Kallus an der Basis	aktivierter Umbau	Normal		
VI. Mineralisation	abnorm oder ungünstige Lokalisation	Normal			

Die einzelnen Punkte dürfen nicht zusammengerechnet werden, sondern müssen einzeln betrachtet werden. Methodische Beschreibung wie folgt: z.B. I/1, II/3, III/3, etc. (83).

2.8.2 Beurteilung der Mikroradiographie

Knochen bzw. Knorpelstrukturen schwächen die Röntgenstrahlung bei Durchdringung je nach Mineralisation stärker oder weniger stark ab. Demineralisierte Bereiche stellen sich auf dem Negativ dunkler dar als mineralisiertere Bereiche. So kann neugebildetes Knochengewebe, welches weniger mineralisiert ist und somit dunkler auf dem Röntgenbild dargestellt wurde, von älterem, heller dargestelltem Knochengewebe unterschieden werden. An heilenden Defektstellen befindet sich jüngerer, weniger stark mineralisiertes, und somit auf den Röntgenbildern dunkler abgebildetes Gewebe. Auf eine Heilung des Knochengewebes kann somit rückgeschlossen werden.

2.8.3 Kriterien der Auswertung der entkalkifizierten Histologie

Die Bewertung der Gelenkknorpelbeschaffenheit in HE erfolgte analog der Kriterien der Hartschliffe (Tab. 3).

Die Veränderungen der Synovialmembran wurde mit Hilfe des modifizierten Goldberg Scores unter HE-Färbung bewertet (76). Der Goldberg Score wurde ursprünglich verwendet, um bei Kaninchen den Schweregrad des Gelenkbefalls bei immunologischer Arthritis zu beschreiben (84). Goldberg betrachtete das Kniegelenk nach klinischen und mikroskopischen Gesichtspunkten.

Der Goldberg Score wird in vier Stufen unterteilt (klinisch):

1. Grad 0 beschreibt keine oder eine milde Reaktion auf eine intraartikuläre Immunglobulin G (IgG) Injektion.
2. Grad + beschreibt ein warmes Gelenk, synoviale Hyperplasie, Flüssigkeit im Gelenk, kein Hinken und volle Gelenkbeweglichkeit.
3. Grad ++ zeigt sich ein warmes Gelenk, markante synoviale Hyperplasie, Flüssigkeit im Gelenk, Hinken und einen begrenzten Bewegungsbereich.
4. Grad +++ zeigt zusätzlich zu Grad ++ eine Gelenkdesorganisation und eine Patelladislokation.

Einteilung der Histopathologie der Synovialmembran nach Goldberg (mikroskopisch):

1. Grad 0 zeigt keine Synovitis
2. Grad + zeigt eine Synovitis, Infiltration der Synovia mit moderater Anzahl an Lymphozyten, Plasmazellen und Deckzellhyperplasie.

3. Grad ++ zeigt ernste exsudative und proliferative Synovitis mit Pannus und präsent erosiven Veränderungen und Infiltration des gesamten Synoviums mit mononuklearen Zellen.
4. Grad +++ zeigt alle vorgenannten Erscheinungen mit zusätzlicher Gelenkdestruktion.

Für das hier zugrundeliegende Experiment im Schwein wurde eine Modifikation des oben genannten Goldberg Scores, der sogenannte modified Goldberg Score verwendet, welcher bereits an Beagles getestet worden war (76).

Ebenso wie der ursprüngliche Goldberg Score ist auch der modifizierte Goldberg Score in vier Abstufungen untergliedert:

- 1 Punkt: Das Gewebe zeigt eine geringfügige Proliferation der oberflächlichen synovialen Zellen.
- 2 Punkte: Es zeigt sich eine mehrschichtig gestaltete Synovialmembran und eine leichte Infiltration von Zellen um die Gefäße.
- 3 Punkte: Das synoviale Gewebe zeigt eine ersichtliche Synovitis mit villöser Hyperplasie der Synovialmembran, Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und Formationen lymphknotenähnlicher Strukturen.
- 4 Punkte: Das Gewebe zeigt hier eine schwere seröse und hyperplastische Synovitis mit markanter villöser Hyperplasie und Erosion der Synovialmembran und Formationen lymphknotenähnlicher Strukturen.

2.8.4 Safranin-Orange Färbung

Die Anfärbarkeit der Glycosaminoglycane (GAG) im Knorpel ist proportional zu deren Vorhandensein. Eine Aussage über den GAG-Gehalt im Knorpel ist dadurch möglich (82).

2.8.5 Immunhistochemie

Die Anfärbarkeit von VEGF, Il-6 und Kollagen II ist proportional zu deren Vorhandensein. Eine Aussage über den entsprechenden Gehalt im Gewebe ist dadurch möglich.

2.9 Proteinanalyse mit Luminex

Mit der Luminex-Technologie können mehrere Proteine gleichzeitig in einer geringen Probenmenge untersucht werden. Die Technik des Luminex-Gerätes beruht auf dem Prinzip der Fluorometrie. Hierbei können bestimmte Moleküle mithilfe von Lichtenergie in einen angeregten Zustand übergehen. Beim Rückfall in den Ausgangszustand kommt es zur Emission langwelliger, energieärmerer Lichtstrahlung, die sogenannte Fluoreszenz. Das Verhalten während der Anregungs- und der Emissionsphase ist charakteristisch für bestimmte Substanzen. Vor der Untersuchung mit dem Luminex-Gerät ist es notwendig, eine Eichung durchzuführen, da die Emission abhängig von der Anregungsenergie der Lichtquelle ist, und es sonst zu verfälschten Daten kommen könnte. Im Luminex-Gerät werden Laser zur Anregung der Moleküle verwendet und entsprechende Sensoren messen die Anregungsintensität der Lichterzeugungen. Mit Hilfe dieses Gerätes kann man kleinste Probenmengen mit bis zu 100 Analysaten gleichzeitig testen. Durch die Automatisierung der Untersuchung sollte eine bessere Vergleichbarkeit als bei manueller Untersuchung erreicht werden (85, 86).

Ein Teil der in Eppendorfröhrchen eingefrorenen Proben der Synovialmembran und des Gelenkknorpels ohne subchondralen Knochen wurde mit Hilfe eines Achatmörser unter Verwendung von Flüssigstickstoff bei -196°C zerkleinert. Die Il-1-, Il-6-, TNF-alpha- und VEGF-Konzentrationen in den erhaltenen Homogenaten wurden mit dem Luminex-Gerät unter Verwendung eines Luminexassays entsprechend der Standardprotokolle von LiquiChip200 (Qiagen, Valencia, USA) analysiert. Zum Nachweis von Il-1, Il-6, TNF-alpha und VEGF wurde das Milliplex human cytokine multiplex immunoassaykit (MPXHCYTO-60K-01, Millipore, Billerica, USA) verwendet. Eine Gesamtproteinbestimmung wurde zur Standardisierung durchgeführt.

2.10 Genexpressionsanalysen

2.10.1 Vorbereitung der Proben zur Genexpressionsanalyse

RNA aus dem Gewebe wurde unter Verwendung von Trizol Reagent (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Dazu wurde die Gewebeprobe zunächst in einem Achatmörser unter Flüssigstickstoff zerkleinert. 100 mg von jeder Probe wurden in ein Matrix2D Röhrchen (Vitaris, Baar, Belgien) mit 1 ml Trizol Reagent (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 5 μl Polyacrylcarrier (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) überführt und in einem Precellys

Homogenisator (Precellys/ Bertin Corp., Villeurbanne, France) 2 x 30 Sekunden bei 5000 rpm homogenisiert. In einem Zentrifugationsschritt wurden große Zellfragmente von den oberflächlichen Bestandteilen abgetrennt und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Durch alkoholische Fällung wurde die Ribonukleinsäure (RNA) gefällt und anschließend gereinigt. Die RNA wurde in RNAase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption der Probe bei 260 nm in einem Photometer gemessen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml (87). Um Proteinkontaminationen bzw. Verunreinigungen beurteilen zu können, wurde auch das Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm ermittelt. Das Verhältnis A260/ A280 sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen, da dies für eine geringe Proteinkonzentration spricht und erhöhter Proteingehalt die optimale Transkription der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in komplementär Desoxyribonukleinsäure (cDNA) behindert.

2.10.2 Reverse Transkription der RNA

Die isolierte RNA wurde mit dem High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde bis zu 9 µl (1000 ng) RNA mit 10 µl 2x RT Buffer Mix (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) und 1 µl 20x RT Enzyme Mix (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 95°C inaktiviert und die Probe mit RNAase-freiem Wasser auf eine cDNA-Konzentration von 10 ng/µl aufgefüllt.

Primer für Genexpressionsanalysen:

- Il-6 (fo: gccctcgagcccaccaggaa, rev: ccccagggagaaggcgactg)
- VEGF (fo: gagcttctacagcacaac, rev: caaatgctttctccgctc)
- 18S rRNA (fo: gtaaccggtgaacccatt, rev: ccatccaatcggttagcg)

2.10.3 Real Time-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)

Die rt-PCR Analyse wurde in einem I-Cycler (BioRad, München, Deutschland) und Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) entsprechend den Herstellerinstruktionen durchgeführt. Dabei wurden 2 µl

cDNA mit 12,5 µl SYBR-Green 2x Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 1 µl genspezifischer Primer (88) und 9,5 µl Nuclease-freiem Wasser inkubiert. Die rt-PCR wurde mit der Hot Start Taq DNA-Polymerase (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt, die durch Erhitzen aktiviert wurde. Die Temperatur wird für 10 min auf 95°C hochgefahren. Im Anschluss erfolgten 40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95° für 30 sec, einer Annealing-Phase bei 58°C für 30 sec, einer Verlängerung bei 72°C für weitere 30 sec und einer Fluoreszenzmessung bei 72°C. Von jeder PCR wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, anhand derer die Spezifität der entstandenen PCR Produkte überprüft werden konnte. Die Signale der einzelnen Gene wurden gegen die Signale der 18S-rRNA normalisiert und nach der delta CT Methode relativ quantifiziert.

2.11 Statische Analyse

Die Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Informatik und Statistik des UKSH Campus Kiel.

Die Gaussche Normalverteilung der gruppierten Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test mit Dallal-Wilkinson Lillefor P-value getestet. Statistische Unterschiede der Mittelwerte wurden mit Hilfe eines Wilcoxon-signed-rank Test bestimmt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant bewertet.

Alle Daten wurden repräsentativ als Mittelwert \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des Modells für die immunologisch induzierte Arthritis

Die Induktion von Arthritis durch BSA-Injektion wurde in Proben der Synovialmembran histologisch dokumentiert. Alle Synovialmembranproben in der BSA-Gruppe zeigten starke histologische Zeichen der Arthritis, nämlich klare Hypertrophie der Synovialmembran und Leukozyteninfiltrationen. Die Gruppen der Kontrolltiere und Arthritis-Tiere (Vehicle) zeigten signifikante Unterschiede (Abb. 8). Ebenso wurden hinreichend bestätigende Ergebnisse in den weiteren durchgeführten Untersuchungen beobachtet (Tab. 4).

3.1.1 Ergebnisse der kalzifizierten Histologie (Hartschliffe)

In der Toluidinblaufärbung der Hartschliffe, sowie in der Mikroradiographie konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der mit BSA induzierten Gruppe bei der Untersuchung des Knorpel- und Knochengewebes festgestellt werden. Daher erfolgte keine weitere Auswertung. Da keine Unterschiede zu sehen sind, wird ein Bild exemplarisch dargestellt (Abb. 6).

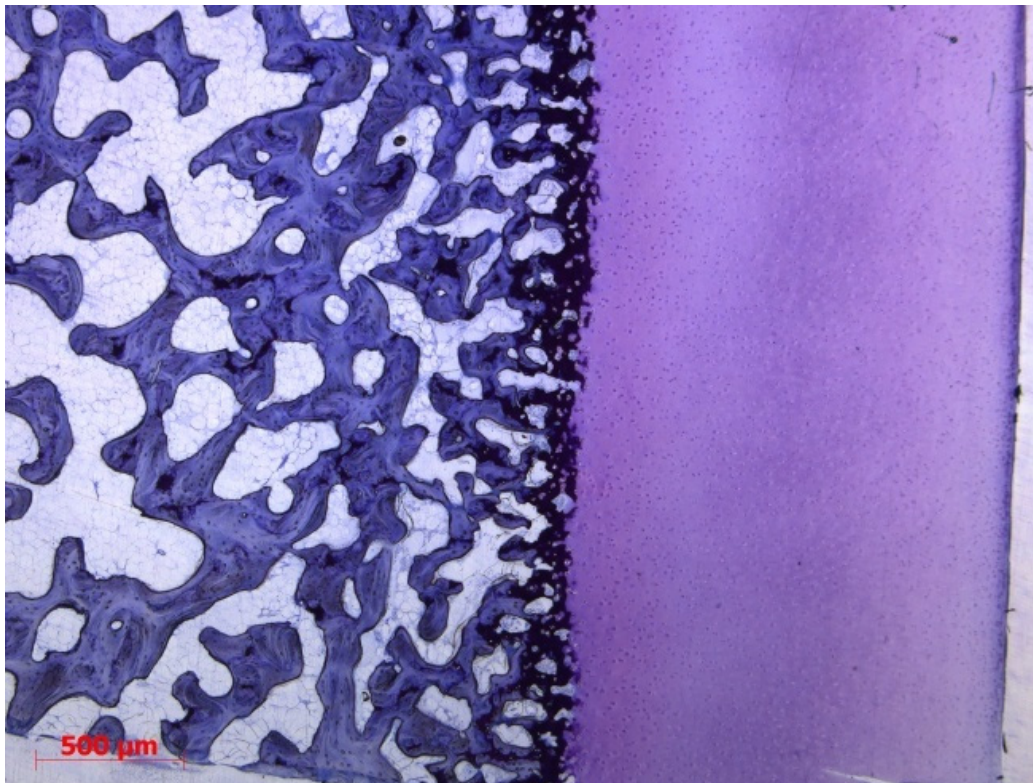


Abbildung 6: Beispiel Hartschliffpräparat, Toluidinblau-Färbung

Tabelle 4: Ergebnistabelle

	Methode	Kontrollgruppe	Autoimmunarthritis (AIA)	Platelet-rich Plasma (PRP)	
Kalzifil- Zieler- Histolo- gie	Toluidinblaufärbung	keine Unterschiede	keine Unterschiede	keine Unterschiede	
	Mikroradiographie	keine Unterschiede	keine Unterschiede	keine Unterschiede	
Entkalkifizierende Histologie	HE-Färbung - Knorpel	keine Unterschiede	keine Unterschiede	keine Unterschiede	
	HE-Färbung - Synovialmembran (Goldberg Score)	0,71 ± 0,95	2,55 ± 0,88 (p < 0,05)	2,0 ± 0,8 (n. s.)	
	Safranin-O - Färbung		verminderte Anfärbbarkeit	verstärkte Anfärbbarkeit	
	Immunhisto- Chemische Färbungen	VEGF (Synovialmembran und Knorpel)		deutlich verstärkte Anfärbbarkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe	verminderte Anfärbbarkeit im Vergleich zur AIA-Gruppe
		Il-6 (Synovialmembran und Knorpel)		deutlich verstärkte Anfärbbarkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe	verminderte Anfärbbarkeit im Vergleich zur AIA-Gruppe
		Kollagen II		verminderte Anfärbbarkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe	verstärkte Anfärbbarkeit im Vergleich zur AIA-Gruppe
	Gen- expression	Il-6 (Synovialmembran)	1,00	3,82 ± 1,1 (p<0,05)	2,91 ± 1,1 (p<0,05)
	Proteinanalyse Synovial- membran (Luminox)	VEGF (Synovialmembran)	1,00	3,32 ± 2,0 (p<0,05)	3,41 ± 2,38 (n. s.)
		VEGF (pg/ml)	54,50 ± 11,52	74,68 ± 34,74 (p<0,05)	60,87 ± 11,94 (p<0,05)
		IGF-1 (pg/ml)	85,32 ± 199,30	407,6 ± 390,9 (p<0,05)	212,9 ± 241,5 (p<0,05)
Il-1 beta (pg/ml)		31,72 ± 9,89	47,49 ± 23,30 (p<0,05)	36,14 ± 15,26 (p<0,05)	
TNF-alpha (pg/ml)		35,83 ± 13,04	48,13 ± 16,45 (n. s.)	47,87 ± 17,27 (n. s.)	
Il-6 (pg/ml)		37,49 ± 7,57	69,80 ± 43,60 (p<0,05)	50,38 ± 15,53 (p<0,05)	
Proteinanalyse Knorpel (Luminox)	VEGF (ng/ml)	1,83 ± 1,81	3,421 ± 6,11 (p<0,05)	0,35 ± 0,23 (p<0,05)	
	IGF-1 (pg/ml)	0,30 ± 1,35	18,92 ± 29,26 (p<0,05)	1,17 ± 0,87 (p<0,05)	
	Il-1 beta (pg/ml)	4,50 ± 2,14	6,46 ± 6,04 (p<0,05)	2,23 ± 0,61 (p<0,05)	
	TNF-alpha (pg/ml)	6,45 ± 4,13	9,09 ± 8,53 (p<0,05)	3,13 ± 0,46 (p<0,05)	
	Il-6 (pg/ml)	8,014 ± 4,39	16,85 ± 17,44 (p<0,05)	4,16 ± 0,87 (p<0,05)	

3.1.2 Entkalkifizierte Histologie

Bei der Auswertung der Synovialmembran in HE mit Hilfe des modifizierten Goldbergscore konnten signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren mit AIA festgestellt werden. Alle Proben der AIA-Gruppe zeigten sechs Wochen nach lokaler BSA-Injektion eine deutliche synoviale Hypertrophie sowie Leukozyteninfiltrationen (Abb. 8, Tab. 4).

Nachdem klare Entzündungszeichen der Synovialmembran in der histologischen Untersuchung unter dem Mikroskop (Goldbergscore) nachweisbar waren, jedoch keine in der HE Färbung des Knorpels, wurde eine Safranin-O Färbung und immunhistochemische Färbung des Knorpels durchgeführt. In den Proben der Tiere mit AIA zeigten die Untersuchungen im Gegensatz zu denen der Tiere ohne AIA in der Safranin-O Färbung und in der immunhistochemischen Färbung für Kollagen II eine reduzierte Anfärbbarkeit in den oberflächennahen Schichten (Abb. 10). Eine reduzierte Anfärbbarkeit spricht für einen reduzierten Anteil an Proteoglycanen (Safranin-O Färbung) und einen reduzierten Anteil an Kollagen II (Immunhistochemische Färbung) (Abb. 10, Tab. 4). In der immunhistochemischen Färbung für Il-6 und VEGF in Synovialmembran und Knorpel kam es bei BSA-injizierten Kniegelenken der AIA-induzierten Schweine zu einem starken Anstieg der Il-6 und VEGF Anfärbbarkeit im Vergleich zu den Kontrollproben, die 6 Wochen nach der Induktion von Arthritis entnommen wurden (Abb. 10 - 12, Tab. 4).

3.1.3 Proteinanalysen mit Luminex

Die Luminexanalysen der Konzentrationen von Il-6, VEGF, IGF-1, Il-1 beta und TNF alpha-Protein in der Synovialmembran, die von einem BSA-injizierten Kontroll-Kniegelenk entnommen wurden, zeigten deutliche Anstiege der Proteinkonzentrationen in der Synovialmembran nach der Arthritisinduktion. Fast alle Proteine zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg der Proteinexpression, einzig TNF-alpha wurde als nicht signifikant bewertet (Abb. 13, Tab. 4).

Die Luminexanalysen des Knorpelgewebes vom BSA-injizierten Kniegelenk und vom Kontrollgelenk ergaben signifikante Konzentrationsanstiege der getesteten Proteine (Il-6, VEGF, IGF-1, Il-1, TNF-alpha) in den BSA-injizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 14, Tab. 4).

3.1.4 Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalyse der synovialen Proben zeigte eine gesteigerte Expression von Il-6 und VEGF nach Induktion der Arthritis. VEGF und Il-6 stiegen signifikant an (Abb. 15, Tab. 4).

Aus den Knorpelproben konnte keine RNA isoliert werden, daher liegen auch keine Ergebnisse der Genexpressionsanalysen des Knorpels vor.

3.2 Der Effekt von PRP auf die immunologisch induzierte Arthritis

Nach Bestätigung der Arthritisinduktion im Großtiermodell wurde der Effekt von PRP-Injektion auf arthritische Veränderungen im Knie untersucht. Hierbei wurden dieselben Messungen wie beim Modell der AIA zur Beurteilung des PRP-Effektes auf arthritische Veränderungen durchgeführt.

3.2.1 Kalzifizierte Histologie (Hartschliffe)

In der Toluidinblaufärbung der Hartschliffe (Abb. 6), sowie in der Mikroradiographie (Abb. 7) konnten keine Unterschiede zwischen der mit AIA induzierten Gruppe und der mit PRP behandelten Gruppe festgestellt werden. Daher erfolgte keine weitere Auswertung.

3.2.2 Entkalzifizierte Histologie

Die histologische Analyse der HE-Färbung von Synovialmembran und Knorpel zeigte in den Synovialmembranproben nach PRP-Injektion eine auffallend abgeschwächte synoviale Hypertrophie und reduzierte leukozytäre Infiltrationen im Vergleich zu den Proben nach der Induktion von Arthritis. Der modifizierte Goldbergscore war hier ebenfalls geringer als bei den Proben nach der Induktion von Arthritis (Abb. 8 - 9, Tab. 4).

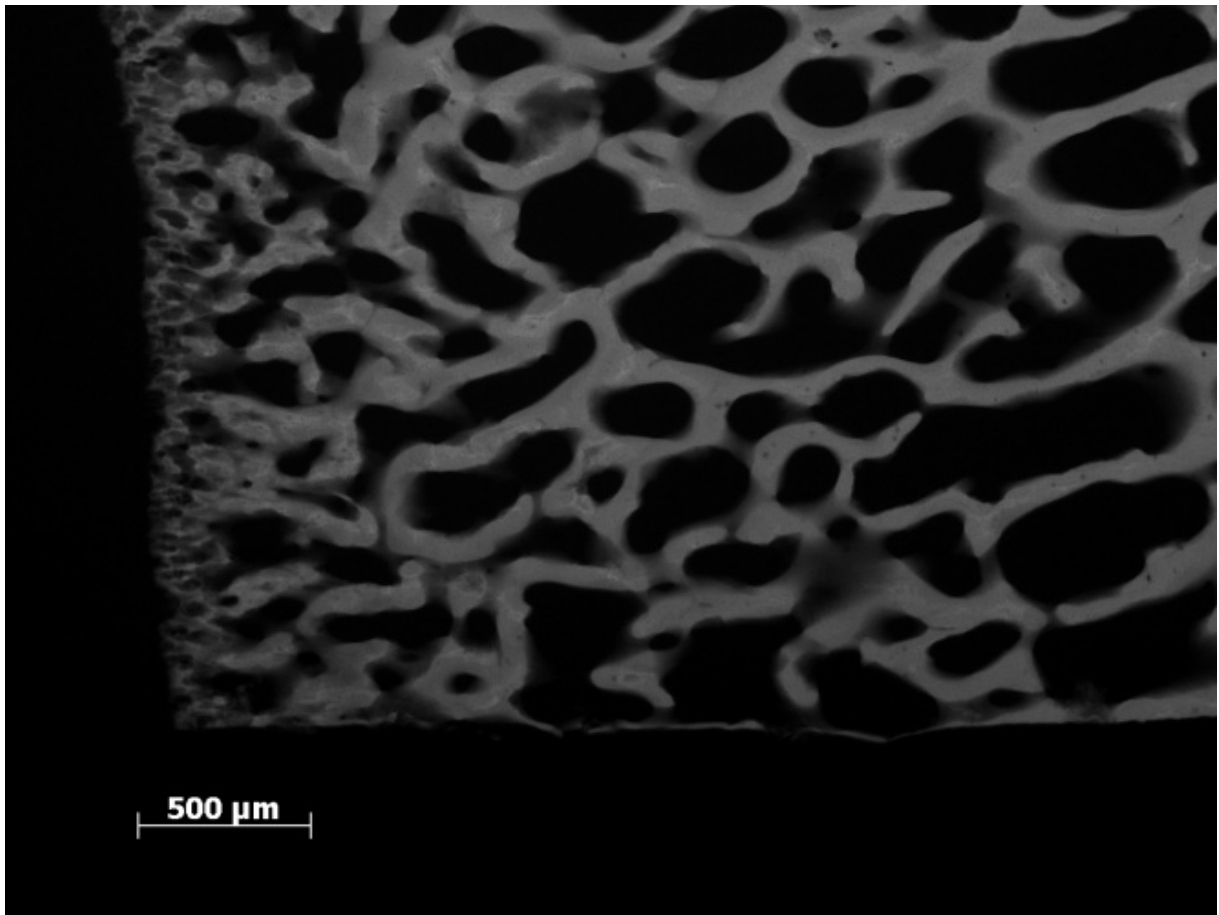


Abbildung 7: Beispiel Mikroradiographie

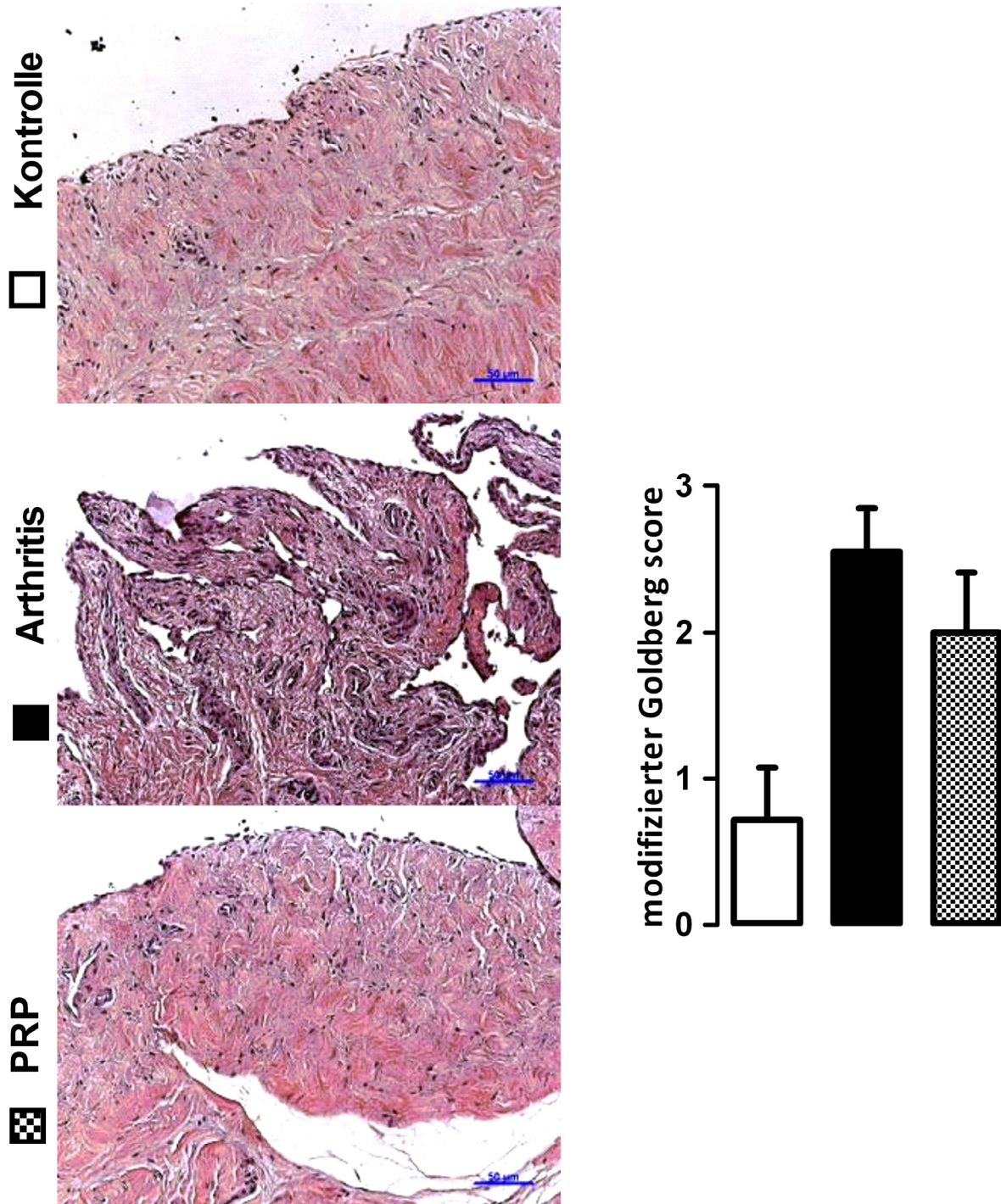


Abbildung 8: Veränderung Synovialmembran, Arthritis vs. PRP, HE

Morphologische Veränderungen der Synovialmembran mit antigeninduzierter Arthritis und der Effekt von Platelet-rich Plasma. Links Hämatoxylin-Eosin Färbung repräsentativer Präparate. Zu erkennen sind Hypertrophien und Leukozyteninfiltrate nach Arthritisinduktion mit bovinem Serumalbumin und Rückgang dieser Veränderungen nach der Behandlung mit PRP. Rechts zugehörige Ergebnisgrafik. Ergebnisse siehe auch Tabelle 4.

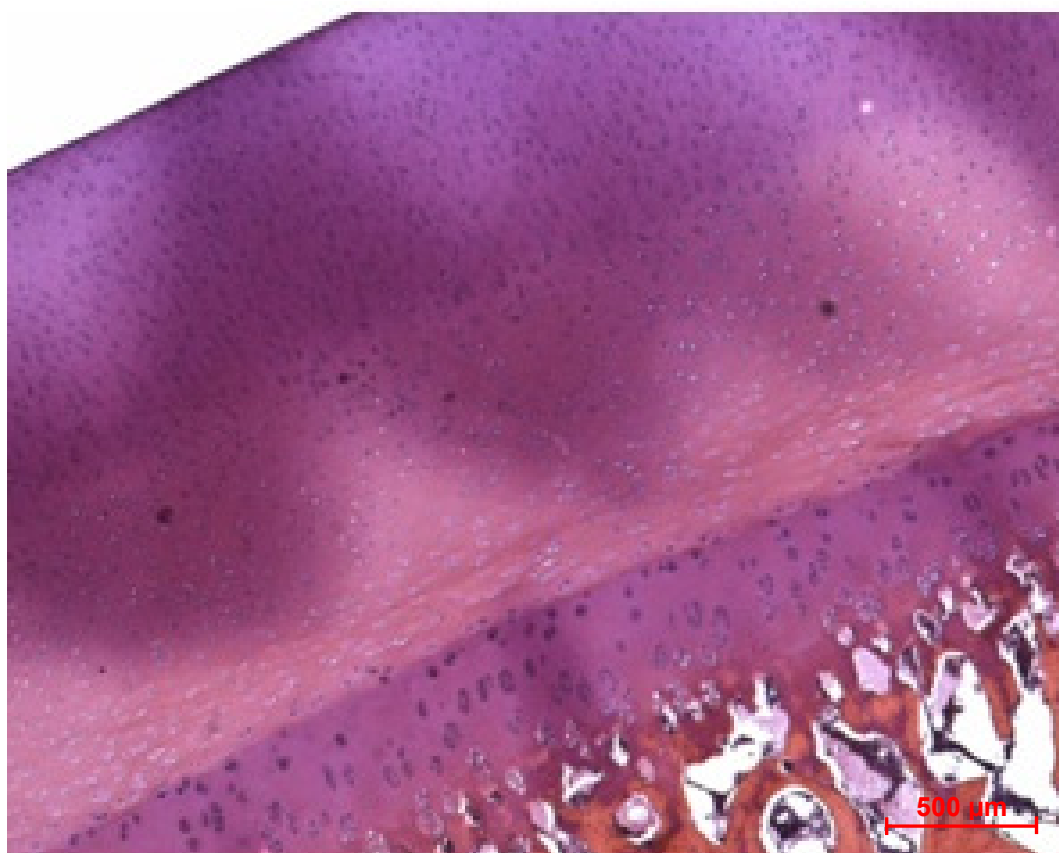
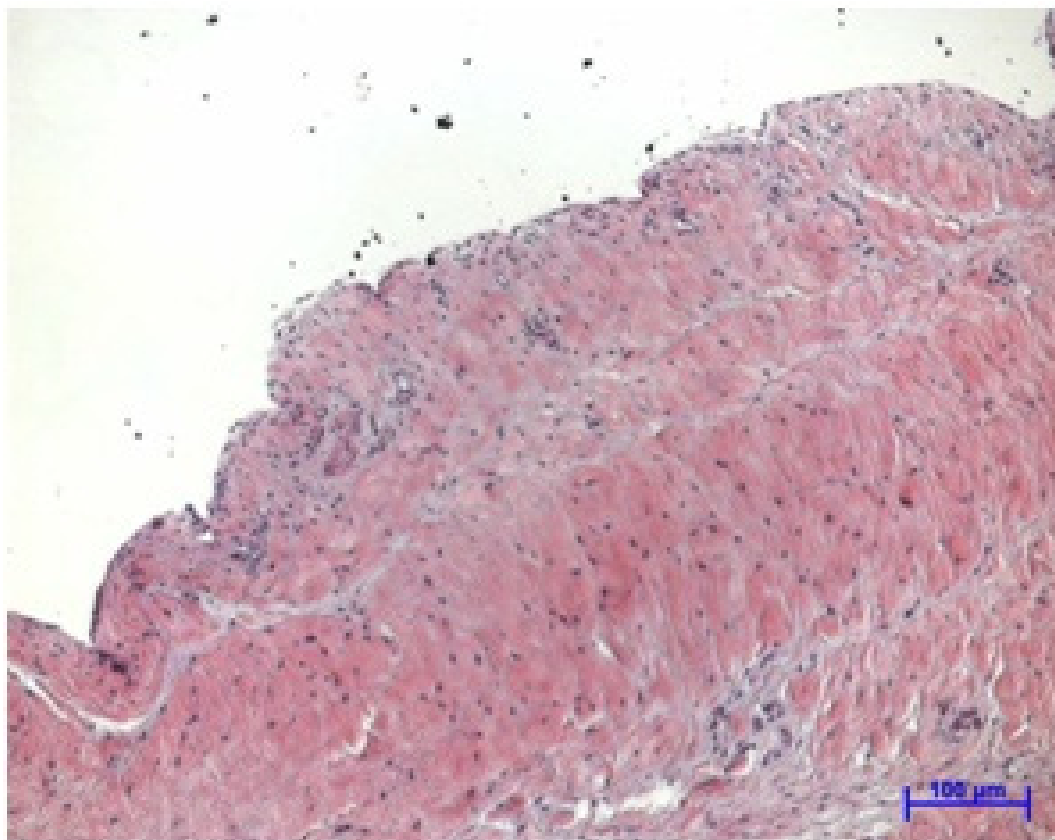


Abbildung 9: Beispiel für Synovialmembranprobe (oben) und Knorpel-Knochen-Probe (unten), Hämatoxylin-Eosin (HE)

In Übereinstimmung mit dem Befund im Synovialgewebe zeigten Knorpelpräparate eine verstärkte Anfärbbarkeit mit Safranin-O und Kollagen II, wenn PRP nach der Induktion von AIA injiziert wurde (Abb. 10, Tab. 4).

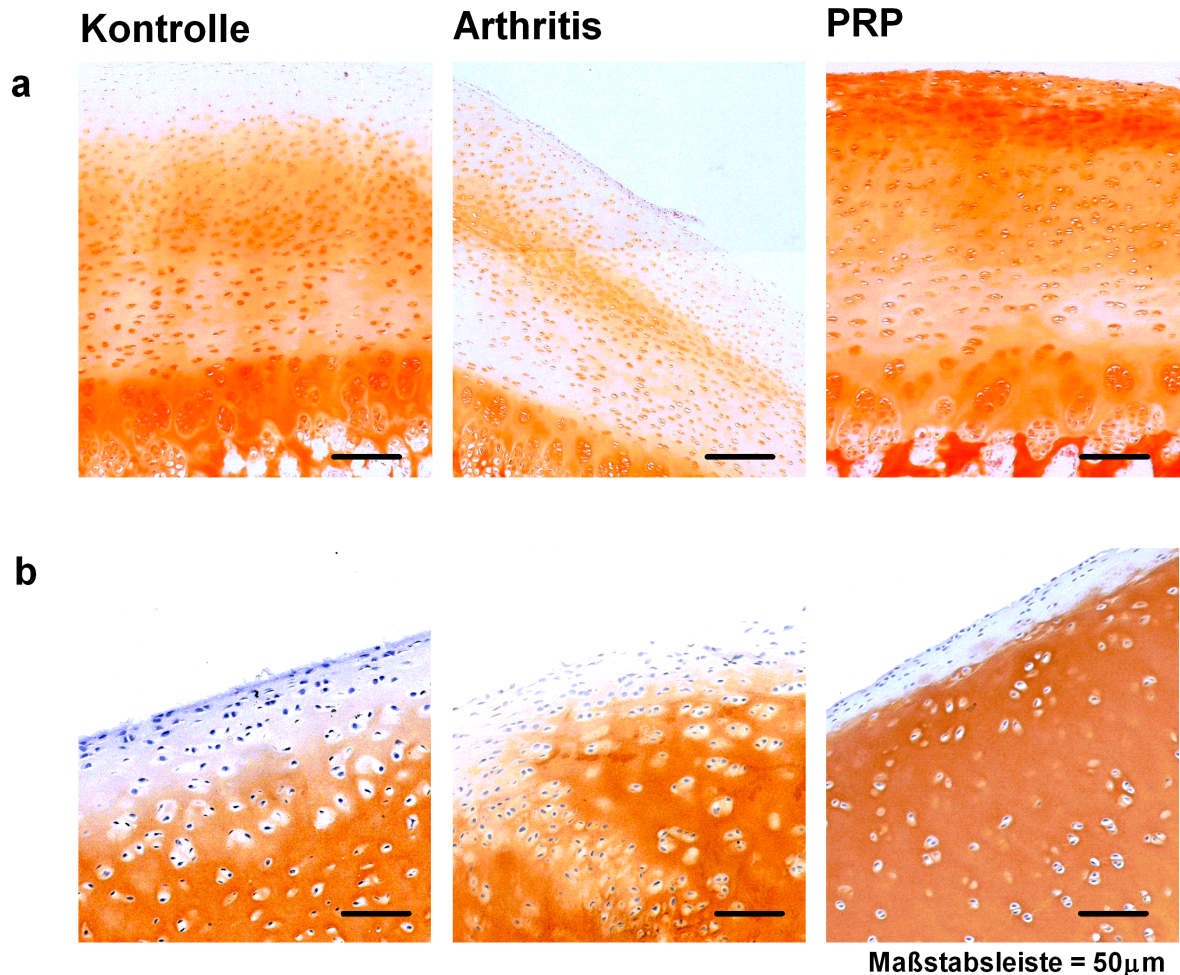


Abbildung 10: Veränderung Knorpel, Arthritis vs. PRP, Safranin-O, Kollagen Typ II

Knorpelspezifische Färbung. a, In der Safranin-O Färbung des Knorpels ist eine Abnahme des Proteoglycangehalts in den Proben der Tiere mit antigeninduzierter Arthritis und Erholung des Verlustes knorpelspezifischer Proteine nach der Behandlung mit PRP zu sehen. b, In der Kollagen Typ II Färbung ist ein Abfall der Färbeintensität nach Arthritisinduktion und ein Anstieg nach erfolgter Behandlung mit PRP zu sehen.

In den Untersuchungen zum Effekt von PRP auf die Entzündungsmarker Il-6 und VEGF waren, wie in der immunhistochemischen Analyse, erhöhte Konzentrationen in der Synovialmembran und im Knorpel der Schweine mit AIA nachweisbar. Nach der Injektion von PRP war die Färbung für Il-6 und VEGF sowohl im synovialen Gewebe als auch im Knorpel deutlich reduziert (Abb. 11 - 12, Tab. 4).

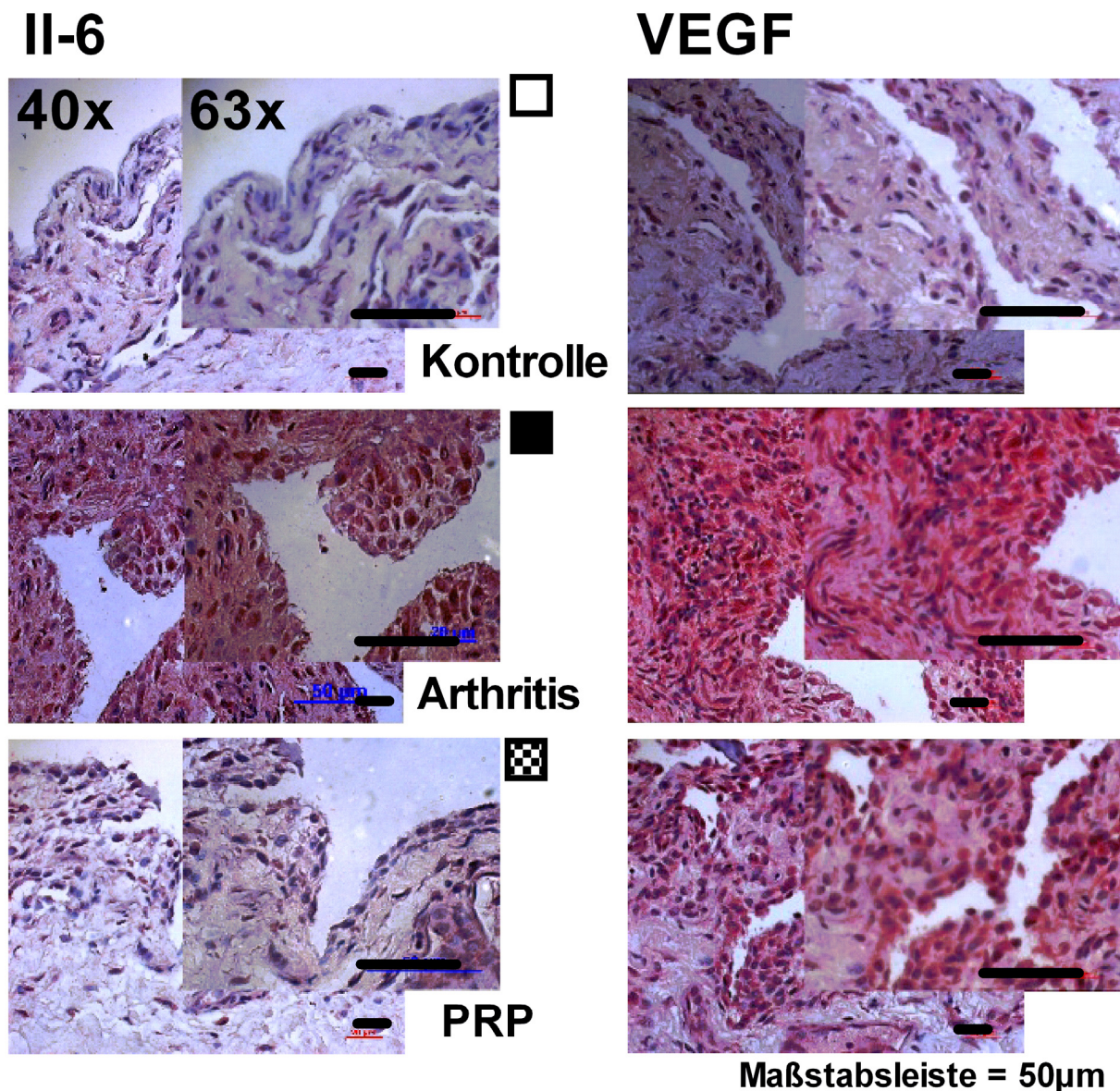


Abbildung 11: Veränderung Synovialmembran Arthritis vs. PRP, Immunhistochemie
Immunhistologische Analyse demonstriert anhand der Il-6 und der VEGF Färbungen der Synovialmembran bei AIA. PRP-Injektion intraartikulär reduziert die Intensität der Färbung von Il-6 und VEGF nach Arthritisinduktion.

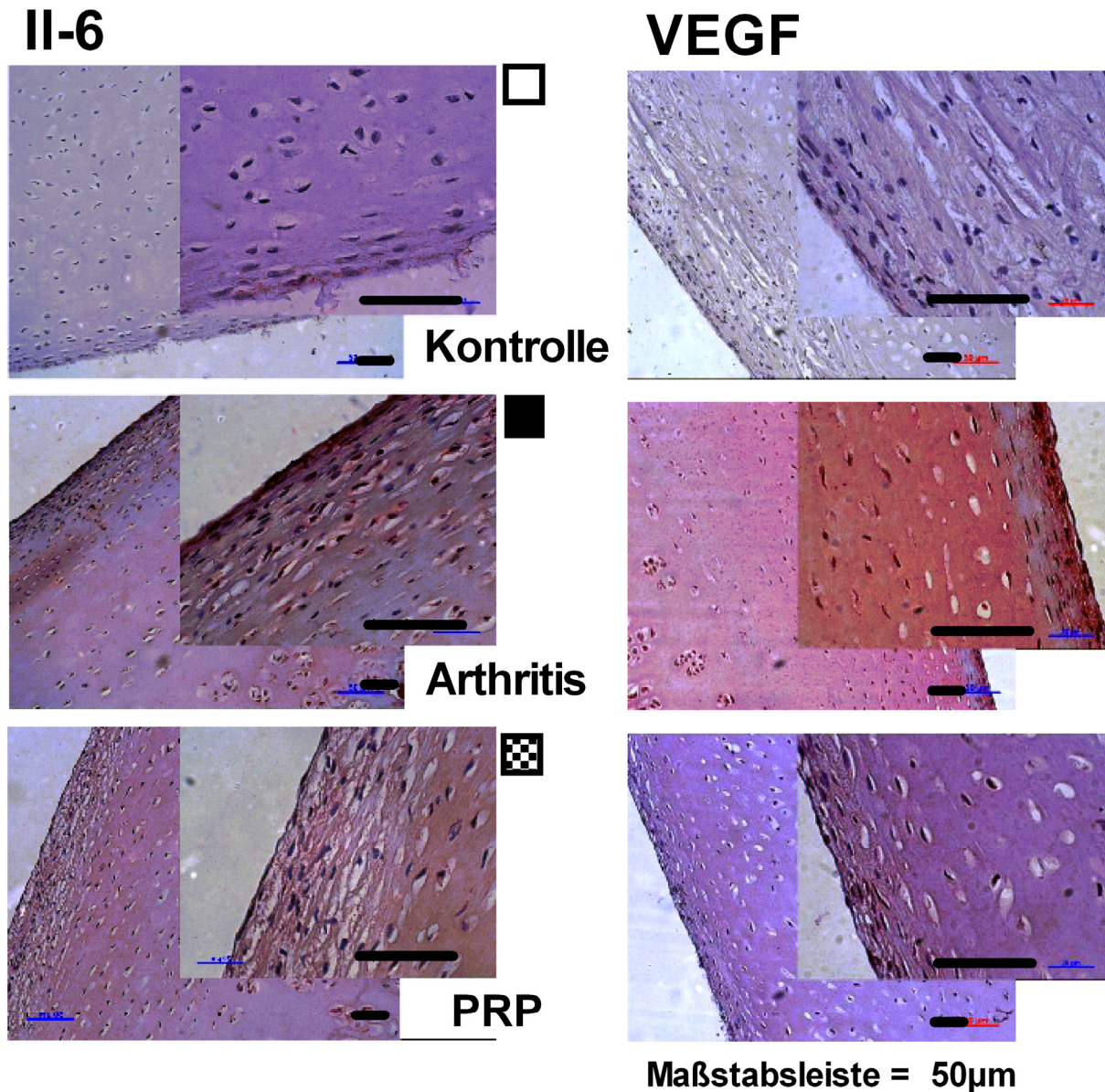


Abbildung 12: Veränderung im Knorpel, Immunhistochemie

Die Immunhistologische Analyse demonstriert eine verstärkte Anfärbbarkeit für Il-6 und VEGF im Knorpelgewebe der Proben aus den Knien der Tiere mit AIA. Es zeigt sich eine reduzierte Anfärbbarkeit nach Applikation von PRP. Arthritis vs. PRP; Immunhistochemie.

3.2.3 Proteinanalysen mit Luminex

Die Untersuchungen der Proteinkonzentrationen durch den Luminex-Assay bestätigten die oben aufgeführten Ergebnisse. Es konnte hier ein beinahe universaler Effekt von intraartikulärer PRP-Injektion auf die Gewebekonzentrationen der getesteten Entzündungsmarker beobachtet werden (Abb. 13, Tab. 4). In den synovialen Gewebeproben von Schweinen mit AIA wurden die Konzentrationen von Il-6, VEGF, IGF-1, Il-1 auf das Kontrollniveau reduziert und unterschieden sich signifikant von

den induzierten Konzentrationen, die nach der BSA-Injektion gemessen wurden. Lediglich die TNF-alpha Konzentration wurde durch PRP-Injektion nicht reduziert (Tab. 4).

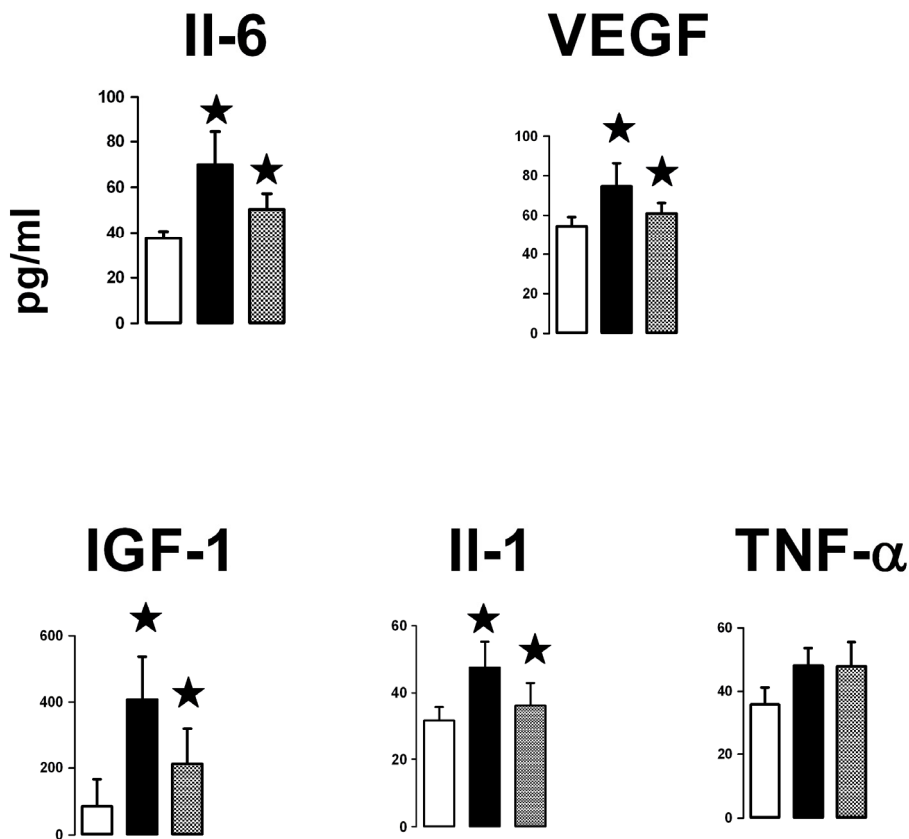


Abbildung 13: Veränderung Synovialmembran Arthritis vs. PRP, Luminexassay

Proteinanalysen durch Luminexassay zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen von II-6 und VEGF nach Arthritisinduktion (schwarz) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Nach PRP-Injektion (grau) kam es zu einer Reduzierung jener Konzentrationen. Keine Veränderungen nach PRP-Injektion im Vergleich zu den arthritisisinduzierten Proben zeigte sich bei TNF-alpha, jedoch stieg die TNF-alpha-Proteinkonzentration nach Arthritisinduktion an. Die Veränderungen der Proteinkonzentrationen für IGF-1 und II-1 beta verhielten sich entsprechend der Konzentrationen von II-6 und VEGF. Ergebnisse siehe auch Tabelle 4.

Ähnliche Ergebnisse wurden dokumentiert, als der Knorpel auf den Gehalt der oben genannten Entzündungsmarker untersucht wurde (Abb. 14). PRP Injektion reduzierte die Proteinkonzentrationen im Knorpel im Vergleich zu den AIA- Einzelproben, die nicht mit PRP behandelt wurden, signifikant auf das Kontrollniveau zurück (Tab. 4).

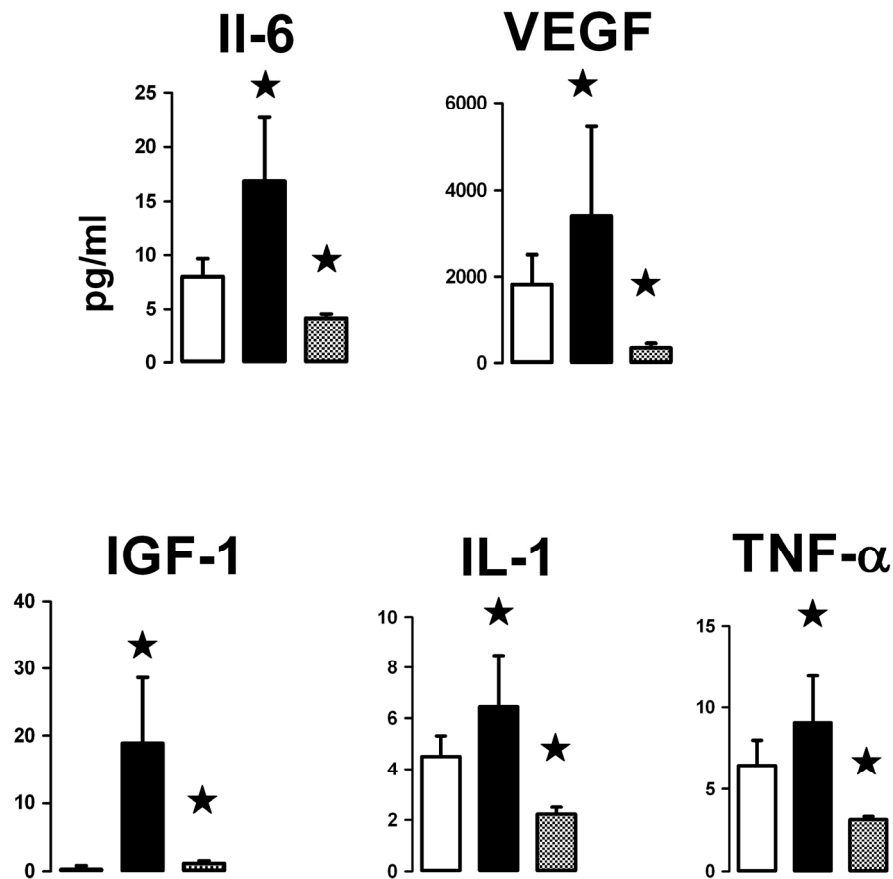


Abbildung 14: Veränderung Knorpel Arthritis vs. PRP, Luminexassay

Proteinanalysen durch Luminexassay zeigen signifikant erhöhte Konzentrationen von Il-6, VEGF, IGF-1, Il-1 beta und TNF-alpha nach der Induktion von Arthritis (schwarz) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die Behandlung mit PRP (grau) reduzierte signifikant die erhöhten Proteinkonzentrationen. Ergebnisse siehe auch Tabelle 4.

3.2.4 Genexpression

Die Il-6-Expressionslevel waren ebenfalls, wie in den immunhistochemischen Untersuchungen, nach der PRP-Injektion (grau) im Vergleich zur AIA (schwarz) signifikant reduziert, während die VEGF-Expression nicht signifikant verändert war. Weiß: Kontrollgruppe (Abb. 15, Tab. 4).

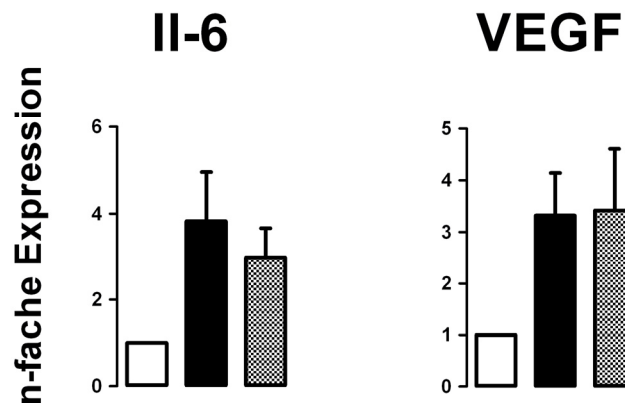


Abbildung 15: Veränderung Synovialmembran Arthritis vs. PRP, Genexpressionsanalyse

Genexpressionsanalysen demonstrierten, dass bei AIA (schwarz) erhöhte Konzentrationen von Il-6 und VEGF gegenüber der Kontrollgruppe (weiß) vorkommen. Il-6 –Konzentrationen wurden signifikant nach der Behandlung mit PRP (grau) reduziert, jedoch war die VEGF-Expression nicht signifikant reduziert. Ergebnisse siehe auch Tabelle 4.

4. Diskussion

4.1 Einführung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Großtiermodell der AIA auf Grundlage vorher bestehender Untersuchungen an Beagles von Ohashi (1996) (76) entwickelt. Die Arbeit unterteilt sich in zwei prospektive Untersuchungen, die Erstellung eines Modells zur immunologisch induzierten Kniegelenksarthritis und in das Modell zur Behandlung der induzierten immunologischen Arthritis mit PRP. Die vor Beginn der Arbeit aufgestellten Hypothesen, die Möglichkeit, immunologische Arthritis im Kniegelenk induzieren zu können und die darauf hervorgerufene Entzündung mit PRP zu mindern, sollten überprüft werden.

4.2 Modell der AIA

Die Untersuchung zur AIA am Großtiermodell wurde in zwei Abschnitten durchgeführt. Zuerst wurden die Tiere durch intravenöse Injektion mit BSA immunisiert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde diesen Tieren BSA intraartikulär injiziert, um eine lokale Immunreaktion auszulösen. Hierbei konnten frühe Veränderungen der Arthritis bis zu einem hinreichenden Grad imitiert werden.

Dieses Modell wurde erstmals in dieser Form am Großtier untersucht. Da das Kniegelenk des Schweines als Modelltier in den biomechanischen Eigenschaften dem Menschen ähnlicher ist als das von Nagern und Hunden, ist eine bessere Übertragung auf die Humanmedizin gegeben (89). Dieses Modell kann in Zukunft als Grundlage zur kontrollierten Erforschung weiterer, besserer Behandlungsmethoden der AIA des Menschen beitragen.

Die in diesen Untersuchungen festgestellten Veränderungen repräsentieren frühe Reaktionen immunologischer Arthritis. Veränderungen der Synovialmembran sind mikroskopisch und molekularbiologisch nachweisbar. Histologisch sichtbare Knorpel-läsionen konnten nicht dargestellt werden und könnten möglicherweise erst in einem späteren Krankheitsstadium gefunden werden. Molekularbiologische Veränderungen im Knorpelgewebe konnten jedoch trotz der fehlenden histologischen Veränderungen gezeigt werden. Schon früher wurden gleichartige Charakteristiken der verschiede-

nen Modelle für Arthritis umfangreich von Wooley (90) beschrieben, die denen der hier vorliegenden Studie entsprechen.

Die Ergebnisse der Histologie, der Safranin-O und immunhistochemischen Färbungen, der Proteinanalysen, sowie der Genexpressionsanalysen zeigten deutlich, dass durch dieses Versuchsmodell eine AIA induziert werden kann. Die Hypothese, dass durch BSA eine AIA induziert werden kann, wurde somit bestätigt.

4.3 Effekte der Therapie der AIA mit PRP

Das Modell der immunologischen frühen Arthritis bildete die Grundlage für den zweiten Teil dieser Studie, die Untersuchung der Anwendung von autologem PRP bei AIA.

PRP ist ein Konzentrat von Thrombozyten, das aus autologem Vollblut durch Zentrifugation gewonnen wird. Thrombozyten enthalten Zytokine, Wachstumsfaktoren und Defensine, die durch Aktivierung freigesetzt werden und so auf umliegende Gewebe ihre Wirkung entfalten (siehe 1.3).

Bei diesem Modell wurden die gleichen Untersuchungskriterien und Methoden wie beim Modell der AIA verwendet.

Die Untersuchungsergebnisse (Tab. 4) des ersten Teils zeigten anhand von histologischen Veränderungen und Veränderungen der Proteinproduktionen bzw. Genexpressionen, dass sich durch die AIA eine Synovialitis entwickelt. Diese histologischen Veränderungen, die vermehrte Genexpression von Il-6 und VEGF und die Proteinproduktion ließen sich mit Hilfe von PRP reduzieren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen wiederum die bereits über PRP durchgeführten Studien, wie zum Beispiel von Sanchez (62). Er zeigte, dass bei intraartikulärer Injektion von aus Blut autolog hergestelltem wachstumsfaktorreichem Material (PRGF), die Schmerzen bei Osteoarthrose gelindert werden können. Er begründete dies mit dem Vorhandensein von Proteinen, wie TGF-beta, Metalloproteinasen oder antibakterieller Proteine, welche in PRGF, beziehungsweise den darin enthaltenen Thrombozyten, wie sie auch in PRP vorkommen, zurückzuführen sind. Anitua beschrieb den positiven Effekt von PRGF auf die Hyaluronsäureproduktion synovialer Fibroblasten bei arthritischen Patienten (91). Zwar verwendete Anitua PRGF statt PRP, da diese Medien sich jedoch sehr ähnlich sind, unterstützen seine

Ergebnisse die Schlussfolgerungen dieser Arbeit ebenfalls. Proteinanalysen von PRP zeigten, dass in PRP eine Ansammlung von sekretorischen Proteinen enthalten ist, die auch mit entzündungsmodulatorischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Die niedrigen Konzentrationen von Il-1-alpha in PRP unterstützen die antiinflammatorische Wirkung von PRP auf den Knorpel (92), da hohe Konzentrationen von Il-1 eine stark proinflammatorische Wirkung haben können (92). Il-6 hat verschiedenste Rollen in der Geweberegeneration und bei Entzündungsreaktionen. Es wird als Immunmodulator betrachtet. PDGF-BB und TGF-beta sind schon lange als Faktoren der Gewebsregeneration und Wachstumsfaktoren bekannt. Da sie ebenfalls in PRP vorkommen, könnten sie positiv auf die Knorpelheilung einwirken, wenn sie intraartikulär injiziert werden (50). Weitere Möglichkeiten, bei denen die Faktoren, die PRP freisetzen kann, schon erfolgreich eingesetzt werden, sind beispielsweise der Einsatz von PRP in der Knochenheilung (z.B. Knochendefekte, Gelenkersatz oder Syndesmosenbehandlung) und die Behandlung chronischer Erkrankungen mit verminderter Heilungstendenz (z.B. Tendinosen oder diabetische Ulcera) (50-58). Mishra zeigte, dass PRP auch bei Ellbogentendinosen den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann (56). Diese Studien unterstützen ebenfalls die Hypothese dieser Arbeit, dass PRP auch bei chronischen Erkrankungen wirksam ist.

Alle oben genannten Studien beschreiben den erfolgreichen Einsatz von PRP bei Störungen der Heilung bzw. gewünschtem, schnelleren Heilungseintritt von verschiedenen Erkrankungen. Der Einsatz bei autoimmunen Gelenkerkrankungen wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben. Da es bei der AIA ebenfalls zu Entzündungsreaktionen und Einschränkungen der Heilung kommt und die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie ebenfalls eine Reduktion der Entzündungsparameter zeigten, liegt die Verwendung von PRP auch in der Behandlung chronischer autoimmun induzierter Gelenkerkrankungen nahe.

4.4 Aussagekraft des Studiendesigns

Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie sind ermutigend hinsichtlich zukünftiger Therapiemöglichkeiten der AIA. Die relativ niedrige Anzahl von Tieren, die verwendet wurden, stellt ein allgemein bekanntes Problem der Großtiermodelle dar. Dies begründet sich durch hohe Kosten und aufwändige administrative Voraussetzungen. Durch die konstante Induktion der Arthritis und den konstanten Effekt von

PRP wird das Studienergebnis, trotz der Schwierigkeiten bei der Aussagekraft derartiger Großtiermodelle, gestärkt. Daher kann die Anzahl der Tiere in dieser Studie als geeignet erachtet werden, um eine klare Aussage über die Induktion der AIA und die Wirkung von PRP treffen zu können.

Die Aussagekraft der Studie wird durch die Verwendung bereits etablierter Methoden und Bewertungskriterien, wie z.B. des Goldbergcores, den auch Ohashi 1996 schon einsetzte, gestärkt (76, 84). Mit dem modifizierten Goldbergcore konnten auch in dieser Untersuchung entsprechende histologische Veränderungen nachgewiesen werden. Ebenso zeigten Untersuchungen der Expression von Il-6 und VEGF, sowie die Proteinproduktion einen Anstieg der Messwerte bei der Synovialitis. Dies unterstützt wiederum die histologischen Ergebnisse des modifizierten Goldbergcores. Des Weiteren konnte ein Abbau von Proteoglycan und Kollagen II im Knorpel durch Safranin-O und Kollagen II Färbungen bei der AIA dokumentiert werden.

In den kalzifizierten und den dekalzifizierten histologischen Proben konnten keine Knorpelveränderungen beobachtet werden, dennoch wurde das Signal für Il-6 und VEGF in den Antikörperfärbungen und den Proteinanalysen durch PRP-Injektion reduziert. In der RNA-Analyse konnte nach PRP-Injektion keine signifikante Veränderung der VEGF-Expression nachgewiesen werden. Diese Aussage kann man nur hypothetisch begründen. So wird möglicherweise VEGF vom Knorpel hergestellt, aber der reparative Effekt der Mediatoren zeigt sich an einem anderen Ort, als dem der Produktionsstätte. Außerdem ändert die PRP-Applikation die Genexpressionsrate nicht. Dies reduziert die Aussagekraft der anderen Ergebnisse nicht.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden war die Proteinkonzentration von Il-6, VEGF, TNF-alpha, IGF1 und Il-1 in den ELISA-Messungen signifikant reduziert. Die konstante Reduktion aller getesteten Marker führte zu der Annahme, dass der zelluläre Proteinumsatz von inflammatorischen Stimuli beeinflusst wird und sogar noch durch intraartikuläre PRP-Injektion modifiziert werden kann, lange bevor der Knorpelschaden mikroskopisch sichtbar wird. Solch ein Effekt einer intraartikulären Injektion könnte besonders nützlich in der Unterstützung der Erhaltung der Integrität der Knorpeloberfläche sein und dabei die Gelenkbeweglichkeit erleichtern.

Die Ergebnisse dieser Studie werden von Sanchez und Kon gestützt (61, 62). Sie beschreiben ebenfalls den positiven Effekt von PRP bei intraartikulärer Injektion in Kniegelenke bei degenerativer Osteoarthritis.

4.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Großtiermodell zur Induktion einer autoimmunen Kniegelenkarthritis etabliert. Dieses Modell kann bei der Analyse der Pathomechanismen bei der Entstehung frühzeitiger inflammatorischer Arthritis verwendet werden. Die Resultate bestätigen die Ergebnisse von Ohashi (76), der bei Beagles mit vergleichbarer Methode, unter Verwendung von BSA, ebenfalls Synovialitis erzeugte. Bei der Induktion der AIA konnten mikroskopische Veränderungen der Synovialmembran, sowie ein Konzentrationsanstieg der Entzündungsmediatoren in der Synovialmembran und im Gelenkknorpel gezeigt werden. Des Weiteren kann die Injektion von PRP in das Kniegelenk frühe autoimmune Entzündungsreaktionen, sowie chondrale und synoviale Veränderungen verringern. Es kann daraus geschlossen werden, dass ein protektiver Effekt von PRP die Intaktheit von Synovialmembran und Knorpel erhält.

Die Ergebnisse der Studie können eine neue therapeutische Option bei der akuten AIA darstellen. Durch die Analyse bekannter Mediatoren der arthritischen Entzündung wurden Daten erhoben, welche die Idee, PRP als intraartikulär injizierbares antientzündliches Agens zu nutzen, unterstützen. Es sind jedoch langfristige Nachbeobachtungen und groß angelegte Untersuchungen notwendig, um die hier aufgestellte Hypothese weiter zu sichern.

5. Veröffentlichungen

- Lippross, S., Moeller B., Haas H. et al. (2011): Intraarticular injection of Platelet-rich Plasma reduces inflammation in a house swine model for arthritis of the knee joint.: ORS 2011, Annual Meeting ORS 2011, Longbeach California 13.-16. Januar 2011: Poster No. 2034.
- Lippross, S., Moeller, B., Haas H. et al. (2011): Intraarticular injection of Platelet-rich Plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint.: Arthritis Rheum 63(11): 3344-3353. (93)

6. Materialverzeichnis

6.1 Antikörper

- Antikörperversdünnung S3022 (Dako, Glostrup, Denmark)
- Il-1-, Il-6-, TNF-alpha-, VEGF-Nachweis mit Milliplex humen cytokine multiplex immunoassaykit (MPXHCYTO-60K-01 (Millipore, Billerica, USA)
- Kaninchen polyklonale primäre Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) gegen:
Il-6 (1:1000, ab6672)
Kollagen II (1:1000, ab54236, prediluted)
VEGF (1:500, ab46154)
- Luminexassay LiqiChip 200 (Quiagen, Valencia, USA)
- Milliplex humen cytokine multiplex immunoassay kit (MPXHCYTO-60K-01)
(Millipore, Billerica, USA)

6.2 Chemikalien

- Ameisensäure 0,1 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Aqua dest (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- BSA, Fraction V (Sigma Chemical, St. Louis, USA)
- Eindeckmittel für Mikroskopie (Eukitt, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol absolut (1.00983.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol vergällt 99% (642, BüFa Chemikalien, Hude/ Altmoorhausen, Deutschland)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Fixierung mit Aquatex (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
- Flüssigstickstoff (Air Liquid, Düsseldorf, Deutschland)
- Formalin (7040, J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Hämalun (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Hämatoxylin-Eosin (HE) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- HCl-Alkohol (1.00327.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Hot Start Taq DNA-Polymerase (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Katalysator: α - α - Azoisobutyronitril (11630, Sigma-Aldrich/Fluka, St. Louis, USA)

- Loctite 493 Sekundenkleber (Loctite/ Henkel, Garching, Deutschland)
- Mayer's Hämlaunlösung (1.09249.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol 20 % (8045, J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Monomer: Methacrylsäuremethylester 99 % (64200, Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Paraffin (McCormick Scientific/ Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Paraformaldehyd (J. T. Baker, Phillipsburg, USA)
- PBS
8,0 g NaCl (1.06400.5000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
1,44 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O (Di-Natriumhydrogenphosphat mit 2 Wasser)
(1.06580.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
0,2 g KCl (1.04936.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
0,2 g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) (1.04873.1000, Merck, Darmstadt)
ad.1000 ml Aqua dest
- Polyacryl Carrier (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA)
- Polyacrylmetacrylat (PMMA) (Sigma Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Protease-Induced Epitope Retrieval (PIER) (Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Protease-induced Epitope Retrieval (PIER) (Sigma Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA)
- Protein Block serum-free X0909 (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Proteinase K (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Safranin-O (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Stocklösung (Fixierkonzentrat) (Dürr Periomat Intra/ DürrDental, Bietigheim-Bissingen, Deutschland)
- Stoppbad
4 ml Eisessig (1.00063.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
400ml Fixierer (Kodak, Stuttgart, Deutschland)
Spüllösung AGEPON (Agfa-Gevert, Leverkusen, Deutschland)
- TBS
0,9 g Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
6,85 g Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
8,78g NaCl (s. PBS)
ad. 1000 ml Aqua dest

- Toluidinblau-o
1 g Toluidinblau (1.15930.0025, Merck, Darmstadt, Deutschland)
1 g Natriumcarbonat in 100 ml Aqua dest lösen (Merck, Darmstadt, Deutschland)
2x filtrieren
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Trizol reagent (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)
- Weichmacher: Nonylphenol-polyethylenglycolacetat (74432, Sigma-Aldrich/
Fluka, St. Louis, USA)
- Weichmacher: Phtalsäuredibutylester (800919, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol-lösung (Isomerengemisch, L2536, BüFa Chemikalien, Hude/
Altmoorhausen, Deutschland)

6.3 Geräte

- Achatmörser
- Axioskop 40 (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Diamantbandsäge Typ 300 (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Gewebelysators (Homogenisator, Precellys/ Bertin Corp., Villeurbanne,
Frankreich)
- Homogenisator (Stahl Kit PeqLab, Precellys/ Bertin Corp., Villeurbanne,
Frankreich)
- I-Cycler (BioRad, München, Deutschland)
- Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Biomet, Warsaw, USA)
- Luminex 100™ - IS (Luminex, Austin, USA)
- Photometer
- Röntgengerät HP Faxitron X-Ray System (Elaton/ Faxitron, Tucson, USA)
- Schiebelehre/ Handmessgerät (Elaton, Schweiz)
- Schleifmaschine (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Schlittenmikrotom HM 430 (Richard-Allan Scientific/ Thermo Scientific, Waltham,
USA)
- Vakuumpumpe (Exakt, Norderstedt, Deutschland)

6.4 Kits

- 20x RT Enzyme mix (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Dako LSAB + System-AP Kit (Dako, Glostrup, Dänemark)
- High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- RT Buffert mix (Applied Biosystems/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland)
- SYBR Green 2x Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

6.5 Medikamente

- Ketamin (Ketanest®) (Pfizer Pharma, Berlin, Deutschland)
- Metamizol (Novalgin®) (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland)
- Midazolam (Dormicum®) (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
- Paracetamol (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)

6.6 Verbrauchsmaterialien

- Einmalskalpell Feather No.10 (Dr. Junghans Medical, Bad Lausick, Deutschland)
- Gudy-Clear 23 (Neschen, Bückeberg, Deutschland)
- Klebeband (Tesafilm, Hamburg, Deutschland)
- Kryogefäße (Genaxxon BioScience, Ulm, Deutschland)
- Luminex assays (LiquiChip200, Qiagen, Valencia, USA)
- Matrix2D Röhrchen (Vitaris, Baar, Belgien)
- Mikroradiographieröntgenplatte High Resolution HD Plates (HTA Enterprises Microchrome Tecnology Products, Remuda Lane, USA)
- Monovetten CPDA-beschichtet (Saerstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Röntgenplattenentwickler (Kodak, Stuttgart, Deutschland)
- Spezialfolie (Gudy clear 23, Neschen, Bückeberg, Deutschland)
- Superfrost® plus Objektträger (Gerhard Menzel GmbH/ Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland)

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADP	Adenosindiphosphat
AIA	Autoimmuninduzierte Arthritis
Ak	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure
Aqua dest	Destilliertes Wasser
AZA	Azathioprin
BSA	bovines-Serumalbumin
CaCl	Kalziumchlorid
cDNA	Komplementär-DNA (complementary DNA)
cm ²	Quadratzenimeter
COX	Cyclooxygenase
CPDA	Citrat / Phosphat / Dextrose / Adenin
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonate-Wasser
DMARDs	Disease-Modifying-Antirheumatic-Drugs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-Pen	D-Penicillamin
ECGF	Epithelial Cell Growth Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
Fa.	Firma
Fg	Fibrinogen
Fn	Fibronectin
g	Gramm, Gravitation
GAG	Glycosaminoglykan
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgA	Immunglobulin A
IGF	Insulin-like Growth Factor

IgG	Immunglobulin G
Il-1	Interleukin1
Il-1-beta	Interleukin 1 beta
Il-6	Interleukin 6
Immun.	Immunisation
Inj.	Injektion
KG	Kniegelenk
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Milliampere
min.	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MMA	Methylmetacrylat
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat
NaCl	physiologische Kochsalzlösung
NF kappa B	Nuclear factor kappa B
n. s.	nicht signifikant
NSAR	Nichtsteroidale Antiphlogistika / Nichtsteroidale Antirheumatika
Oc	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
On	Osteonectin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBSB	Phosphate Buffered Saline mit 0.1 % Bovine Serum Albumin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDAF	Platelet-derived Angiogenesis Factor
PDEGF	Platelet-derived Endothelial Growth Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PF4	Platelet Factor 4
pH	Pondushydrogenii
PIER	Protease- Induced Epitope Retrieval
PMMA	Polymethylmetacrylat

7. Abkürzungsverzeichnis

PRGF	autologes preparation rich in growth factors
PRP	Platelet-rich Plasma
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
rpm	Rotationen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
Safranin-O	Safranin-Orange
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SSZ	Sulfasalazin
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor (-Isoformen)
TIMP	Tissue inhibitors of Matrix Metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vn	Vitronectin
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

8. Literaturverzeichnis

1. Imboden, JB. (2009) „The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.“ Annu Rev Pathol. **4**: 417-34.
2. Wülker, N. et al. (2005), Taschenatlas Orthopädie und Unfallchirurgie, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York:
3. Klareskog, L., Catrina, Al., Paget, S. (2009) „Rheumatoid arthritis.“ Lancet **373** (9664): 659-72.
4. Ge, Z., Hu, Y., Heng, B. C., Yang, Z., Ouyang, H., Lee, E.H. et al. (2006) ”Osteoarthritis and therapy.“ Arthritis Rheum. **55**(3): 493-500.
5. Ospelt, C., Brentano, F., Rengel Y., Stanczyk, J., Kolling, C., Tak, P. P. et al. (2008) ”Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis.“ Arthritis Rheum. **58**(12): 3684-92.
6. McInnes, I.B., Schett, G. (2007) ”Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.“ Nat Rev Immunol. **7**(6): 429-42.
7. Zwerina, J., Redlich, K., Schett, G., Smolen, J. S., (2005) ”Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines.“ Ann N Y Acad Sci. **1051**: 716-29.
8. Schonhaler, H. B., Huggenberger, R., Wculek, S. K., Detmar, M., Wagner, E. F. (2009) ”Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis.“ Proc Natl Acad Sci U S A. **106**(50): 21264-9.
9. Verschure, P. J., van Marle, J., Joosten, L. A., van den Berg, W. B.. (1995) „Chondrocyte IGF-1 receptor expression and responsiveness to IGF-1 stimulation in mouse articular cartilage during various phases of experimentally induced arthritis.“ Ann Rheum Dis. **54**(8): 645-53.
10. Fernihough, J. K., Billingham, M. E, Cwyfan-Hughes, S., Holly, J. M. (1996) ”Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint.“ Arthritis Rheum. **39**(9): 1556-65.
11. Mi, Z., Ghivizzani, S. C., Lechman, E. R., Jaffurs, D., Glorioso, J. C., Evans, C.H. et al. (2000) ”Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints.“ Arthritis Rheum. **43**(11): 2563-70.
12. Dore, S., Pelletier, J. P., Di Battista, J. A., Tardif, G., Brazeau, P., Martel-Pelletier, J. (1994) ”Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins.“ Arthritis Rheum. **37**(2): 253-63.
13. Wruck, C. J., Fragoulis, A., Gurzynski, A., Brandenburg, L. O., Kan, Y. W., Chan, K. et al. (2011) ”Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice.“ Ann Rheum Dis. **70**(5): 844-50.
14. Pufe, T., Scholz-Ahrens, K. E., Franke, A.T., Petersen, W., Mentlein, R., Varoga, D. et al. (2003) ”The role of vascular endothelial growth factor in glucocorticoid-induced bone loss: evaluation in a minipig model.“ Bone. **33**(6): 869-76.

15. Varoga, D., Paulsen, F., Mentlein, R., Fay, J., Kurz, B., Schutz, R. et al. (2006) "TLR-2-mediated induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage in septic joint disease." J Pathol. **210**(3): 315-24.
16. Pufe, T., Petersen, W., Tillmann, B., Mentlein, R. (2001) "Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol. **28**(7): 1482-5.
17. Tohidnezhad, M., Varoga, D., Podschun, R., Wruck, C. J., Seekamp, A., Brandenburg, L. O. et al. (2011) "Thrombocytes are effectors of the innate immune system releasing human beta defensin-3." Injury. **42**(7): 682-6.
18. Schluter, B., König, B., Bergmann, U., Müller, F. E., König, W. (1991) "Interleukin 6--a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma: evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells." J Trauma. **31** (12): 1663-70.
19. van Vollenhoven, R. F. (2009) "Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art." Nat Rev Rheumatol. **5**(10): 531-41.
20. University of Maryland Medical Center, Baltimore (2011) "Rheumatoid arthritis – Medications" URL: http://www.umm.edu/patiented/articles/what_specific_drugs_used_treating_rheumatoid_arthritis_000048_8.htm.
21. Kremer, J. M., Alarcon, G. S., Lightfoot, R. W. Jr., Willkens, R. F., Furst, D. E., Williams, H. J. et al. (1994) "Methotrexate for rheumatoid arthritis. Suggested guidelines for monitoring liver toxicity. American College of Rheumatology." Arthritis Rheum. **37**(3): 316-28.
22. Weinblatt, M. E., Kaplan, H., Germain, B. F., Merriman, R. C., Solomon, S. D., Wall, B. et al. (1991) "Methotrexate in rheumatoid arthritis: effects on disease activity in a multicenter prospective study." J Rheumatol. **18**(3): 334-8.
23. Weinblatt, M. E., Kaplan, H., Germain, B.F., Merriman, R.C., Solomon, S. D., Wall, B. et al. (1990) "Low-dose methotrexate compared with auranofin in adult rheumatoid arthritis. A thirty-six-week, double-blind trial." Arthritis Rheum. **33**(3): 330-8.
24. Herold, G. et al. (2009) "Innere Medizin." Dr. med. Gerd Herold, Köln
25. Felson, D. T. (2011) "American College of Rheumatology hybrid measure for assessing efficacy of treatment in patients with refractory rheumatoid arthritis: comment on the article by Genovese et al." Arthritis Rheum. **63**(10): 3181-2; author reply 2.
26. Missler-Karger, B. (2011) „Neue Definition für eine Remission der RA.“ Rheuma-Online; URL: www.rheuma-online.de/news/artikel/neue-definition-fuer-eine-remission.html.
27. e.V. DGfR. (2007) „Management der frühen rheumatoiden Arthritis.“ DGRh-Leitlinie 2007.
28. Rote Liste Service GmbH (2011) „Fachinformationsverzeichnis für Ärzte und Apotheker“, Frankfurt am Main. URL: <http://www.fachinfo.de>.
29. Leinmüller, R. (1999) „Das Osteoporose-Risiko ist erhöht.“ Dtsch Arztebl. **96**: A-1329 / B-1113 / C-1041

30. Bischoff, A., (2004) „Rheumatologie: Mit funktionsfähigen Gelenken alt werden.“ Dtsch Arztebl. **101**: A-2296 / B-1927 / C-1854
31. Zeidler, H., Katthagen, B.-D. (2001) „Kongressbericht: Verbesserung der Lebensqualität als Therapieziel Maßnahmen am Beispiel der Arthrose und Arthritis.“ Dtsch Arztebl. **98**: A-1564, B-1332, C-1246
32. Lippross, S., Alini, M. 2007 “Platelet-rich plasma for bone healing - to use or not to use?” A. O. Dialogue **1/07**: 25-9.
33. Furie, B., Furie, B. C. (2007) „In vivo thrombus formation.“ J Thromb Haemost. **5 Suppl 1**:12-7.
34. Harrison, P., Cramer, E. M. (1993) “Platelet alpha-granules.” Blood Rev. **7**(1): 52-62.
35. Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., Georgeff, K. R. (1998) „Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.“ Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **85**(6): 638-46.
36. Eppley, B. L., Woodell, J.E., Higgins, J. (2004) “Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing.” Plast Reconstr Surg. **114**(6): 1502-8.
37. van den Dolder, J., Mooren, R., Vloon, A. P., Stoelinga, P. J., Jansen, J. A. (2006) “Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells.” Tissue Eng. **12**(11): 3067-73.
38. Anitua, E., Andia, I., Sanchez, M., Azofra, J., del Mar Zaldueño, M., de la Fuente, M. et al. (2005) “Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture.” J Orthop Res. **23**(2): 281-6.
39. Bostrom, M. P., Saleh, K.J., Einhorn, T. A. (1999) “Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models.” Orthop Clin North Am. **30**(4): 647-58.
40. Boyan, B.D., Ranly, D.M., Schwartz, Z. (2006) “Use of growth factors to modify osteoinductivity of demineralized bone allografts: lessons for tissue engineering of bone.” Dent Clin North Am. **50**(2):217-28, viii.
41. Einhorn, T. A. (1995) “Enhancement of fracture-healing.” J Bone Joint Surg Am. **77**(6).
42. Glowacki, J. (1998) “Angiogenesis in fracture repair.” Clin Orthop Relat Res. **355 Suppl**: 82-9.
43. Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M., Borden, M. D., Cooper, J. A., Jr. (1999) “Tissue engineering: orthopedic applications.” Annu Rev Biomed Eng. **1**: 19-46.
44. Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., Petite, H. (2005) “Engineering bone: challenges and obstacles.” J Cell Mol Med. **9**(1): 72-84.
45. Lucarelli, E., Beccheroni, A., Donati, D., Sangiorgi, L., Cenacchi, A., Del Vento, A. M. et al. (2003) “Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells.” Biomaterials. **24**(18): 3095-100.
46. Street, J., Bao, M., de Guzman, L., Bunting, S., Peale, F. V., Jr., Ferrara, N. et al. (2002) “Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover.” Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(15): 9656-61.

47. Fukui, N., Zhu, Y., Maloney, W. J., Clohisy, J., Sandell, L. J. (2003) "Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes." J Bone Joint Surg Am. **85-A Suppl 3**: 59-66.
48. Yetimoglu, C. (2007) "Expression von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) während der Knochenentwicklung, der physiologischen Knochenheilung und der durch systemisch appliziertes Wachstumshormon (GH) stimulierten Knochenheilung". Charité - Universitätsmedizin Berlin
49. Anitua, E. (2001) "The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery." Pract Proced Aesthet Dent. **13**(6): 487-93.
50. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A. T. (2004) "Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration." Thromb Haemost. **91**(1): 4-15.
51. Driver, V.R., Hanft, J., Fylling, C. P. (2006) "Beriou JM. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers." Ostomy Wound Manage. **52**(6): 68-70, 2, 4 passim.
52. Hee, H. T., Majd, M. E., Holt, R. T., Myers, L. (2003) "Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion?" Eur Spine J. **12**(4): 400-7.
53. Aurori, B. F., Weierman, R.J., Lowell, H. A., Nadel, C. I., Parsons, J. R. (1985) "Pseudarthrosis after spinal fusion for scoliosis. A comparison of autogeneic and allogeneic bone grafts." Clin Orthop Relat Res. **199**: 153-8.
54. Hakimi, M., Jungbluth, P., Thelen, S, Betsch, M., Linhart, W., Flohe, S. et al. (2011) "Platelet-rich plasma combined with autologous cancellous bone : An alternative therapy for persistent non-union?" Unfallchirurg. **114**(11): 998-1006.
55. Floryan, K. M., Berghoff, W. J. (2004) "Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients." AORN J. **80**(4): 668-74, quiz 75-8.
56. Mishra, A., Pavelko, T. (2006) "Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma." Am J Sports Med. **34**(11): 1774-8.
57. Majewski, M., Ochsner, P. E., Liu, F., Fluckiger, R., Evans, C. H. (2009) "Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum." Am J Sports Med. **37**(11): 2117-25.
58. Lopez-Vidriero, E., Goulding, K. A., Simon, D. A., Sanchez, M., Johnson, D. H. (2010) "The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment." Arthroscopy. **26**(2): 269-78.
59. Bielecki, T.M., Gazdzik, T.S., Arendt, J., Szczepanski, T., Krol, W., Wielkoszynski, T. (2007) "Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study." J Bone Joint Surg Br. **89**(3): 417-20.
60. Tohidnezhad, M., Varoga, D., Wruck, C. J., Podschun, R., Sachweh, B. H., Bornemann, J. et al. (2012) "Platelets display potent antimicrobial activity and release human beta-defensin 2." Platelets **23**(3): 217-23
61. Kon, E., Buda, R., Filardo, G., Di Martino, A., Timoncini, A., Cenacchi, A. et al. (2010) "Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. **18**(4):472-9.

62. Sanchez, M., Anitua, E., Azofra, J., Aguirre, J. J., Andia, I. (2008) "Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study." Clin Exp Rheumatol. **26**(5): 910-3.
63. Theiler, R., (2002) "Arthrose, Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation." Schweiz Med Forum **23**: 555-61
64. Schneider, M., Lelgemann, M., Abholz, H.-H., Blumenroth, M., Flügge, C., Gerken, M., Jäniche, H., Kunz, R., Krüger, K., Mau, W., Specker, C., Zellner, M. (2011) „Interdisziplinäre Leitlinie, Management der frühen rheumatoiden Arthritis. 08/2011“ URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-002I_S3_Management_fruehe_rheumatoide_Arthritis_2011-10.pdf
65. Lühmann, D., Hauschild, B., Raspe H. (2000) „Hüftgelenkendoprothetik bei Osteoarthrose – Eine Verfahrensbewertung.“ Institut für Sozialmedizin, Lübeck URL: http://portal.dimdi.de/de/hta/hta_berichte/hta018_bericht_de.pdf.
66. GmbH BD. GPS Biomet System. Berlin Biomet Deutschland GmbH (2011) URL: <http://www.biomet.de/de-medical/biologics/gps/>.
67. Kevy, S. V., Jacobson, M. S. (2004) "Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel." J Extra Corpor Technol. **36**(1): 28-35.
68. Sciafani, A. P., Romo, T., 3rd, Ukrainsky, G., McCormick, S. A., Litner, J., Kevy S. V. et al. (2005) "Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate." Arch Facial Plast Surg. **7**(3): 163-9.
69. GmbH BD. (2009) "Körpereigene Wachstumsfaktoren und Autologe Fibrinmembranen." Biotechnology Institute DIS, BTI Deutschland GmbH
70. Smith, D. W., Harding, G. E. (1977) "Animal model of human disease. Pulmonary tuberculosis. Animal model: Experimental airborne tuberculosis in the guinea pig." Am J Pathol. **89**(1): 273-6.
71. Punto, L., Suolanen. J. (1976) "Testing of myelographic contrast media using the pig as an experimental animal". Invest Radiol. **11**(4): 331-4.
72. Braun, W., Buchholz, W., Barth, J., Nitzschner, H., Kipping, D., Schmoranzler, H. et al. (1971) "The pig as experimental animal under thermal and pharmacological stress. Methodology of the experimental technic." Z Gesamte Exp Med. **154**(1): 60-9.
73. Shrive, N. G., O'Connor, J. J., Goodfellow, J. W. (1978) "Load-bearing in the knee joint." Clin Orthop Relat Res. **131**: 279-87.
74. Weaver, M. E., Sorenson, F. M, Jump, E. B. (1962) "The miniature pig as an experimental animal in dental research." Arch Oral Biol. **7**: 17-23.
75. Ingram, D. L., Legge, K. F. (1971) "The influence of deep body temperatures and skin temperatures on peripheral blood flow in the pig." J Physiol. **215**(3): 693-707.
76. Ohashi, F., Shimada, T., Sakurai, M., Ishihara, S., Kuwamura, M., Yamate, J. et al. (1996) "The production of arthritis in beagles by an immunological reaction to bovine serum albumin." Exp Anim. **45**(4): 299-307.
77. Co. SC. BSA, Fraction V. St. Louis, USA: Sigma-Aldrich; 2011 (2011); URL: <http://www.sigmaaldrich.com/>.
78. Barthelmai, W. (1969) "Isolation of thrombocytes from small blood volumes." Klin Wochenschr. **47**(5): 266-70.

79. Marx, R. E. (2001) "Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?" Implant Dent. **10**(4): 225-8.
80. Romeis, B., Bock, P., Denk, H. (1989) „Romeis Mikroskopische Technik.“ Urban und Schwarzenberg, München, Baltimore:.
81. Neumeister, B., Besenthal, I., Liebich, H. (2000) „Klinikleitfaden Labordiagnostik“ Urban und Fischer Verlag, München.
82. Rosenberg, L. (1971) "Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am. **53**(1): 69-82.
83. Mainil-Varlet, P., A. T., Brittberg, M., Bullough, P., Hollander, A., Hunziker, E., Kandel, R., Nehrer, S., Pritsker, K., Roberts, S., Stauffer E. (2002) "The International Cartilage Repair Society (ICRS) -Histological Visual Scale. A Preliminary Report of the Histological End Point Committee. ; I. Human Biopsies, Toronto Consensu." European Cells and Materials. **4 Suppl. 1**: 10.
84. Goldberg, V. M., Lance, E. M., Davis, P. (1974) "Experimental immune synovitis in the rabbit. Relative roles of cell mediated and humoral immunity." Arthritis Rheum. **17**(6): 993-1005.
85. Sernetz, M., Giese, C., Hauptmann, U. Hild, D., Müller, M. (2000) "Spezielle Methoden der Lichtmikroskopie" Justus-Liebig-Universität Gießen **Aufl. 2**: 24
86. Luminex Corporation (2003) "Luminex® 100™ IS – Bedienungshandbuch, Version 2.2" Austin, Texas.
87. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) „Molecular cloning: a laboratory manual.“ 2nd edition, Cold Spring Harbour, New York.
88. Kiehne, K., Brunke, G., Meyer, D., Harder, J., Herzig, K. H. "Oesophageal defensin expression during Candida infection and reflux disease." Scand J Gastroenterol. **40**(5): 501-7.
89. Shrive, N. G., O'Connor, J. J., Goodfellow, J. W. (1978) "Load-bearing in the knee joint." ClinOrthopRelat Res. **131**: 279-87.
90. Wooley, P. H. (1988) "Collagen-induced arthritis in the mouse. Methods Enzymol." **162**: 361-73.
91. Anitua, E., Sanchez, M., Nurden, A. T., Zalduendo, M. M., de la Fuente, M., Azofra, J. et al. (2007) "Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients." Rheumatology (Oxford). **46**(12): 1769-72.
92. Jacques, C., Gosset, M., Berenbaum, F., Gabay, C. (2006) "The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation." Vitam Horm. **74**: 371-403.
93. Lippross, S., Moeller, B., Haas, H., Tohidnezhad, M., Steubesand, N., Wruck, C. J. et al. (2011) "Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint." Arthritis Rheum. **63**(11): 3344-53.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Seekamp danke ich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die Möglichkeit der Arbeit in seinem Labor und die angenehme Atmosphäre während der Doktorandentreffen.

Herrn PD Dr. med. Sebastian Lippross (Klinik für Unfallchirurgie UKSH-Kiel, Direktor Prof. Dr. med. Andreas Seekamp) danke ich für die immer gute, zielgerichtete, unkomplizierte und sehr nette Betreuung während meiner Arbeit. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer sehr geschätzt.

Herrn Prof. Dr. med. Deike Varoga (Klinik für Unfallchirurgie UKSH-Kiel, Direktor Prof. Dr. med. Andreas Seekamp) und Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Björn Möller (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Chirurgie UKSH-Kiel, Direktor Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang) danke ich, dass Sie dieses Projekt zusammen mit Herrn PD Dr. med. Sebastian Lippross ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe und Frau Dr. rer. nat. Mersedeh Tohidnezhad (Institut für Anatomie und Zellbiologie RWTH Aachen, Direktor Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe) danke ich für die Anfertigung der Proteinanalysen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Yahya Açil (Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Chirurgie UKSH-Kiel, Direktor Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang) danke ich für die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit der Nutzung seines Labors in der Klinik für Mund-Kiefer und Gesichtschirurgie.

Herrn Prof. Dr. med. Bodo Kurz (Anatomisches Institut CAU, Direktorium Prof. Dr. med. Jobst Sievers, Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius, Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Schünke) danke ich für die gute, fundierte, wissenschaftliche und sehr nette Betreuung.

Herrn Dipl. Inform. Jürgen Hedderich (Institut für medizinische Statistik und Informatik UKSH-Kiel, Direktor Prof. Dr. rer. nat. Michael Krawczak) danke ich für die Beratung bei den statistischen Auswertungen.

Frau Dr. rer. nat. Nadine Steubesand, Frau Gaby Neßenius und Frau Kathrin Lange (Klinik für Unfallchirurgie UKSH-Kiel, Direktor Prof. Dr. med. Andreas Seekamp) danke ich für die exzellente technische und wissenschaftliche Unterstützung meiner

Arbeit im Labor, für die gute Qualität der von Ihnen für mich durchgeführten Untersuchungen und die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Daneben möchte ich allen anderen danken, die mich während meiner Arbeit in jeglicher Form unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern für ihre fortwährende Unterstützung, Ihr Interesse an meiner Arbeit und Motivation, und dass sie mir den Weg bis hierher ermöglicht haben, ganz herzlich bedanken.

10. Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Kiel, 20.09.2013

11. Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. med. Andreas Seekamp, Prof. Dr. med. Deike Varoga und PD Dr. med. Sebastian Lippross an der Klinik für Unfallchirurgie der CAU zu Kiel angefertigt. Frühere Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Kiel, 20.09.2013

12. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Vor- und Zuname	Holger Haas
Geburtsdatum	27. Juli 1978
Geburtsort	Bad Saulgau (Württemberg)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Berufsausbildung/ Berufserfahrung

14.01.2013 bis heute	Assistenzarzt für Allgemeinmedizin (Klinik Preetz, Innere Medizin)
09.01.2013	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
01.09.2010 - 31.12.2012	Assistenzarzt für Anästhesie und operative Intensivmedizin (Westküstenklinikum Heide)
01.10.2000 – 12.03.2004	Ausbildung zum ex. Physiotherapeuten
01.09.1999 – 30.09.2000	Zivildienst: Rettungsdienst (Rettunshelfer/-sanitäter)

Studium

06.05.2010	Approbation als Arzt
01.10.2003 – 30.09.2010	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

24.06. 1999	Abitur Margarete-Steiff-Gymnasium in Giengen/Brz.
-------------	---