

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ersatz von fötalem Kälberserum (FCS) durch humanes Thrombozytenlysat zur  
Verwendung im *Tissue Engineering*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tania Nanina Helmert  
aus Engelskirchen

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: in der Online-Version entfernt

1. Gutachter: in der Online-Version entfernt

2. Gutachter: in der Online-Version entfernt

Tag der Promotion: 06. Juli 2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG / ZIEL DER DISSERTATION .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURDISKUSSION .....</b>	<b>9</b>
2.1	<i>TISSUE ENGINEERING .....</i>	9
2.2	WACHSTUMSFÖRDERNDER ZUSATZ ZUM KULTURMEDIUM VON ENDOTHELZELLEN .....	10
2.2.1	<i>Fötales Kälberserum .....</i>	10
2.2.2	<i>Alternativen .....</i>	13
2.3	THROMBOZYTEN .....	16
2.3.1	<i>Grundlagen .....</i>	16
2.3.2	<i>Wachstumsfaktoren von Thrombozyten.....</i>	18
2.3.3	<i>Wachstumsfaktor-Rezeptoren .....</i>	19
2.3.4	<i>Vascular endothelial growth factor .....</i>	20
2.3.5	<i>Fibroblasten Wachstumsfaktor.....</i>	20
2.3.6	<i>Insulin-like growth factor.....</i>	21
2.3.7	<i>Platelet-derived growth factor.....</i>	21
2.3.8	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math>1 .....</i>	22
2.3.9	<i>Epidermal growth factor.....</i>	22
2.4	HERSTELLUNG VON THROMBOZYTENLYSAT .....	23
2.4.1	<i>Ausgangsmaterial.....</i>	23
2.4.2	<i>Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Thrombozytenkonzentraten.....</i>	24
2.4.2.1	<i>Wiederholtes Einfrieren und Auftauen .....</i>	24
2.4.2.2	<i>Aktivierung der Thrombozyten .....</i>	25
2.4.2.3	<i>Verwendung von Schall.....</i>	25
2.4.2.4	<i>Solvent-Detergent-Verfahren .....</i>	26
2.5	ZIELSETZUNG .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
3.1	MATERIALIEN .....	28
3.1.1	<i>Chemikalien .....</i>	28
3.1.2	<i>Lösungen und Puffer .....</i>	28
3.1.3	<i>Kits .....</i>	29
3.1.4	<i>Medien.....</i>	29
3.1.4.1	<i>Humanes Thrombozytenlysat .....</i>	29
3.1.5	<i>Verbrauchsmaterialien .....</i>	30
3.1.6	<i>Gebrauchsmaterialien.....</i>	30
3.1.7	<i>Geräte .....</i>	30
3.1.8	<i>Computerprogramme .....</i>	31
3.1.9	<i>Zellen.....</i>	31
3.2	METHODEN.....	31
3.2.1	<i>Steriles Arbeiten.....</i>	31
3.2.2	<i>Isolation primärer Zellen.....</i>	32
3.2.3	<i>Mediumwechsel und Splitten der Zellkultur.....</i>	33
3.2.4	<i>Beurteilung der Zellmorphologie .....</i>	33
3.2.5	<i>Vitalitätsassay.....</i>	33
3.2.6	<i>Bestimmung der Proliferation.....</i>	34
3.2.7	<i>Tube-Formation-Assay.....</i>	35
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
4.1	ZELLMORPHOLOGIE VON HUVEC UNTER DEM EINFLUSS VON HUMANEM THROMBOZYTENLYSAT .....	36

4.2	WIRKUNG VON HUMANEM THROMBOZYTENLYSAT AUF DIE VITALITÄT VON HUVEC .....	38
4.3	WIRKUNG VON HUMANEM THROMBOZYTENLYSAT AUF DIE PROLIFERATION VON HUVEC .....	40
4.4	WIRKUNG VON HUMANEM THROMBOZYTENLYSAT AUF DIE VASKULARISIERUNGSFÄHIGKEIT VON HUVEC <i>IN VITRO</i> (TUBE FORMATION ASSAY) .....	42
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>44</b>
5.1	WIRKUNG VON HUMANEM THROMBOZYTENLYSAT AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE, DIE PROLIFERATION UND DIE VITALITÄT VON HUVEC 44	
5.2	WIRKUNG VON HUMANEM THROMBOZYTENLYSAT AUF DIE ANGIOGENESE <i>IN VITRO</i> .....	48
5.3	FAZIT .....	51
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>61</b>
8.1	WERTE DER ABBILDUNGEN .....	61
8.1.1	<i>Werte der Abbildung 2</i> .....	61
8.1.2	<i>Werte der Abbildung 3</i> .....	61
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENS LAUF .....</b>	<b>64</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AKT</b>	AKT Kinase
<b>Aqua dest.</b>	Aqua destillata
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BC</b>	Buffy Coat
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor
<b>BMP-2</b>	bone morphogenetic protein-2
<b>BrdU</b>	5-Brom-2' desoxyuridin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>CAM</b>	Chorioallantoismembran
<b>CEC</b>	corneal endothelial cell
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DPBS</b>	Dulbeccos's Phosphat Buffered Saline
<b>EC</b>	Endothelzelle
<b>ECFC</b>	Endothelial Colony-forming cells
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ELISA</b>	Enzym-linked immunosorbent assay
<b>EPC</b>	Endothelial progenitor cells
<b>ERK</b>	Extracellular signal-Regulated
<b>et al.</b>	et alia, und andere
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HDMEC</b>	Human microvascular endothelial cells
<b>HABS</b>	humanes AB-Serum

<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HHPL</b>	hitzebehandeltem humanem Thrombozytenlysate
<b>hPL</b>	humanes Thrombozytenlysate
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cells
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IgE</b>	Immunglobulin E
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factor
<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor-1
<b>IL</b>	Interleukin
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MAPKK</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase
<b>MEK</b>	MAP-ERK-Kinase
<b>ml-hPL</b>	laboratory-manufactured human platelet lysate
<b>MSC</b>	Mesenchymal stem cells
<b>MTT</b>	3,(4,5-Dimethylthiazol-2 yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
<b>mTOR</b>	Mechanistic target of rapamycin
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>Na-Heparin</b>	Natrium-Heparin
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B-cells
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PAI</b>	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PDGF-BB</b>	Platelet-derived growth factor subunit B
<b>PDGFR</b>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
<b>PDK</b>	Phosphoinositide-dependent kinase
<b>PF-4</b>	Platelet factor 4
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Phosphoinositide phospholipase C
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PIGF</b>	Placental-growth factor
<b>PIGF-1</b>	Placental-growth factor-1

<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PPP</b>	Platelet poor plasma
<b>PRP</b>	Plättchenreiches Plasma
<b>Raf</b>	Rapidly accelerated fibrosarcoma
<b>Ras</b>	Rat sarcoma
<b>SD</b>	Standard deviation, Standardabweichung
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>TBHP</b>	tert-Butylhydroperoxid
<b>TFPI</b>	Tissue factor pathway inhibitor
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor-beta
<b>TKI</b>	Tyrosinkinase-Inhibitoren
<b>TNBP</b>	Tri-n-butyl-phosphat
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>UV</b>	Ultraviolettstrahlung
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>VEGFR</b>	vascular endothelial growth factor receptor
<b>vWF</b>	von Willebrand Faktor

## **Abbildungsverzeichnis/ Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Substanzen in den Thrombozytengranula

**Tabelle 2:** Konzentrationen Wachstumsfaktoren in FCS und Thrombozytenlysat

**Abbildung 1:** Zellmorphologie von HUVEC unter dem Einfluss von entweder 20% FCS oder humanem Thrombozytenlysat in verschiedenen Konzentrationen

**Abbildung 2:** Zellvitalität von HUVEC unter dem Einfluss von drei verschiedenen humanen Thrombozytenlysaten (MultiPL´30, MultiPL´100, ml-hPL) über 72 h

**Abbildung 3:** Proliferation von HUVEC unter dem Einfluss von drei verschiedenen humanen Thrombozytenlysaten (MultiPL´30, MultiPL´100, ml-hPL) über 72 h

**Abbildung 4:** Analyse der Auswirkungen von humanem Thrombozytenlysat in verschiedenen Konzentrationen auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen im Vergleich zu FCS



# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Fötales Kälberserum (FCS) ist ein Standardprodukt in der Kultivierung von Zellen *in vitro*. Es versorgt die Zellen unter anderem mit wichtigen Nährstoffen, Hormonen, Wachstumsfaktoren und fördert die Proliferation, das Zellwachstum und das Überleben der Zellen. In den letzten Jahren ist fötales Kälberserum allerdings immer mehr in die Kritik geraten, was verschiedene Gründe hat. Zum einen ist die Produktion nicht tierfreundlich und entspricht nicht dem 3R-Prinzip bei Tierversuchen. Des Weiteren können Krankheiten übertragen werden. Viren, Prionen oder Bakterien, welche trotz aufwendiger Verfahren noch im Serum enthalten sein können, können krankheits-erregend sein. Im Rahmen des *Tissue Engineering* können auf diesem Weg Menschen infiziert werden. Zudem können tierische Proteine beim Menschen immunologische Reaktionen hervorrufen. Bei der Erzeugung von Zellkulturen für den therapeutischen Einsatz müssen die GMP-Richtlinien beachtet werden und FCS kann diesen nur schwer entsprechen (1-3).

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Brenner wurde durch die Ko- und Trikultur von Endothelzellen mit Fibroblasten und Epithelzellen erfolgreich ein Mundschleimhaut-äquivalent *in vitro* hergestellt, das zur Geweberekonstruktion und Wundabdeckung verwendet werden soll. Bei der Kultivierung dieses Gewebe-Äquivalents wurde dem Nährmedium ebenfalls FCS zugefügt, so dass es in der bestehenden Form nicht am Patienten angewandt werden kann. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in dieser experimentellen wissenschaftlichen Arbeit untersucht, ob FCS durch humanes Thrombozytenlysat (hPL) im Rahmen des *Tissue Engineering* ersetzt werden kann.

In der Literatur finden sich viele Alternativen zu FCS. Eine potenzielle Alternative als Mediumzusatz ist hPL. Thrombozyten und von Thrombozyten freigesetzte Stoffe haben einen hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren und Chemokinen. Sie enthalten unter anderem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *insulin-like growth factor* (IGF) und *platelet factor 4* (PF-4), welche eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, dem Zellüberleben sowie bei der Angiogenese und der Vaskulogenese spielen.

Durch den hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren scheint hPL ein vielversprechender Kandidat zu sein, FCS im Rahmen des *Tissue Engineering* zu ersetzen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob sich *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kultivieren lassen. Dafür wurden drei unterschiedliche Thrombozytenlysate in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet und zelluläre Prozesse im Kontext der Angiogenese, nämlich die Vitalität, die Proliferation und die Tubulogenese, untersucht.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 *Tissue Engineering*

Das Gebiet des *Tissue Engineering* beschreibt die künstliche Herstellung von biologischem Gewebe im Labor durch die gerichtete Kultivierung von Zellen. 1988 wurde dieser Begriff auf der Tagung der amerikanischen *National Science Foundation* geprägt und wurde dort verstanden als „...die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Biowissenschaften mit dem Ziel des grundlegenden Verständnisses der Beziehung zwischen Struktur und Funktion in normalen und erkrankten Geweben und die Entwicklung von biologischen Ersatz zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion“ (4). Heute ist es eine interdisziplinäre Wissenschaft, welche die Bereiche Medizin, Physik, Biotechnologie und das Ingenieurwesen verbindet. Ziel ist es, biologisches Gewebe für diagnostische, forschungsbasierte und therapeutische Ansätze zu generieren (4, 5). In der Praxis sind drei Grundstoffe erforderlich, um künstliches Gewebe herzustellen: Zellen des zu konstruierenden Gewebes, eine geeignete Gerüstsubstanz, dem *Scaffold*, und ein optimales Milieu in dem die Zellen heranwachsen können. Die Idee ist es, aus lediglich einer kleinen patienteneigenen Gewebeprobe Zellen zu isolieren und diese zu einem gewebeähnlichen Zellverband ausdifferenzieren zu lassen (5). Dieser *in vitro* gezüchtete Zellverband kann dem Patienten als Material dienen, um verletztes oder krankes Gewebe zu ersetzen (4). In der Gynäkologie, in der Vaginalagenesien, angeborene Fehlbildungen oder Traumata zu großen Operationen führen können, ist das Gebiet des *Tissue Engineering* vielversprechend. Das größte Problem bei solchen Eingriffen ist der Gewebeverlust bzw. der Mangel an gesundem Gewebe nach der Operation (6, 7). Solche Patienten können von autologen Gewebe-Äquivalenten profitieren.

Ein wesentliches Problem bei der Herstellung von künstlichem Gewebe mittels *Tissue Engineering* ist die unzureichende Versorgung nach der Transplantation. Die Diffusionsgrenze für Sauerstoff beträgt lediglich 100-200 µm. Bei größerem Gewebeersatz kommt es zur Unterversorgung, was zur Nekrose und zum Absterben des Gewebes führt (8). In der Literatur gibt es zahlreiche Ansätze, um dieser Problematik

entgegenzuwirken. Ein vielversprechender Ansatz ist die Prävascularisierung mit Hilfe von Endothelzellen bereits *in vitro*. In der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Brenner gelang es ein prävascularisiertes und epithelialisiertes Mundschleimhautäquivalent *in vitro* herzustellen. Durch eine Ko-Kultur bzw. Tri-Kultur mit Fibroblasten und *human microvascular endothelial cells* (HDMEC) bzw. Fibroblasten, HDMEC und Epithelzellen auf einer, für am Patienten zugelassenen, Kollagenmatrices (Geistlich Bio-Gide®) wurde dies ermöglicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses *in vitro* gezüchtete Gewebe schnell Anschluss an das Blutgefäßsystem der Maus bzw. Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnerembryonen fand (Dissertation Bauer, 2017, (9)).

Bei den durchgeführten Versuchen und bei der Kultivierung der Endothelzellen im Labor wurde für die optimale Ernährung der Zellen FCS dem Medium zugefügt. Die Verwendung von FCS im Rahmen des *Tissue Engineering* birgt allerdings einige Probleme, was dazu führt, dass Alternativen gefunden werden müssen.

## **2.2 Wachstumsfördernder Zusatz zum Kulturmedium von Endothelzellen**

### **2.2.1 Fötale Kälberserum**

Ein sehr wichtiger Faktor bei der Kultivierung von Zellen im Labor ist das Kulturmedium, da es die Zellen mit allen essenziellen Nährstoffen versorgt. Welche Ansprüche an das Kulturmedium gestellt werden, hängt in erster Linie von den zu kultivierenden Zellen ab. Es muss alle Nährstoffe in einer für die Zelle verfügbaren Form enthalten, um ein optimales Wachstum und eine optimale Proliferation *in vitro* zu gewährleisten. Aus diesem Grund gibt es etliche verschiedene Medien, denen noch unterschiedliche Zusätze hinzugefügt werden, je nach Zelltyp (10-12). Einer dieser Zusätze ist tierisches Serum, welches in der Zellkultur breite Anwendung findet. Es wird von Tieren in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Alter gewonnen. In welcher Konzentration es dem Medium hinzugefügt wird, hängt von den spezifischen Bedürfnissen der Zellen ab. Meist wird es in einer Konzentration von 3-25% dem Kulturmedium hinzugefügt. Ein sehr gängiges Serum ist FCS (10, 11). In FCS sind für die Zellkultur viele wichtige Inhaltsstoffe enthalten.

Zum einen versorgt es die Zellen mit Hormonen und Wachstumsfaktoren, welche wichtig sind für die Proliferation und das Zellwachstum. Es enthält Aminosäuren, Zytokine, Adhäsionsmoleküle, liefert Transportproteine, trägt dazu bei, dass der pH-Wert stabilisiert wird und funktioniert als Proteaseinhibitor. Des Weiteren werden so dem Medium Cholesterin, Fettsäuren und Lipide, meist in Form von Lipoproteinen, hinzugefügt (10-12). Viele von den enthaltenen Proteinen, Peptiden und Metaboliten sind weiterhin unbekannt. Eine Analyse des Serumproteoms konnte ca. 300 Serumproteine identifizieren und es wurden über 4000 Serummetaboliten beschrieben (10). Es ist ein natürlicher Cocktail aus vielen verschiedenen Inhaltsstoffen und bei den meisten menschlichen und tierischen Zellen einsetzbar. Dies macht die Handhabung einfach und kostengünstig.

Viele von den enthaltenen Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und der Vaskulogenese *in vivo* und *in vitro*. Insbesondere im Rahmen des *Tissue Engineering* ist dies ein wichtiger Faktor. Wie oben beschrieben gelang die Prävaskularisierung *in vitro* durch den Einsatz von Endothelzellen. Damit die Zellen ihr spezifisches Verhalten, sich zu gefäßähnlichen Strukturen zu organisieren, beibehalten, müssen entsprechende Wachstumsfaktoren zur Verfügung stehen. Beispiele hierfür sind VEGF, bFGF, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) (13, 14). Durch den Mediumzusatz FCS werden sie den Zellen zur Verfügung gestellt und tragen dazu bei, die Prävaskularisierung zu ermöglichen.

Die Verwendung von FCS ist in den letzten Jahren immer mehr in die Kritik geraten. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zum einen ist es ein Naturprodukt, was bedeutet, dass die qualitative und quantitative Zusammensetzung einzelner Chargen variiert (15). Das resultiert aus der unterschiedlichen geographischen Herkunft des Rohserums, der Serumgewinnung, dessen Weiterverarbeitung und den jahreszeitlichen Schwankungen der Rinderpopulation (10). Die unterschiedliche Zusammensetzung kann Einfluss auf die Adhäsion der Zellen nehmen, das Wachstum und das spezifische Verhalten negativ beeinflussen. Außerdem kann es Einfluss auf die genotypische/phänotypische Stabilität der Zellen nehmen (16, 17). Beispiele hierfür sind im Serum enthaltene Immunglobuline und Transkriptionsfaktoren (18) sowie Wachstumsfaktoren, wie PDGF (19), IGF (20) oder *epidermal growth factor* (EGF) (21). Trotz des Versuches der Unternehmen dies zu

verhindern, ist die Zusammensetzung immer ein wenig unterschiedlich und hat großen Einfluss auf das Zellverhalten (17). Dieser Fakt macht es schwierig Daten aus der Literatur zu vergleichen und Protokolle nachzuvollziehen (22). Um das zu umgehen, ist es oft nötig FCS vor dem Kauf auszutesten und die Charge zu reservieren oder gleich komplett aufzukaufen (10, 11).

Des Weiteren birgt die Verwendung von FCS auch Gesundheitsrisiken. Trotz aufwendiger Sterilisationsverfahren ist nicht ausgeschlossen, dass Viren, Mykoplasmen oder Prionen diese Verfahren überleben und so Krankheiten auf den Menschen übertragen werden können (23-26). Auf diese Weise kann beispielsweise die variant-Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (v-CJD) übertragen werden. Der Auslöser für diese Erkrankung sind Prionen und eine Ansteckung durch Zellen, welche zuvor in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, ist prinzipiell möglich (27, 28).

Die Verwendung von Zellen, die in FCS kultiviert wurden, kann auch eine Immunreaktion beim Empfänger auslösen. In einer Studie, in der Patienten dendritische Zellen erhalten haben, welche zuvor in FCS kultiviert wurden, entwickelte ein Patient IgE-Antikörper gegen Rinderserumalbumin und es kam zur anaphylaktischen Reaktion (29). Weiterhin wurden nach dem Erhalt von Lymphozyten und embryonalen Stammzellen Immunreaktionen beschrieben, wenn die Zellen vorher in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden (30, 31). Patienten mit Osteogenesis imperfecta wurden in einer klinischen Studie mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) behandelt. Ein Patient bildete Antikörper gegen Rinderproteine und die Transplantation war nicht erfolgreich (32).

Durch die potenziell immunogene Wirkung von FCS, die hohe Anzahl an unbekanntem Proteinen und die unterschiedliche Zusammensetzung einzelner Serumchargen kann FCS den *Good Manufacturing Practice* (GMP) Richtlinien nur sehr eingeschränkt entsprechen (33, 34). GMP-Richtlinien, oder – auf deutsch – die Gute Herstellungspraxis, sind Richtlinien zur Reinheits- und Qualitätssicherung für die Herstellung von Arzneimitteln. Die Züchtung autologer Zellen im Labor im Rahmen des *Tissue Engineerings* muss unter diesen Bedingungen erfolgen (35, 36).

Neben den gesundheitlichen Risiken birgt die Verwendung von FCS auch ethische Probleme. FCS wird in der Regel durch eine Herzpunktion des Rinderfötus gewonnen. Bei der Schlachtung des tragenden Muttertiers wird der gesamte Uterus entnommen. Im nächsten Schritt wird der Fötus aus der Gebärmutter entfernt, die Nabelschnur abgeklemmt und das Tier gesäubert und desinfiziert. Ohne jegliche Anästhesie wird anschließend die Punktion durchgeführt. Dabei wird eine Nadel durch die Rippen direkt ins Herz geschoben. Das Blut fließt mit Hilfe einer Vakuumpumpe in einen sterilen Blutentnahmebeutel. Weitere Möglichkeiten das Blut zu gewinnen sind manuelle Herzmassage oder durch die Schwerkraft. Nach der Entnahme wird das Blut gekühlt und die Gerinnung setzt ein. In einem weiteren Schritt wird durch Zentrifugation das Serum gewonnen. Da man davon ausgeht, dass der Fötus während der Blutentnahme lebt und keine Anästhesie zum Einsatz kommt, kann davon ausgegangen werden, dass das Tier während der Prozedur Qualen erleidet. Zwar soll bei der Gewinnung darauf geachtet werden, dass die Lunge des Kalbes nicht belüftet ist, weil dies zur Kortexaktivierung führt und damit zum Schmerzempfinden, doch ist dies fragwürdig. Durch die Herzpunktion eines drei Monate alten Fötus kann ca. 150 ml Serum gewonnen werden. Drei Monate stellt das Mindestalter dar, da sonst das Herz für die Punktion zu klein wäre. Um den Bedarf an FCS zu decken, sterben circa 1-2 Millionen Kälber jedes Jahr (12, 16).

### **2.2.2 Alternativen**

Bei Alternativen zu FCS im Rahmen des *Tissue Engineering* ist es wichtig, dass die Proliferation der Zellen unter dem Einfluss eines Ersatzes nicht eingeschränkt wird. Um eine Prävascularisierung *in vitro* zu ermöglichen ist es ferner wichtig, dass die Zellen ihr spezifisches Verhalten, sich zu gefäßähnlichen Strukturen zu organisieren, beibehalten. Weitere wichtige Aspekte für einen alternativen Mediumzusatz sind, dass die Quantität und Qualität der Inhaltsstoffe konstant sein sollte, es gut zugänglich und kostengünstig ist und Kontaminationen ausgeschlossen werden können (17).

Es gibt verschiedene Ansätze Endothelzellen ohne den Zusatz von FCS zu kultivieren. Labitzke und Kollegen entwickelten ein chemisch definiertes Medium für die Kultivierung von HUVEC ohne den Zusatz von FCS. Es zeigte sich, dass die Zellen in einer viel

höheren Dichte ausgesät werden mussten, um eine gute Proliferationsrate zu erreichen. Des Weiteren waren die Zellen nicht so stressresistent im Vergleich zur Kultivierung in FCS-haltigem Medium, was die Handhabung erschwerte. Tests zur *in vitro*-Angiogenese wurden nicht durchgeführt (37). Daneben wurden Versuche durchgeführt FCS durch menschliches Serum zu ersetzen. Cánovas und Kollegen verwendeten humanes AB-Serum (HABS; PAA laboratories, UK) für die Kultivierung von HUVEC und HDMEC. Die Zellproliferation bei der Verwendung von HABS, im Vergleich zu FCS, über einen Zeitraum von 5 Tagen war nicht eingeschränkt. Allerdings wurden keine weiteren Parameter evaluiert. Weiterhin sind die Kosten für HABS um einiges höher als für FCS, nämlich circa vier- bis fünfmal so hoch (38).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Verwendung von Thrombozyten und den von Thrombozyten freigesetzten Wachstumsfaktoren, aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der Wundheilung, Angiogenese und der Zellregeneration (39, 40). Bei der Aktivierung von Thrombozyten während der Blutkoagulation wird eine hohe Konzentration von bioaktiven Substanzen, wie Wachstumsfaktoren und Mediatoren, freigesetzt (41). Das bessere Verständnis über die Wundheilung und die Rolle von Thrombozyten in diesem Kontext führte zu der Idee, Thrombozyten als eine natürliche Quelle von Wachstumsfaktoren im therapeutischen Bereich einzusetzen. In einer klinischen Studie wurde zur lokalen Behandlung von Ulcera und Wunden nach Sternotomie ein Gel angewendet, welches aus Thrombozyten gewonnene Wachstumsfaktoren enthielt. Die Hospitalisierungsdauer und die Zeit der Wundheilung nach Sternotomie verkürzte sich signifikant. Patienten mit chronischem Ulcera konnten frühzeitig operiert werden (42).

Neben der Behandlung von chronischen Wunden und Ulcera finden Thrombozytenderivate und von Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren Anwendung bei der Kieferorthopädie und der plastischen Chirurgie (43). Um eine Unterkieferimplantat beim Hund besser anwachsen zu lassen, wurde plättchenreiches Plasma (PRP) in Kombination mit MSC verwendet (44).

Viele von diesen Wachstumsfaktoren und Zytokinen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Kultivierung von Endothelzellen, wie Isoformen des PDGF (PDGF-AA, -AB oder -BB),



*transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ), IGF-1, VEGF, EGF, bFGF und *hepatocyte growth factor* (HGF) (45-47). Eine mögliche Alternative zu FCS ist humanes Thrombozytenlysat. Durch das wiederholte Einfrieren und Auftauen von plättchenreichem Blut enthält hPL eine hohe Konzentration an verfügbaren Wachstumsfaktoren und Zytokinen (48). hPL förderte die Proliferation von MSC, sodass eine gleich hohe oder sogar höhere Proliferationsrate im Vergleich zu FCS beobachtet wurde (49). Barsotti und Kollegen verwendeten hPL für die Kultivierung von HUVEC und führten unter anderem Assays zur Proliferation, Vitalität und der Angiogenese durch. Die Proliferation und Vitalität wurde konzentrationsabhängig gesteigert. Ab 10% hPL im Kulturmedium im Vergleich zum Kulturmedium, welches 20% FCS enthielt, konnte bereits eine gesteigerte Vitalität und Proliferation nachgewiesen werden. Bei dem Assay zur Testung der *in vitro*-Angiogenese konnten im Vergleich zum Kulturmedium, welches 20% FCS enthielt, vergleichbare Ergebnisse erreicht werden, wenn dem Medium 20% hPL hinzugefügt wurde (48). hPL wurde auch erfolgreich zur Kultivierung von *corneal endothelial cell* (CEC) eingesetzt. Dabei verglichen die Autoren Kulturmedium, welches mit 20% FCS oder 20% hPL supplementiert wurde. Die Zellmorphologie veränderte sich unter dem Einfluss von hPL nicht und steigerte sogar die Proliferationsrate signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit 20% FCS (50).

Im Bereich der Ophthalmologie ist hPL ein vielversprechender Kandidat zur Behandlung von Erkrankungen am Auge. Widyaningrum und Kollegen führten Versuche mit humanen CEC durch und untersuchten dabei den Einfluss von hitzebehandeltem humanem Thrombozytenlysat (HHPL) auf die Proliferationsrate, die Zellmigration und den protektiven Effekt gegen TBHP-induzierten oxidativen Zellstress. Als Kontrolle dienten Zellen, welche in Serum-freiem Medium kultiviert wurden. Die Behandlung mit 5% HHPL förderte die Proliferationsrate signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Um die Wundheilung *in vitro* zu untersuchen, wurden *wound healing*-Assays durchgeführt. Hier konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Wundheilung *in vitro* unter dem Einfluss von 5% HHPL beobachtet werden, im Vergleich zur Kontrolle mit Serum-freiem Medium. Die Zugabe von 0,25 mM TBHP induziert oxidativen Zellstress. Um Rückschlüsse auf einen möglichen protektiven Effekt von HHPL auf oxidativen Zellstress zu schließen, wurden die Zellen vor der Durchführung des Assays in 2% HHPL bzw. 5% HHPL kultiviert. Als

Kontrolle dienten erneut Zellen, welche in Serum-freiem Medium kultiviert wurden. Die Behandlung mit 2% HHPL und 5% HHPL förderte das Zellüberleben signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Dies spiegelt den protektiven Effekt von HHPL auf oxidative Zellstress wieder (51).

In der Literatur gibt es zahlreiche Protokolle zur Herstellung von hPL und Beispiele für die vielfältige und erfolgreiche Anwendung. Dabei wurde hPL nicht nur zur Kultivierung von Zellen eingesetzt, sondern ebenfalls zur Kryokonservierung. Kulturmedium, welches zur Kryokonservierung von Zelle verwendet wird, enthält häufig 10% oder 20% FCS (10). Myeloische Leukämiezellen, K562, wurden in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kryokonserviert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen aufgetaut und waren vital. Zusätzlich ist es möglich Versuche zur Acetylierung durchzuführen, wenn die Zellen vorher in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kultiviert wurden (52). Der Einsatz von Thrombozytenderivaten hat auch Einzug in klinische Studien am Menschen genommen. So wurde es erfolgreich zur Behandlung von symptomatischem oralem Lichen planus eingesetzt (53), Schmerzen bei Lateraler Epicondylitis konnten verringert werden (54) und es wirkte sich positiv auf die Behandlung der Osteonekrose am Kiefer aus (55).

## **2.3 Thrombozyten**

### **2.3.1 Grundlagen**

Thrombozyten sind kleine, flache, kernlose Zellfragmente und werden daher auch als Blutplättchen bezeichnet. Die Anzahl im menschlichen Körper beträgt ca. 150.000-400.000/ $\mu$ l Blut. Sie entstehen durch die Abschnürung von Megakaryozyten im Knochenmark und haben eine Größe von 1-4  $\mu$ m im Längsdurchmesser und sind 0,5-0,75  $\mu$ m dick. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt 5-11 Tage und anschließend werden sie in Lunge, Leber und Milz abgebaut. Ihre primäre Aufgabe besteht in der primären Hämostase. Durch eine Verletzung an Blutgefäßen werden subendotheliale Strukturen freigelegt. Hauptakteur ist der von-Willebrand-Faktor, ein oligomeres Glykoprotein. Durch den spezifischen Rezeptor an den Thrombozyten, den von-Willebrand-Rezeptor, bildet sich eine Art Brücke zwischen den Thrombozyten und dem

Kollagen. Durch die Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert und sie bilden Pseudopodien aus. Die aktivierten Thrombozyten senden Botenstoffe aus, was weitere Thrombozyten anlockt. Adenosindiphosphat (ADP), welches aus verletzten Zellen freigesetzt wird, bewirkt eine Konformationsänderung bestimmter Rezeptoren (Glykoproteine IIb und IIIa) auf der Oberfläche der Thrombozyten. Unterstützt wird diese Reaktion unter anderem durch Thrombin, Adrenalin und Serotonin. Die Konformationsänderung hat zur Folge, dass Fibrinogen daran binden kann und es werden zunehmend viele Thrombozyten verknüpft. Es bildet sich ein Thrombozytenpfropf, welcher auch als weißer Thrombus bezeichnet wird. Der weiße Thrombus ist nicht allzu stabil und kann allein größere Läsionen nicht abdichten. Erst durch die sekundäre Hämostase kommt es im nächsten Schritt zum endgültigen Verschluss der Gefäßläsion (56). Thrombozyten spielen nicht nur eine entscheidende Rolle bei der primären Hämostase, sondern auch bei Entzündungen, der Immunreaktion, bei der Regulierung des Gefäßtonus und der Wundheilung (57).

Morphologisch bestehen Thrombozyten aus einem zentralen Granulomer und einem peripheren Hyalomer. Das periphere Hyalomer enthält kontraktile Filamente und einen Ring aus Mikrotubuli. Seine Hauptaufgabe besteht in der Aufrechterhaltung der Zellform und der Ausbildung der Pseudopodien bei der Aktivierung. Das zentrale Granulomer enthält verschiedene Granulomtypen, die alpha-Granula, die dichte Granula und die Lysosomen. Die alpha-Granula ist die am häufigsten enthaltene. Sie hat einen Durchmesser von ca. 200-500 nm und enthält eine Vielzahl an Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Koagulationsfaktoren, fibrinolytischen Enzymen, Wachstumsfaktoren, Immunglobulinen und weiteren Proteinen. Die dichte Granula enthält unter anderem Calcium, Serotonin und ATP, ADP, GDP, GTP und Serotonin. Heparin spaltende Enzyme sind in den Lysosomen enthalten (57, 58). In der Tabelle 1 sind weitere Inhaltsstoffe der unterschiedlichen Granula aufgeführt.

Tabelle 1: Substanzen in den Thrombozytengranula (57-59)

Granula	Substanzen
$\alpha$ -Granula	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstumsfaktoren (bFGF, EGF, HGF, IGF-1, PDGF, TGF-<math>\beta</math>, VEGF)</li> <li>• Adhäsionsmoleküle (Fibronectin, Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor)</li> <li>• Chemokine (PF-4, <math>\beta</math>-Thromboglobulin, Interleukin 8)</li> <li>• prokoagulatorische Faktoren (Faktor V, Faktor XIII, Faktor XI, Matrixmetallproteinase, Kininogen, Kalzium)</li> <li>• antikoagulatorische Faktoren (Protein C, Protein S, Alpha-1-Antitrypsin, TFPI)</li> <li>• Komponenten des fibrinolytischen Systems (Plasminogen, Plasmin-Inhibitor, PAI-1)</li> <li>• Immunglobuline</li> </ul>
Dichte Granula	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADP (Adenosindiphosphat)</li> <li>• ATP (Adenosintriphosphat)</li> <li>• GDT (Guanosindiphosphat)</li> <li>• GTP (Guanosintriphosphat)</li> <li>• Calcium</li> <li>• Serotonin</li> <li>• Phosphat</li> <li>• Pyrophosphat</li> </ul>
Lysosomen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydrolytische Enzyme</li> </ul>

### 2.3.2 Wachstumsfaktoren von Thrombozyten

Thrombozyten enthalten eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren (Tabelle 1). Durch Wachstumsfaktoren kommunizieren Zellen untereinander und auf diese Weise können Informationen übertragen werden. In der Regel bindet der Wachstumsfaktor an einen spezifischen Rezeptor, wodurch eine Kaskade in Gang gesetzt wird. Man unterscheidet

parakrine von autokrinen Effekten. Parakrine Wachstumsfaktoren beeinflussen andere Zellen, wohingegen autokrine Wachstumsfaktoren Einfluss auf die eigene Zelle nehmen. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen (10, 56). Im Folgenden wird genauer auf die Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF, IGF-1, PDGF, *transforming growth factor- $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) und EGF eingegangen. Diese Wachstumsfaktoren sind in hPL enthalten ((60, 61) (MacoPharma, information sheets, 2017)) und spielen eine wichtige Rolle bei der Kultivierung von Endothelzellen (10, 14, 56, 62-72). Außerdem wird erklärt, wie die oben genannten Wachstumsfaktoren wirken, das heißt, es wird genauer auf den Prozess eingegangen, wenn einer dieser Wachstumsfaktoren an den entsprechenden Wachstumsfaktor-Rezeptor bindet. Durch ein besseres Verständnis über diesen Prozess sind die Abläufe auf zellulärer Ebene verständlicher und verdeutlichen, wieso hPL ein geeigneter Kandidat ist, FCS zur Kultivierung von Zellen im Rahmen des *Tissue Engineering* zu ersetzen.

### **2.3.3 Wachstumsfaktor-Rezeptoren**

Die meisten Rezeptoren für Wachstumsfaktoren sind enzymgekoppelte Rezeptoren, welche in der Zellmembran verankert sind. Der Ligand bindet an der extrazellulären Domäne, wodurch das katalytische Zentrum auf der cytosolischen Seite reguliert wird. Diese Art von Rezeptoren verfügt nicht über eine eigene Aktivität. Durch die Ligandenbindung werden intrazelluläre Enzyme aktiviert, wodurch Signale bis ins Zellinnere weitergeleitet werden. Es kommt zur Auslösung von Signalkaskaden, die Einfluss auf das Genexpressionsmuster im Zellkern nehmen. Auf diese Weise kommt es zu langanhaltenden Effekten wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose der Zelle.

Eine Großzahl der enzymgekoppelten Rezeptoren besitzen Tyrosin-Kinase-Aktivität. Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Rezeptordimerisierung, was zur Aktivierung des katalytischen Zentrums führt. Tyrosin-Kinase-Rezeptoren können Homodimere und Heterodimere bilden, was zu einer deutlichen Erhöhung der Signalvielfalt führt. Durch die Bindung des Liganden kommt es einerseits zur Aktivierung seiner Kinasedomäne, was allerdings nur von kurzer Dauer ist. Andererseits bringt die Dimerisierung nun zwei aktive Domänen in räumliche Nähe, was eine wechselseitige

Phosphorylierung von Tyrosinresten ermöglicht, und dadurch kommt es zur Autoaktivierung. An die nun phosphorylierten Reste können Proteine typischerweise mit SH2-Domänen binden, was zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege führt (73). Auf diese Weise wird zum Beispiel der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert. Über stufenweise Aktivierung der Kinasen Ras/Raf/MEK/ERK wird dieser Stoffwechselweg aktiviert, was zur Expression von Transkriptionsfaktoren führt, welche Einfluss auf die Zellproliferation, das Überleben und die Differenzierung von Zellen nehmen. Weitere Stoffwechselwege, welche ebenfalls Einfluss auf die Zellproliferation und das Überleben von Zellen nehmen, sind PLC $\gamma$ /PKC JAK/STAT und PI3K/AKT/mTOR (71, 73, 74).

#### **2.3.4 *Vascular endothelial growth factor***

VEGF ist ein homodimeres heparinbindendes Glykoprotein mit einer relativen Molekülmasse von 34-42kD (75). Es ist ein potenter Wachstumsfaktor für Endothelzellen, wirkt anti-apoptotisch und fördert die Proliferation. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und der Vaskulogenese. Beide Prozesse werden durch die proliferierende Wirkung auf die Endothelzellen und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch VEGF beeinflusst (56, 62). Man unterscheidet fünf verschiedene VEGF-Isoformen, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E sowie PlGF (Plazenta-Wachstumsfaktor). Insbesondere VEGF-A und seine unterschiedlichen Varianten spielen eine entscheidende Rolle bei der Angio- und Vaskulogenese durch ihren Einfluss auf das Endothel (62).

#### **2.3.5 *Fibroblasten Wachstumsfaktor***

Der Fibroblasten Wachstumsfaktor bFGF gehört zur Familie der FGF und wird auch als FGF-2 bezeichnet. Sie stellen eine Gruppe von heparinbindenden Proteinen dar, welche unterschiedlichen Einfluss auf das embryonale Wachstum ausüben (63). Insgesamt wurden mindestens 19 Proteine identifiziert, die zu den FGF zählen (76). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Zellteilung, der Embryonalentwicklung und der Wundheilung (63, 64). FGF-2 wird von den meisten Geweben exprimiert (77) und wirkt als potentes Mitogen auf mesodermale Zellen, wie die Endothelzellen (63). Es konnte gezeigt werden, dass sich FGF-2 positiv auf die Angiogenese ausübt (64) und durch

seinen Einfluss auf Epiblasten sich zu Endothelzellen zu differenzieren auch auf die Vaskulogenese (65).

### **2.3.6 *Insulin-like growth factor***

IGF-1 ist ein sehr potenter Wachstumsfaktor und wird von den meisten Geweben produziert und so auch von Thrombozyten. Durch die Bindung an den IGF-1-Rezeptor nimmt IGF-1 Einfluss auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung pränatal und auch postnatal. Des Weiteren spielt IGF-1 eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und bei der Wundheilung. Die Wirkung auf das Gefäßsystem wird sowohl durch endokrine als auch durch autokrine und parakrine Mechanismen vermittelt. In der Zellkultur wird es dem Medium durch den Zusatz von tierischem Serum, das IGF-1 enthält, zugesetzt und fördert die Angiogenese *in vitro* (10, 14, 66).

### **2.3.7 *Platelet-derived growth factor***

Die Wachstumsfaktoren, welche zur Familie der *Platelet-derived growth factor* gehören, setzen sich aus den vier Polypeptidketten: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D zusammen. Sie treten als Homodimere oder Heterodimere auf und so können insgesamt fünf dimere Isoformen unterschieden werden: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD (78). Sie wirken als starkes Mitogen auf Fibroblasten und Zellen mesenchymalen Ursprungs und spielen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung. Im hämatopoetischen System wird PDGF von Megakaryozyten produziert und in der alpha-Granula von Thrombozyten gespeichert, hier liegt zumeist die Isoform PDGF-AB vor. Bei der Aktivierung von Thrombozyten wird PDGF-AB freigesetzt und durch den Einfluss auf Bindegewebszellen trägt dieser Prozess zur Wundheilung bei. Es konnte gezeigt werden, dass sich PDGF-B positiv auf die Wundheilung auswirkt und wurde deshalb als Inhaltsstoff in einem Gel zur topischen Behandlung von diabetischen Ulcera kommerziell vermarktet. Des Weiteren nehmen die Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Angiogenese durch die Wirkung auf Perizyten (67).

### **2.3.8 Transforming growth factor- $\beta$ 1**

*Transforming growth factor- $\beta$ 1* ist ein 25 kD großes, dimeres Protein, welches aus zwei Untereinheiten besteht, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Es werden drei Isoformen unterschieden, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, die sich in ihrer biologischen Funktion sehr ähneln. Nahezu alle humanen Zellen produzieren TGF- $\beta$ 1 und besitzen entsprechende Rezeptoren, Thrombozyten und Endothelzellen eingeschlossen. Die Aufgaben von TGF- $\beta$ 1 sind vielfältig. Es spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Angiogenese, der embryonalen Entwicklung, dem Zellwachstum und der Differenzierung von Zellen. Durch seine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, T-Zellen, Monozyten und Fibroblasten nimmt es eine zentrale Rolle bei der Wundheilung ein. Eine weitere wichtige Aufgabe besteht in der Regulation der Ausschüttung von anderen Wachstumsfaktoren, wie PDGF, FGF, TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 (68, 69). *In vitro* inhibiert TGF- $\beta$ 1 die Zellmigration sowie die Proliferation und fördert die Apoptose von Endothelzellen. Durch diese Wirkung auf die Endothelzellen *in vitro* stellt TGF- $\beta$ 1 einen Gegenspieler von VEGF dar. Während der Angiogenese ist Apoptose ein wichtiger Bestandteil. Ist dieser Prozess gestört oder wird inhibiert, resultiert dies in abnormal geformten Gefäßen (70).

### **2.3.9 Epidermal growth factor**

Der *epidermal growth factor* ist ein in der  $\alpha$ -Granula vorkommendes Polypeptid aus 53 Aminosäuren. Er gehört zu einer großen Familie von Peptiden, welche mit unterschiedlicher Affinität an den komplexen *epidermal growth factor receptor* (EGFR) binden. EGF spielt eine bedeutende Rolle bei der Wundheilung und wirkt mitogen auf Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen (71). EGF spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* und ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Proliferation von Endothelzellen. Bertrand-Duchesne und Kollegen konnten *in vitro* eine dosisabhängige Steigerung der Proliferation von HUVEC unter dem Einfluss von EGF nachweisen (72).



## 2.4 Herstellung von Thrombozytenlysat

### 2.4.1 Ausgangsmaterial

Humanes Thrombozytenlysat wird aus Thrombozytenkonzentraten hergestellt. Im klinischen Alltag ist die Gabe von Thrombozytenkonzentraten indiziert bei schwerer Thrombozytopenie infolge einer thrombozytären Bildungsstörung sowie zur Unterstützung der Blutkoagulation bei Patienten unter Chemotherapie. Thrombozytenkonzentrate können auf unterschiedliche Weise gewonnen werden, zum einen aus Vollblutspenden oder durch Aphaese (79). Im Folgenden wird auf die Gewinnung und den Herstellungsprozess von Thrombozytenkonzentraten eingegangen.

Bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblutspenden gibt es zwei gängige Verfahren, die angewendet werden. Zum einen können die Konzentrate aus *Buffy Coats* (BC-Methode) gewonnen werden, zum anderen aus plättchenreichem Plasma (PRP-Methode). In Europa, insbesondere in Deutschland, wird fast ausschließlich die BC-Methode angewendet, wohingegen in der USA die RPR-Methode bevorzugt wird (80).

Bei der BC-Methode entsteht ein Pool-Thrombozytenkonzentrat über die Zwischenstufe *Buffy Coat*. Bei der Herstellung eines *Buffy Coat* wird Vollblut hochtourig zentrifugiert und die Bestandteile aufgrund der Dichte aufgetrennt. Als *Buffy Coat* wird die dünne Schicht zwischen der roten Schicht aus Erythrozyten und der klaren Schicht, dem Blutplasma, bezeichnet. Es enthält Thrombozyten und Leukozyten. Die *Buffy Coats*, welche von Spendern kommen, die die gleiche ABO-Blutgruppe haben, werden zusammengeführt und mit Plasma oder Additivlösung für Thrombozyten in einem sogenannten Poolingbeutel vermischt. Anschließend erfolgt eine weitere Zentrifugierung und die Thrombozyten werden von den anderen Blutzellen getrennt. Um die restlichen Leukozyten zu entfernen, kommt ein Leukozytendepletionfilter zum Einsatz. Der Vorteil dieses Verfahrens ist der geringe Gehalt an Leukozyten im Thrombozytenextrakt. Bei dem Verfahren werden mehrere *Buffy Coats* von unterschiedlichen Spendern zusammengeführt, wobei die Anzahl variiert. Meist kommen vier bis sechs *Buffy Coats* zum Einsatz. Im Mittel wird eine Anzahl von  $3 \times 10^{11}$  Thrombozyten/ml angestrebt und vier

*Buffy Coats* genügen in der Regel, um dies zu erreichen. Wenn der Hersteller eine höhere Anzahl anstrebt, kommen dementsprechend mehr *Buffy Coats* zum Einsatz (80, 81).

Bei der PRP-Methode wird Vollblut langsam zentrifugiert, wobei ein Erythrozytenkonzentrat und ein plättchenreiches Plasma entsteht. Bei einer zweiten hochtourigen Zentrifugierung werden die Thrombozyten vom Plasma getrennt. Das Resultat ist plättchenarmes Plasma (*platelet poor plasma*, PPP) und ein Thrombozytenpellet. Das entstandene Pellet wird in einem kleinen Anteil des PPP resuspendiert (81).

Eine weitere Möglichkeit Thrombozytenkonzentrate herzustellen ist die Apharesespende. Thrombozytenkonzentrate, welche durch Apharese gewonnen werden, stammen von einem einzigen Spender. Schon während der Spende wird das Blut mit Hilfe eines Zellseparators aufgetrennt und die Thrombozyten werden in Plasma aufgefangen. Der Rest der Spende wird dem Spender zurückgegeben. Vorteil in diesem Verfahren liegt darin, dass mit einer einzigen Spende größere Mengen an Thrombozyten gewonnen werden können und der Empfänger nur mit Antigenen eines Spenders exponiert wird (80).

## **2.4.2 Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Thrombozytenkonzentraten**

Thrombozyten enthalten, wie oben beschrieben, eine hohe Anzahl an Wachstumsfaktoren in ihren Granula gespeichert. Um diese freizusetzen ist ein vollständiges Aufbrechen beziehungsweise Degranulation notwendig. Es gibt verschiedene Techniken, um dies zu erreichen, welche in vier Kategorien eingeteilt werden können (46). Im Weiteren wird auf die verschiedenen Methoden eingegangen. In der Praxis hat sich das Verfahren, welches Wachstumsfaktoren durch wiederholtes Einfrieren und wieder Auftauen freisetzt, durchgesetzt.

### **2.4.2.1 Wiederholtes Einfrieren und Auftauen**

Eine sehr gängige und kosteneffiziente Methode ist das wiederholte Einfrieren und wieder Auftauen von Thrombozytenkonzentraten, um die Granula aufzubrechen und die Wachstumsfaktoren dadurch freizusetzen. Die Thrombozyten werden bei dieser Methode schockgefroren, meist bei  $-30^{\circ}\text{C}$  oder  $-80^{\circ}\text{C}$ , und anschließend in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen

Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wird einmalig oder mehrfach durchgeführt, je nach Protokoll (46). Man findet in der Literatur Protokolle in denen ein (46), zwei (82), drei (83) oder sogar fünf (84) Durchgänge durchgeführt werden, um die optimale Konzentration von Wachstumsfaktoren im hPL zu erhalten. Die Autoren sind sich diesbezüglich also nicht einig und es gibt kein Standardprotokoll.

Strandberg und Kollegen haben sich mit dieser Problematik auseinandergesetzt und konnten zeigen, dass man die Wachstumsfaktoren und Chemokine einzeln betrachten muss. Die Konzentration der einzelnen Inhaltsstoffe unterscheidet sich, je nachdem wie oft die Thrombozyten eingefroren und wieder aufgetaut werden. Die Konzentration von PF-4 verdoppelte sich fast zwischen drei und 30 Durchgängen. Die maximale Konzentration von TGF- $\beta$ 1 wurde hingegen zwischen drei und fünf Durchgängen erreicht und sank bei weiteren Wiederholungen wieder etwas ab. Eine zu hohe Anzahl an Zyklen kann zu einem Absinken der Konzentration führen (85). Zu ähnlichen Ergebnissen kam Zimmermann und Kollegen bei dem Vergleich verschiedener Verfahren die Wachstumsfaktoren freizusetzen (86).

#### **2.4.2.2 Aktivierung der Thrombozyten**

Die Wachstumsfaktoren können auch durch Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Thrombozyten zu aktivieren. Zum einen kann dem Thrombozytenkonzentrat Calciumchlorid hinzugefügt werden. Auf diese Weise kommt es zur endogenen Thrombinaktivierung, es induziert die Fibrinpolymerisation und es kommt zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren (46, 87). Eine andere Möglichkeit Thrombozyten zu aktivieren ist, dem Thrombozytenkonzentrat humanes Thrombin hinzuzufügen (88).

#### **2.4.2.3 Verwendung von Schall**

Eine weitere Möglichkeit Wachstumsfaktoren aus Thrombozyten freizusetzen ist die Verwendung von Schall. Dies kommt entweder allein oder in Kombination mit wiederholtem Einfrieren und wieder Auftauen zum Einsatz oder in Kombination mit

Calciumchlorid. Der Vorteil bei der Verwendung von Schall ist die kurze Durchführungszeit (46, 89, 90).

#### **2.4.2.4 Solvent-Detergent-Verfahren**

Die Verwendung von Lösungsmittel zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten zeichnet sich zum einen dadurch aus, dass es sehr effizient ist, des Weiteren bringt es den Vorteil, dass auf diese Weise lipid-umhüllte Viren abgetötet werden (91). Bei diesem Verfahren kommt üblicher Weise TNBP (Tri-n-butyl-phosphat) und Triton X-45 zum Einsatz. In einem Beutel wird das Thrombozytenkonzentrat mit TNBP und Triton X-45 in einem Verhältnis 1/1 versetzt, um eine Endkonzentration von 1% TNBP und 1% Triton X-45 zu erreichen. Im nächsten Schritt wird der Mixtur Sojaöl in einer Konzentration von 10% (Vol./Vol.) hinzugefügt, der Beutel wird 1 Minute lang kräftig geschüttelt und dann für 15 Minuten auf einen rotierenden Schüttler gestellt. Nach 20 Minuten entstehen 2 Schichten und die untere Schicht, welche die Thrombozyten und die daraus freigesetzten Wachstumsfaktoren enthält, wird mit Hilfe der Schwerkraft in einen neuen Beutel überführt. Diese Ölextraktion wird weitere zweimal wiederholt, um TNBP und Triton X-45 auf weniger als 10 bzw. 100 p.p.m. zu reduzieren. Burnouf und Kollegen konnten zeigen, dass dieses Verfahren effizient Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten freisetzt (46, 91).

## 2.5 Zielsetzung

Das Gebiet des *Tissue Engineering* gewinnt im Bereich der Regenerativen Medizin immer größere Bedeutung. In der Gynäkologie, in der angeborene Fehlbildungen oder Traumata zu großen chirurgischen Eingriffen mit erheblichen Gewebeverlust führen, kann der Einsatz von autologen Zellen auf einem geeigneten Biomaterial enorme Vorteile für den Patienten bringen.

Wie in der Einleitung dargelegt, konnte in der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Brenner durch den Einsatz von Endothelzellen und die Verwendung von FCS-haltigem Medium erfolgreich ein prävaskuliertes Mundschleimhautäquivalent gezüchtet werden. Die Kultivierung der Zellen in Wachstumsmedium, welches FCS enthält, stellt allerdings ein Problem dar. Auf diese Weise können Krankheiten auf den Empfänger übertragen werden und es kann zu allergischen Reaktionen kommen. Des Weiteren ist die Verwendung aus rechtlicher und ethischer Sicht problematisch. Aus diesem Grund wird stetig nach Alternativen gesucht und die Verwendung von hPL stellt einen vielversprechenden Ansatz dar.

Ziel dieser Arbeit war es Endothelzellen ohne den Einsatz von FCS zu kultivieren und stattdessen hPL zu verwenden. Es wurde zunächst analysiert, wie sich die Verwendung von hPL auf die Zellmorphologie, die Proliferation und die Vitalität ausübt. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob Endothelzellen ihr spezifisches Verhalten, sich zu gefäßähnlichen Strukturen zu organisieren, unter der Verwendung von hPL beibehalten.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Aqua dest.	Braun, Melsungen
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, USA
Calcein-AM (1 mg/ml)	Thermo-Fisher, USA
DMEM	Sigma-Aldrich, USA
DPBS	Gibco, USA
Ethanol absolute, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Sigma-Aldrich, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Thermo-Fisher, USA
Gelatin solution	Sigma-Aldrich, USA
HEPES, 1M	Sigma-Aldrich, USA
Isopropylalkohol p.a.	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Kollagenase II	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium Heparin	Sigma-Aldrich, USA
Matrigel, 126-2.50	Cell Applications, San Diego, USA
Medium 199 (M199), M7528	Sigma-Aldrich, USA
MTT	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Thermo-Fisher, USA
Terralin liquid	Schülke, Norderstedt
Trypsin-EDTA, 0,25 %	Sigma-Aldrich, USA

#### 3.1.2 Lösungen und Puffer

MTT: 0,5 % MTT in DPBS

Kollagenase II-Puffer: 3,9 g NaCl  
 0,5 g KCl  
 2,4 g HEPES (1M)  
 0,7 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O  
 pH 7,2 einstellen, ad 1 mit VE-Wasser

Kollagenase II-Lösung: 1 g Kollagenase II in Kollagenase II Puffer

### 3.1.3 Kits

**Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche Diagnostics, Mannheim**

BrdU labeling reagent (1:100 in DBPS verdünnt)

FixDenat (Ready-to-use)

Anti-BrdU-POD (1:100 mit Antibody Dilution Solution verdünnt)

Antibody dilution solution

Washing buffer (1:10 mit DPBS verdünnt)

Substrate solution (ready-to-use)

### 3.1.4 Medien

Vollmedium: + Kulturmedium M199  
+ 20 % FCS  
+ 1 % P/S  
+ 25 µg/ml ECGS  
+ 25 µg/ml Natriumheparin  
+ 28 mM HEPES

FCS-freies Medium: + Kulturmedium M199  
+ 1 % P/S  
+ 25 µg/ml ECGS  
+ 25 µg/ml Natriumheparin  
+ 28 mM HEPES

#### 3.1.4.1 *Humanes Thrombozytenlysat*

MultiPL'30

MultiPL'100

ml-hPL

MacoPharma International GmbH

MacoPharma International GmbH

zur Verfügung gestellt aus dem Max-Planck-Institut  
für Polymerforschung, Mainz

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Geistlich Bio-Gide®	Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz
µ-Slide Angiogenesis	Ibidi, Madison, USA
Cellstar Cell Culture Plate (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einmalhandschuhe Nitril Sempercare	Semperit, Wien, Österreich
Einmalhandschuhe Nitril Supreno	Microflex, Chemnitz
Einmalskalpelle (No. 23)	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Japan
Einmalspritze BD Discardit II (10 ml)	BD Biosciences, USA
LUNA™ Cell Counting Slides	logos Biosystems, Südkorea
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl)	StarLab, Hamburg
Polypropylen (PP)-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5, 1 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (100 mm x 20 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Butterfly, Venofix® A Punktionskanüle	B. Braun Melsungen AG

### 3.1.6 Gebrauchsmaterialien

Mehrkanalpipetten Eppendorf Research Plus (10-100 µl, 30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Brand, Wertheim

### 3.1.7 Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator	Hera Cell 240 Heraeus, Hanau
Cellspin®/THARMACspin Zytozentrifuge	THARMAC Cellspin®, Waldsolms
Computer	Dell, Round Rock, USA
Digitalmikroskop VHX-1000	Keyence, Japan
Eismaschine	Ziegra, Hannover



Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80 °C	Nalge Nunc Int, Penfield, USA
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
LUNA™ Automated Cell Counter	logos Biosystems, Südkorea
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Scientific, USA
Vakuumpumpe Mini-Vac Power	PeqLab, Erlangen
Vortex VF2	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad AquaLine AL18	Lauda, Lauda-Köngishofen
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
GloMax®-Multi Detection System	Promega

### 3.1.8 Computerprogramme

Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft Office 2010 & 2013	Microsoft, Redmond, USA
Photoshop CS5	Adobe Systems, USA

### 3.1.9 Zellen

Die HUVEC wurden aus Nabelschnüren isoliert, welche von der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit von freiwilligen Spenderinnen zur Verfügung gestellt wurden. Nach der Geburt wurde das Kind abgenabelt, anschließend die Nabelschnur von der Plazenta abgetrennt und in ein steriles Gefäß mit Transportmedium (DMEM-P/S) überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie so bei 4°C gelagert. Alle Nabelschnüre wurden innerhalb von 24 h weiterverarbeitet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Steriles Arbeiten

Die Isolation der humanen Zellen sowie die Zellversuche und Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen an der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Gebrauchsmaterialien wurden mit Hilfe von UV-Strahlung, Hitze oder Alkohol sterilisiert.

Verbrauchsmaterialien wurden autoklaviert, steril geliefert oder auf gleiche Weise sterilisiert. Vor der Benutzung der benötigten Medien oder Reagenzien wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und die Gefäße mit Terralin liquid oder 70% Ethanol gereinigt.

### **3.2.2 Isolation primärer Zellen**

Die HUVEC wurden aus humanen Nabelschnüren isoliert. Für die Isolation wurde das Transportmedium entfernt und die Nabelschnur mit PBS gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Anschließend wurden diese in eine Petrischale überführt. Mit Hilfe von Ethanol wurde die Nabelschnur von außen nochmal gereinigt. Um eine bessere Sicht auf die in der Nabelschnur verlaufenden Gefäße zu bekommen, wurden die Enden mit einem Skalpell sauber abgeschnitten. Nachdem die Nabelschnurvene klar identifiziert worden war, wurde diese vorsichtig mit Hilfe eines *Butterflys* punktiert. Die Nadel mit der darüber liegenden Schutzhülle wurde vorsichtig in die Vene vorgeschoben und mit einer Klemme fixiert. Die Vene wurde mit Hilfe einer Spritze mehrfach mit PBS gespült, bis die Flüssigkeit klar aus der Vene floss. Das andere Ende wurde dann mit einer weiteren Klemme versehen und die Vene mit Kollagenase-II-Lösung befüllt. Damit die Lösung sicher in der Vene verblieb, wurde die Spritze an dem Adapter der Spritze belassen. Die Nabelschnur wurde in eine neue, saubere Petrischale gelegt und für 15 min in den Inkubator gestellt. Nach der Inkubation erfolgte eine vorsichtige Massage der Nabelschnur, um möglichst viele Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Die Klemme am distalen Ende wurde gelöst und die Lösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß abgelassen. Es erfolgte eine weitere Spülung mit ca. 20 ml Medium 199. Die Flüssigkeit wurde abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium 199 gelöst und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, um tote Zellen und Gewebereste zu entfernen. Anschließend wurde 5 ml frisches Medium in die Flasche gefüllt. In der Regel dauerte es weitere 48 h bis die Zellen konfluent gewachsen waren und die erste Splittung in einem Verhältnis 1:3 durchgeführt werden konnte.

### **3.2.3 Mediumwechsel und Splitten der Zellkultur**

Um einen Mediumwechsel durchzuführen, wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurde neues Vollmedium hinzugegeben. Im Anschluss wurde so viel Trypsin in die Flasche gegeben, dass sich lediglich ein dünner Film auf den adhären Zellen befand. Nach 30 Sekunden im Inkubator bei 37°C wurden die Zellen durch vorsichtiges Beklopfen zusätzlich mechanisch gelöst. Die Reaktion wurde mit Vollmedium gestoppt und die gelösten Zellen in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Vollmedium gelöst. Die Zellen wurden stets in einem Verhältnis 1:3 gesplittet. Die HUVEC wurden für die Versuche bis Passage vier verwendet.

### **3.2.4 Beurteilung der Zellmorphologie**

Um die Zellmorphologie unter dem Einfluss von hPL zu beurteilen, wurden HUVEC wie oben beschrieben abgelöst und in einer Konzentration zu je 40.000 Zellen/Well in Vollmedium in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium vorsichtig entfernt und gegen hPL-haltiges Medium ausgetauscht. Die ausgetesteten Konzentrationen waren wieder 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8% und 10%. Als Kontrolle dienten Zellen in Vollmedium. Nach 24 h, 72 h und nach 7 Tagen wurden Fotos unter dem Mikroskop mit dem Programm von Lableica angefertigt. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt.

### **3.2.5 Vitalitätsassay**

Zur Analyse der Zellvitalität unter dem Einfluss von hPL in verschiedenen Konzentrationen wurden MTT-Vitalitätsassays durchgeführt. Hierfür wurden die Wells von 96-Well-Platten mit je 60 µl 0,2 % Gelatine-Lösung beschichtet. Nach 24 h wurde die Lösung entfernt und HUVEC zu je 5000 Zellen/Well in 100 µl Vollmedium ausplattiert. Nach einer Inkubation von 24 h im Zellkulturinkubator erfolgte die Behandlung mit dem hPL. Dazu wurde das Vollmedium vorsichtig abgesaugt und hPL in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8%, 10% in FCS-freiem Medium gelöst, wobei immer eine

Gesamtmenge von 100 µl in jedes Well gegeben wurde. Als Referenz wurden Zellen mit Vollmedium behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h im Zellkulturinkubator erfolgte schließlich der MTT-Vitalitätsassay. Es wurden 20 µl 0,5 % MTT-Lösung pro Well zugegeben und die Platte für 4 h im Inkubator inkubiert. Während der Inkubation wird das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) von vitalen Zellen zu dem blauen wasserunlöslichen Formazan reduziert. Anschließend wurde die MTT-haltige Lösung entfernt und 100 µl Isopropanol pro Well hinzugegeben. Dadurch wurde der umgesetzte Farbstoff aus den Zellen gelöst. Es wurde darauf geachtet, dass die Lösung in jedem Well gut resuspendiert wurde. Es folgten weitere vier Stunden im Inkubator, bevor die Extinktion mittels GloMax®-Multi Detection System gemessen wurde. Dabei wurde eine Wellenlänge von 570 nm, Referenzlänge: 650 nm genutzt. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

### **3.2.6 Bestimmung der Proliferation**

Zur Bestimmung der Proliferation der HUVEC unter dem Einfluss von hPL in unterschiedlichen Konzentrationen wurden BrdU-Proliferationsassays mit dem Cell Proliferation ELISA BrdU Kit der Firma Roche durchgeführt. Bei diesem Verfahren bauen proliferierende Zellen anstelle von Thymin BrdU in ihre DNA ein, was durch eine Antikörper-vermittelte enzymatische Reaktion nachgewiesen werden kann. Analog zum MTT-Vitalitätsassay wurden 96-Well-Platten mit je 60 µl 0,2 % Gelatine-Lösung beschichtet und die Lösung vor dem Ausplattieren wieder entfernt. Es wurden ebenfalls 5000 HUVEC/Well in je 100 µl in Vollmedium ausplattiert und 24 h im Zellinkubator inkubiert. Nach 24 h wurde das Vollmedium entfernt und durch FCS-freies Medium ausgetauscht, welches mit hPL in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8%, 10% versetzt wurde. Erneut wurden die Zellen für 72 h im Zellinkubator gelagert. Als Referenz wurden Zellen mit Vollmedium behandelt. Im Anschluss wurden 10 µl/Well BrdU-Labeling-Solution (1:100 in DPBS verdünnt) zugegeben und die Platten für 2 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurden die Überstände mit Hilfe einer Pipette abgesaugt, verworfen und je 200 µl/Well Fix-Denat-Lösung zur Denaturierung und Fixierung der Zellen hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Danach wurden erneut die Überstände mit einer Pipette

abgesaugt und verworfen. In jedes Well wurden dann 100 µl/Well BrdU-Antikörper-Lösung (Anti-BrdU-POD 1:100 verdünnt in *Antibody Dilution Solution*) hinzugefügt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen mit 200 µl/Well Waschlösung (1:10 in DPBS verdünnt) gewaschen. Dies wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Es folgte die Inkubation mit 100 µl/Well Substratlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Das Substrat wird durch die Peroxidase, die an den Antikörpern gekoppelt ist, umgesetzt und bewirkt eine Farbreaktion. Es kommt zu einem Farbumschlag von gelb zu blau. Um diese Reaktion zu stoppen, wurden 25 µl/Well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzugegeben. Die Überstände wurden für eine Minute bei Raumtemperatur geschüttelt und die Extinktion wurde im Anschluss mit Hilfe GloMax®-Multi Detection System gemessen. Dabei wurde eine Wellenlänge von 450 nm, Referenzlänge 650 nm genutzt. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel.

### **3.2.7 Tube-Formation-Assay**

Zur Durchführung des *Tube-Formation-Assay* wurden die HUVEC zuvor für 72 h in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kultiviert. Als Kontrolle dienten erneut Zellen, welche in Vollmedium kultiviert wurden. Nach der Inkubation erfolgte die Durchführung des Assays. Dazu wurde Matrigel bei 4°C auf Eis langsam über Nacht aufgetaut. In die Angioslides wurden jeweils 15 µl des Matrigels vorsichtig pipettiert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstanden. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 4°C für 10 Minuten, bevor sie für 30 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert wurden. Die HUVEC wurden durch die schon beschriebene Methode abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in hPL-haltigem Medium, welches die entsprechende Konzentration an hPL enthielt, gelöst und die Zellen gezählt. In jedes Angioslide wurden 9000 Zellen in einem Volumen von 50 µl Medium pipettiert. Nach einer Inkubation von 4,5 h im Zellinkubator bei 37°C erfolgte die Auswertung. Dazu wurde pro Well 1 µl Calcein pipettiert, welches für 5-10 Minuten inkubieren musste. Im Anschluss konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop Fotos mit dem Programm von Lableica angefertigt werden. Da es nicht möglich war, das ganze Well in einem Foto darzustellen, entstanden pro Well mehrere Einzelfotos. Diese wurden dann im Anschluss mit Hilfe des Programms

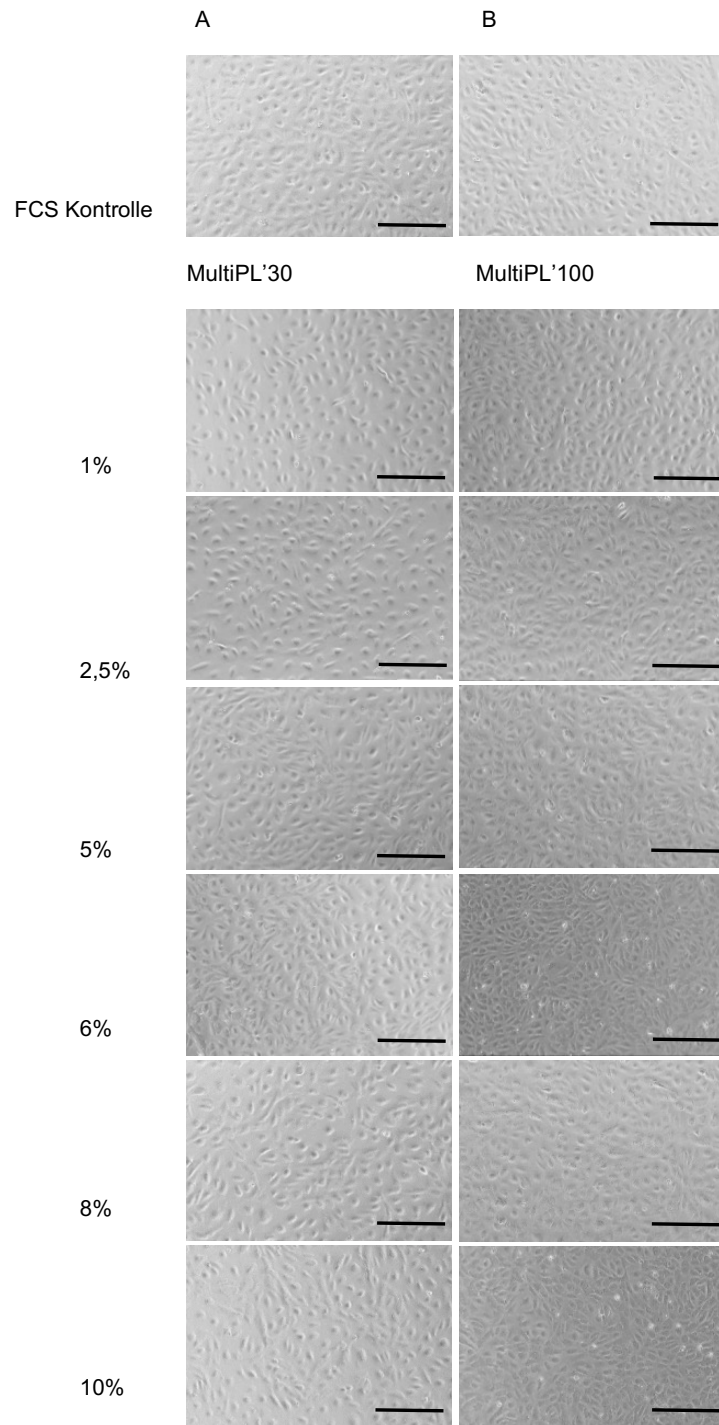
Photoshop von der Firma Adobe zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Auf diese Weise entstand ein Bild, welches das ganze Well darstellt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Zellmorphologie von HUVEC unter dem Einfluss von humanem Thrombozytenlysat**

Um die Zellmorphologie von HUVEC unter dem Einfluss von hPL zu beurteilen, wurden HUVEC in hPL-haltigem FCS-freiem Medium für insgesamt sieben Tage kultiviert. Bei diesem Versuch wurden die beiden Thrombozytenlysate der Firma MacoPharma International GmbH MultiPL´30 und MultiPL´100 ausgetestet, jeweils in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8% und 10%. Als Kontrolle wurden Zellen in Vollmedium unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt. Nach 24 h, 72 h und nach 7 Tagen wurden Fotos mit dem Programm vom Lableica angefertigt.

Unter dem Einfluss von MultiPL´30 und MultiPL´100 konnten keine Veränderungen der Morphologie beobachtet werden im Vergleich zur Kontrolle (Abb.1). Auch die Behandlung mit 1% hPL bewirkte keinen Zellstress und die HUVEC behielten ihre spezifische ovale Form. Ab einer Konzentration von 5% hPL bei beiden getesteten Thrombozytenlysaten erreichten die Zellen eine Konfluenz nach 72 h. Bei der Verwendung von 1% und 2,5% war dies erst zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten.



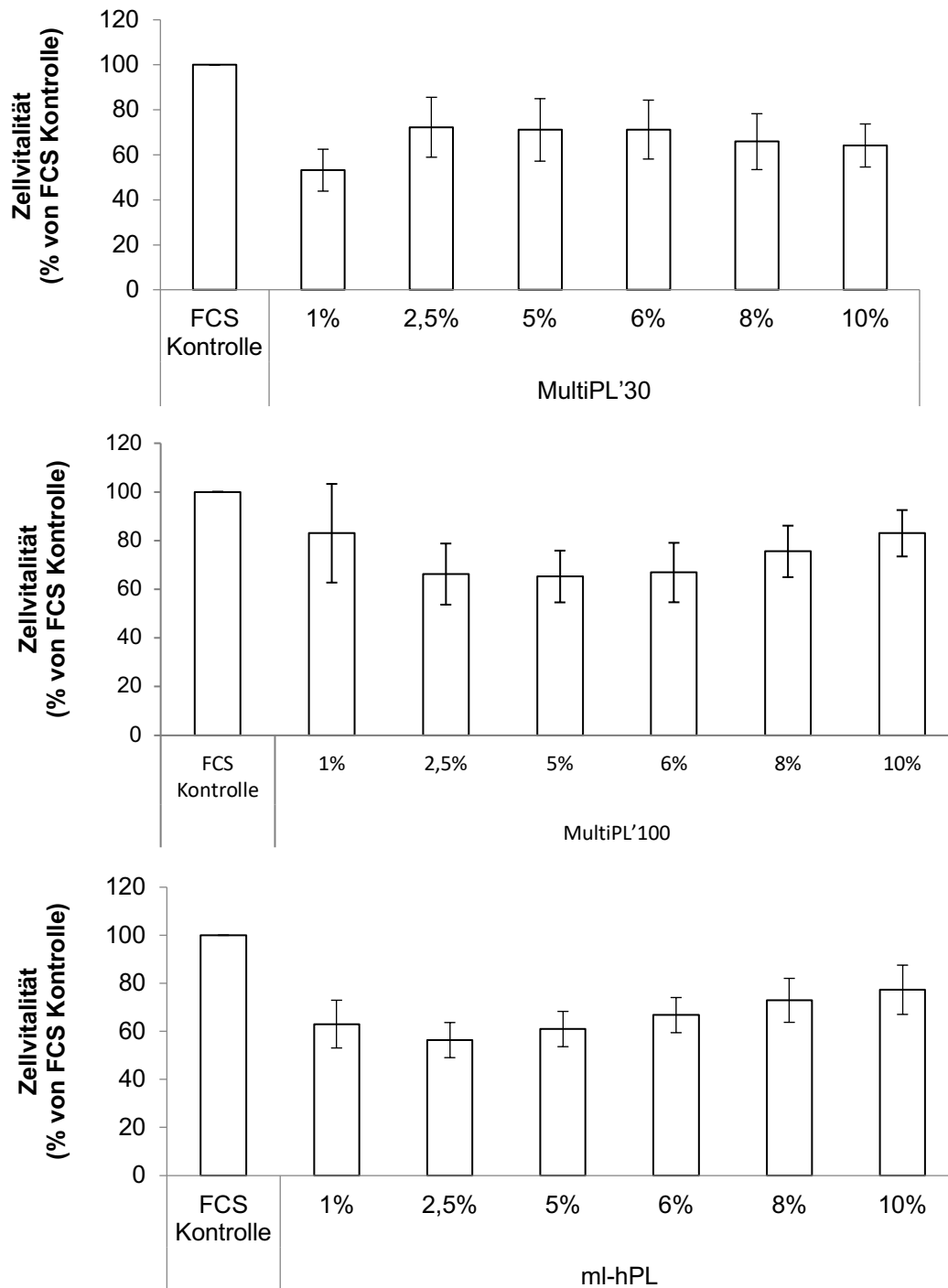
**Abbildung 1: Zellmorphologie von HUVEC unter dem Einfluss von entweder Kulturmedium mit 20% FCS oder von zwei verschiedenen humanen Thrombozytenlysaten (MultiPL'30, MultiPL'100) in verschiedenen Konzentrationen.** HUVEC wurden mit einer Dichte von 4000 Zellen/Well in 12-Well-Platten kultiviert. Dem Medium wurde entweder 20% FCS, MultiPL'30 (A) oder MultiPL'100 (B) in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Bilder nach 72 h. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Der Messbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Wirkung von humanem Thrombozytenlysat auf die Vitalität von HUVEC

Zur Beurteilung der Vitalität von HUVEC unter dem Einfluss von hPL, wurden MTT-Vitalitätsassays durchgeführt. Die Zellen wurden für 72 h in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kultiviert, bevor die Vitalität mittels dem Assay untersucht wurde. Es wurden MultiPL´30, MultiPL´100 und ml-hPL ausgetestet, jeweils in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8% und 10%. Als Kontrollwert wurden HUVEC gleichzeitig dem Assay unterzogen, welche in Vollmedium kultiviert wurden. Der Kontrollwert wurde als 100% Vitalität definiert.

Die Vitalität verringerte sich leicht unter dem Einfluss von MultiPL´100, im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 2). Ab 2,5% MultiPL´100 wurde die Vitalität konzentrationsabhängig gesteigert, das Niveau von FCS-haltigem Medium wurde nicht erreicht. Bei der Verwendung von MultiPL´30 wurde der höchste Wert der Vitalität bereits bei 2,5% erreicht mit 72% (Abb.2). Die Vitalität war leicht verringert bei der Verwendung von 1% und 10% MultiPL´30. Die Behandlung mit ml-hPL bewirkte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Vitalität ab 2,5% mit dem höchsten Wert bei 10% ml-hPL mit 77% (Abb.2). Die Vitalität reduziert sich jedoch insgesamt unter dem Einfluss von ml-hPL ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb.2).



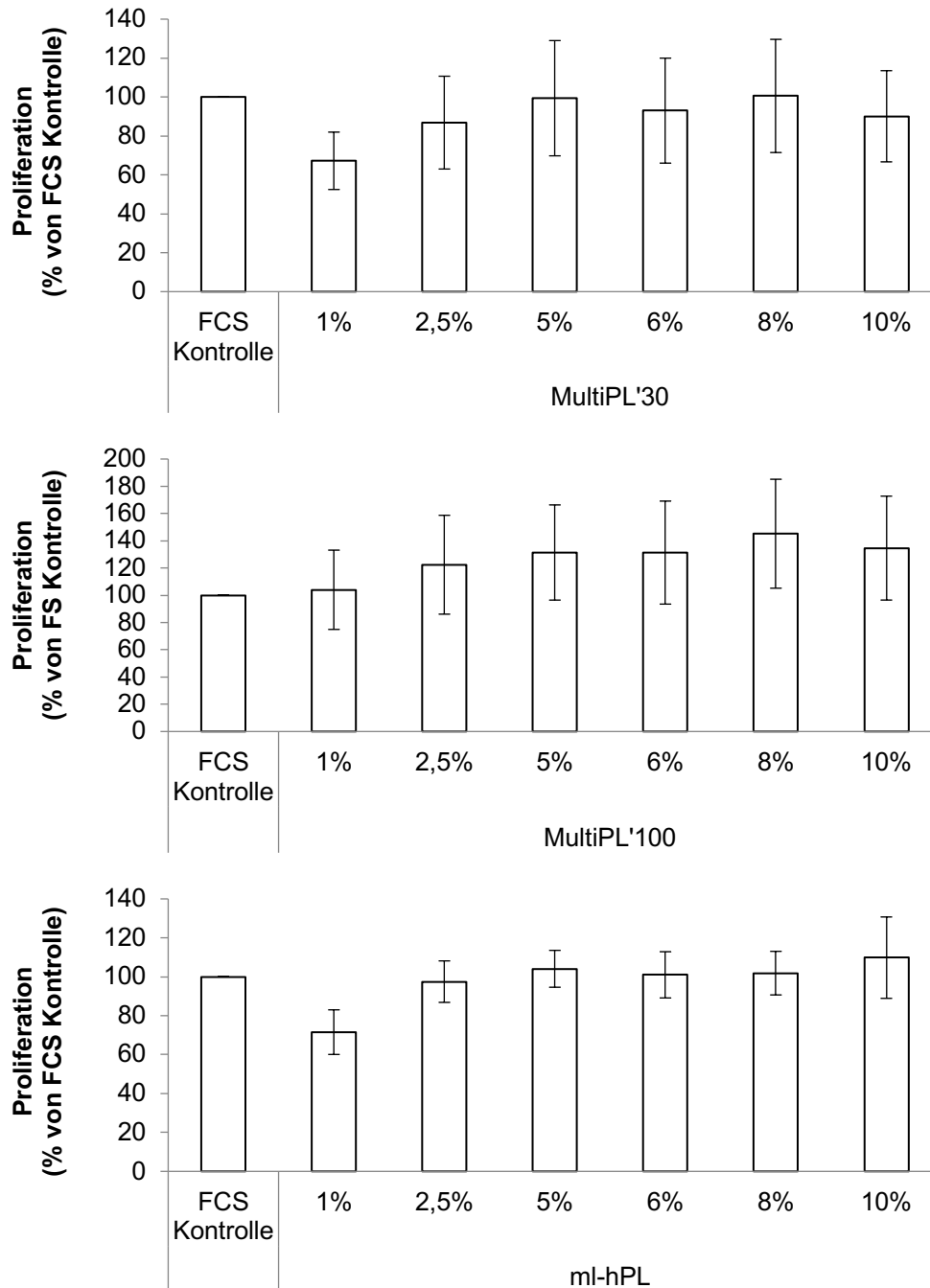


**Abbildung 2 – Zellvitalität von HUVEC unter dem Einfluss von drei verschiedenen humanen Thrombozytenlysaten (MultiPL'30, MultiPL'100, ml-hPL) für 72 h.** Die Vitalität von HUVEC unter dem Einfluss von hPL in verschiedenen Konzentrationen über 72 h wurde mittels MTT-Vitalitätsassay ermittelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Vollmedium kultiviert wurden. Ihre Vitalität wurde als 100% definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=3). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittel T-Test berechnet. Es traten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf ( $p < 0,05$ ).

### **4.3 Wirkung von humanem Thrombozytenlysate auf die Proliferation von HUVEC**

Zur Beurteilung der Proliferation von HUVEC unter dem Einfluss von hPL wurden BrdU-Proliferationsassays durchgeführt. Die Zellen wurden für 72 h in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kultiviert, bevor die Proliferation mittels dem Assay ausgetestet wurde. Es wurden erneut MultiPL´30, MultiPL´100 und ml-hPL getestet, jeweils in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8% und 10%. Als Kontrollwert wurden HUVEC gleichzeitig dem Assay unterzogen, welche in Vollmedium kultiviert wurden. Der Kontrollwert wurde als 100% Proliferation definiert.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von hPL in den ausgetesteten Konzentrationen, im Vergleich zur Kontrolle, beobachtet werden (Abb.3). MultiPL´100 erhöhte die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle, mit einer maximalen Steigerung um 45% bei 8% MultiPL´100 (Abb.3). HUVEC, welche mit 1% MultiPL´30 kultiviert wurden, zeigten eine etwas geringere Proliferation, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die mit 100% höchste Proliferationsrate bei der Verwendung von MultiPL´30 konnte mit 8% erreicht werden (Abb.3). Die Behandlung mit 1% ml-hPL verringerte die Proliferation der HUVEC nicht signifikant um 29%. Bei der Verwendung von höheren Konzentrationen wurde eine ähnliche Proliferation erreicht im Vergleich zur Kontrolle mit 20% FCS. Bei der Verwendung von 10% ml-hPL zeigte sich die Proliferation leicht gesteigert mit 109% (Abb.3).

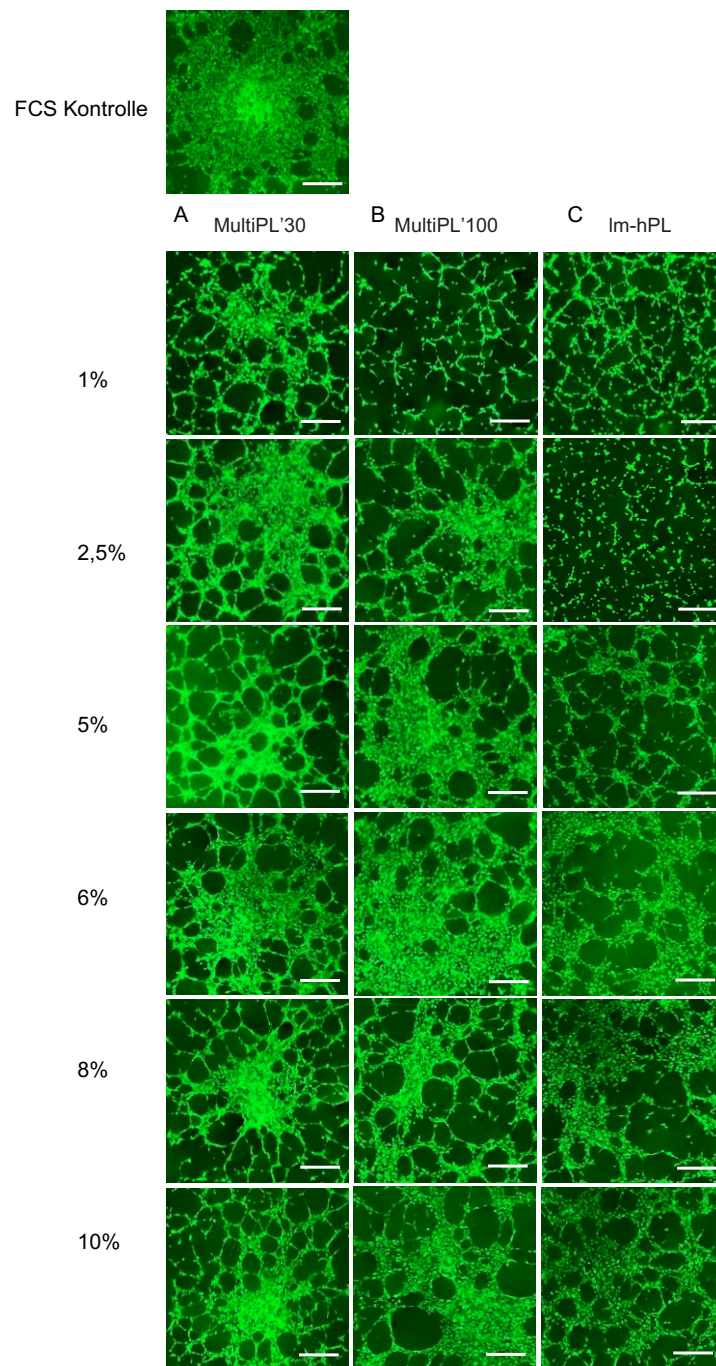


**Abbildung 3 – Proliferation von HUVEC unter dem Einfluss von drei verschiedenen humanen Thrombozytenlysaten (MultiPL'30, MultiPL'100, ml-hPL) für 72 h.** Die Proliferation von HUVEC unter dem Einfluss von hPL in verschiedenen Konzentrationen für 72 h wurde mittels BrdU-Proliferationsassay ermittelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Vollmedium kultiviert wurden. Ihre Proliferation wurde als 100% definiert und die gemessenen Werte dazu in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche (n=3). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mittel T-Test berechnet. Es traten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4 Wirkung von humanem Thrombozytenlysat auf die Vaskularisierungsfähigkeit von HUVEC *in vitro* (*Tube Formation Assay*)**

Um zu überprüfen, ob die Abwesenheit von FCS beziehungsweise hPL Einfluss auf die Angiogenese oder Vaskulogenese nimmt, wurde die Bildung von gefäßartigen Strukturen (*Tubes*) durch HUVEC *in vitro* analysiert. Die Zellen wurden für 72 h in hPL-haltigem FCS-freiem Medium kultiviert, bevor der *Tube Formation Assay* durchgeführt wurden. Es wurden MultiPL´100, MultiPL´30 und ml-hPL in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 6%, 8% und 10% ausgetestet. Als Kontrolle dienten Zellen, welche in Vollmedium kultiviert wurden.

Bei Verwendung aller drei getesteten hPL konnte die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen beobachtet werden (Abb.4). 5% MultiPL´30 stimulierte die Angiogenese-Parameter am stärksten (Abb.4). Bei MultiPL´100 und ml-hPL waren höhere Konzentrationen notwendig, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Bei MultiPL´100 war dies bei 8% und bei ml-hPL 10% der Fall (Abb.4).



**Abbildung 4 - Auswirkungen von hPL in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu FCS auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen.** HUVEC wurden in  $\mu$ -slides mit einer Dichte von 9000 Zellen/Well ausgesät, nachdem sie zuvor für 24 h in Medium kultiviert wurden, welches entweder 20% FCS, MultiPL'30 (A), MultiPL'100 (B) oder Im-hPL (C) enthielt. Nach 4,5 h erfolgte eine Färbung mittels Calcein und es wurden Fotos der gefäßähnlichen Strukturen mittel Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Hier werden repräsentative Bilder der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche gezeigt. Die Messbalken entsprechen 200  $\mu$ m.

## 5 Diskussion

### 5.1 Wirkung von humanem Thrombozytenlysat auf die Zellmorphologie, die Proliferation und die Vitalität von HUVEC

Unter dem Einfluss von hPL zeigten sich die Zellen vital, mit einer guten Proliferationsrate und ohne Veränderungen der Zellmorphologie. Bereits geringe Konzentrationen MultiPL´30 und MultiPL´100 reichten aus, damit HUVEC ihre typische ovale Form beibehielten und keine Anzeichen von Stress aufwiesen. Bezogen auf die Zellmorphologie konnten keine Unterschiede zwischen den zwei ausgetesteten hPL festgestellt werden. In den weiteren Versuchen wurden drei unterschiedliche hPL verwendet und hier konnten Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate und der Vitalität beobachtet werden. MultiPL´100 eignet sich am besten als Alternative zu FCS in Bezug auf die Proliferation und die Vitalität. Bei der Verwendung von MultiPL´100 reichten bereits sehr geringe Konzentrationen aus, um im Vergleich zur Kontrolle eine nicht signifikant gesteigerte Proliferationsrate zu erzielen. Die Vitalität verringerte sich leicht unter dem Einfluss von MultiPL´100, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Unter dem Einfluss von MultiPL´30 und ml-hPL konnte eine gleich hohe beziehungsweise nicht signifikant gesteigerte Proliferationsrate beobachtet werden. Der mitochondriale Metabolismus verringerte sich leicht unter dem Einfluss von MultiPL´30 und ml-hPL.

Wachstumsfaktoren und Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von grundlegenden Zellfunktionen. Wachstumsfaktorrezeptoren sind meist enzymgekoppelte Rezeptoren und häufig transmembranäre Tyrosinkinaserzeptoren, wie oben beschrieben. Durch die Ligandenbindung kommt es letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Zellproliferation, das Überleben der Zelle und das Wachstum regulieren (73). hPL enthält eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, welche mitogen auf Endothelzellen wirken. Rauch und Kollegen führten Analysen zum Inhalt an Wachstumsfaktoren, die in hPL enthalten sind, durch. Dabei wurden 10 hPL von unterschiedlichen Spendern untersucht. Es zeigten sich im Mittel folgende Konzentrationen: EGF 18,34 ng/ml, PDGF-AB 84,19 ng/ml, TGF- $\beta$ 1 768,9 ng/ml, HGF 1,55 ng/ml, IGF-1 15,2 ng/ml, bFGF 1,96 ng/ml, VEGF 7,04 ng/ml (92). Die

Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in selbst hergestelltem Thrombozytenlysaten schwanken, je nach Spender und Herstellungsprozess. Shanskii und Kollegen verglichen hPL mit FCS hinsichtlich biochemischer Parameter und den Gehalt an Wachstumsfaktoren. FCS enthielt unter anderem eine höhere Konzentration an Alkalischer Phosphatase, LDH und Kreatinin. Die Konzentration an Cholesterin, HDL, Totalprotein und Albumin war in hPL höher. Der Gehalt der Wachstumsfaktoren PDGF, IGF, TGF- $\beta$  und VEGF war höher im hPL als im FCS (Tabelle 2). Zusätzlich enthielt hPL den Wachstumsfaktor PDGF-BB, welcher im FCS nicht nachweisbar war (60).

Tabelle 2: Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in FCS und hPL (60)

Wachstumsfaktoren	FCS (n=4)	hPL (n=46)
PDGF-AA, pg/ml	141.9 $\pm$ 14.5	6908 $\pm$ 673
PDGF-AB, pg/ml	26.8 $\pm$ 7.7	3984 $\pm$ 487
PDGF-BB, pg/ml	0	8196 $\pm$ 979
IGF-1, ng/ml	64.1 $\pm$ 3.3	108.7 $\pm$ 4.5
TGF- $\beta$ , pg/ml	845.0 $\pm$ 66.5	16303.0 $\pm$ 1004.8
VEGF, pg/ml	2.5 $\pm$ 1.5	147.7 $\pm$ 19.8

In MultiPL´30 und MultiPL´100 sind nachweislich PDGF-AB, IGF-1, EGF, VEGF und bFGF enthalten (MacoPharma, information sheets, 2017). Verglichen mit dem Gehalt an Wachstumsfaktoren, die Shanskii und Kollegen in FCS nachweisen konnten, ist die Konzentration an PDGF-AB und VEGF in FCS deutlich geringer. Im Mittel enthielt FCS 26,8 pg/ml PDGF-AB und 2,5 pg/ml VEGF (60). Gemäß Hersteller ist der Gehalt an Wachstumsfaktoren im kommerziell erhältlichen MultiPL´30 und MultiPL´100 sehr konstant. MultiPL´30 enthält ca. 60.000 pg/ml PDGF-AB und ca. 900 pg/ml VEGF, die Konzentration in MultiPL´100 ist etwas geringer mit ca. 25.000 pg/ml PDGF-AB und ca. 500 pg/ml VEGF (MacoPharma, information sheets, 2017). Wie oben beschrieben, variiert die Konzentration der Wachstumsfaktoren, welche in hPL enthalten sind, je nach Herstellungsverfahren. Strandberg und Kollegen untersuchten die Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit der Anzahl an Zyklen wie oft PPP eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Die Konzentration von PDGF-AB stieg bei höherer Anzahl an Zyklen an. Bei der Durchführung von 30 Zyklen konnte eine Konzentration von

184,5 ng/ml gemessen werden (85). Unterschiedliche Herstellungsverfahren bzw. die unterschiedliche Anzahl an Zyklen wie oft PPP eingefroren und wieder aufgetaut wird, könnte den großen Unterschied der Konzentration an PDGF-AB in den kommerziell erhältlichen Thrombozytenlysaten und den von Shanskii hergestelltem Thrombozytenlysate erklären.

Ein für die Zellproliferation und das Überleben von Endothelzellen wichtiger Wachstumsfaktor ist VEGF. Es ist sowohl in FCS, als auch in hPL enthalten und gemäß der Analyse von Shanskii und Kollegen sogar höher in hPL. VEGF entfaltet seine Wirkung, wie oben beschrieben, über verschiedene transmembranäre Tyrosinkinaserzeptoren. Durch die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor wird dieser aktiviert und es werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, wie Ras/Raf/MEK/ERK. Aktiviertes ERK aktiviert wiederum Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen und deren Überleben nehmen (93). Die hohe Konzentration von VEGF in hPL trägt dazu bei, dass bereits niedrige Konzentrationen ausreichen, um eine ähnliche bzw. gesteigerte Proliferationsrate zu erreichen im Vergleich zu 20% FCS und keine Veränderungen der Morphologie beobachtet wurde, selbst bei der Behandlung mit niedrigen Konzentrationen.

Bei der Verwendung von höheren Konzentrationen hPL stehen den Zellen mehr Wachstumsfaktoren zur Verfügung. Dies erklärt die konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation und den teilweise gesteigerten mitochondrialen Metabolismus. Dies bestätigte auch Basrsotti und sein Team bei der Kultivierung von HUVEC mit hPL. Sie untersuchten die Vitalität und die Proliferation von HUVEC unter dem Einfluss von selbst hergestelltem hPL. Als Kontrolle dienten Zellen, welche in Medium mit 20% FCS kultiviert wurden. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation mit einer signifikant erhöhten Proliferationsrate bei der Verwendung von 10% und 20% hPL im Vergleich zur Kontrolle. Die mitochondriale Aktivität zeigte sich ebenfalls konzentrationsabhängig gesteigert und erreichte das Signifikanzniveau bei der Verwendung von 10% hPL und 20% hPL im Vergleich zur Kontrolle (48).



Des Weiteren enthält FCS Betacellulin, was zur Familie der EGF gehört. Im Serum ist es mit einer Konzentration von ca. 3,7 ng/ml enthalten und entfaltet seine Wirkung über den EGF-Rezeptor (61). Der Wachstumsfaktor EGF ist ebenfalls in der alpha-Granula von Thrombozyten enthalten und wird bei der Aktivierung freigesetzt (72). In den beiden kommerziell erhältlichen Thrombozytenlysaten ist es in einer Konzentration von 2 - 3,5 ng/ml enthalten, wobei in MultiPL´30 eine etwas höhere Konzentration zu finden ist als in MultiPL´100 (MacoPharma, information sheets, 2017). Die Konzentration an EGF in selbst hergestellten hPL schwankt und liegt, je nach Spender und Herstellungsprozess, bei einer Konzentration von 13,9 pg/ml bis zu 37 ng/ml (92, 94). Der EGF-Rezeptor ist ebenfalls ein transmembranärer Tyrosinkinase-Rezeptor. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Dimerbildung, was zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase und zur Autophosphorylierung der C-terminalen spezifischen Tyrosin enthaltenden Reste führt. Auf diese Weise werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert wie Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR und PLCγ/PKC (71). EGF ist ein starkes Mitogen und fördert die Proliferation und das Überleben von Endothelzellen (72). Bertrand-Duchesne und Mitarbeiter zeigten eine gesteigerte Proliferationsrate von HUVEC unter dem Einfluss von EGF aus PRP (72). In diesem Zusammenhang ist auch der Wachstumsfaktor PDGF-AB zu erwähnen, der ebenfalls wichtig ist für das Überleben und die Proliferation der Zellen. PDGF-AB ist in FCS enthalten, jedoch auch und sogar in höherer Konzentration in hPL (MacoPharma, information sheets, 2017)(60).

Wie in der Einleitung bereits beschrieben sind Wachstumsfaktoren essenziell für die Kultivierung von Endothelzellen *in vitro* und die hohen Konzentrationen von Wachstumsfaktoren, welche in hPL enthalten sind, erklären die gute Proliferationsrate, den teilweise gesteigerten mitochondrialen Metabolismus im Vergleich zu FCS, und tragen dazu bei, dass die Zellen keine Veränderungen der Morphologie aufweisen.

Neben vielen essentiellen Wachstumsfaktoren, welche wichtig für das Überleben und die Proliferation von Endothelzellen sind, enthält hPL auch Zytokine (95). Unter anderem ist Interleukin-8 (IL-8) enthalten, welches mit hoher Affinität an die Rezeptoren CXCR1 und

CXCR2 bindet (96). HUVEC exprimieren diese beiden Rezeptoren und durch die Bindung von IL-8 kommt es zu einer gesteigerten Proliferation von HUVEC.

Li und Kollegen konnten eine Steigerung der Proliferation von Endothelzellen unter dem Einfluss von IL-8 nachweisen. Ferner konnte nicht nur eine gesteigerte Proliferation beobachtet werden, es förderte weiterhin das Überleben der Zellen und wirkte sich günstig auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen aus (96). Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte insgesamt eine gute beziehungsweise gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Bei allen drei getesteten hPL variierte die Proliferationsrate in Abhängigkeit der Konzentration und sie wurde gesteigert bei der Verwendung von höheren Konzentrationen im Vergleich zur Behandlung mit niedrigen Konzentrationen wie 1% oder 2,5%. MultiPL´100 und ml-hPL bewirkte eine fast durchgehende Steigerung der Proliferation. MultiPL´30 enthält gemäß Hersteller mehr Wachstumsfaktoren als MultiPL´100 (MacoPharma, information sheets, 2017), Informationen bezüglich der Konzentrationen an Zytokinen liegen nicht vor. Es ist also denkbar, dass IL-8 eine Rolle dabei spielt, dass HUVEC unter dem Einfluss von MultiPL´100 und ml-hPL eine etwas gesteigerte Proliferation zeigten, im Vergleich zur Verwendung von MultiPL´30. Um dies zu bestätigen, müssten *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur Bestimmung der Zytokine durchgeführt werden.

## **5.2 Wirkung von humanem Thrombozytenlysat auf die Angiogenese *in vitro***

Ein essenzieller Prozess der Angiogenese ist die Proliferation von Endothelzellen. In den vorangegangenen Versuchen konnte dargelegt werden, dass HUVEC unter dem Einfluss aller drei verwendeten Thrombozytenlysate eine gute Proliferationsrate aufwiesen. Im Weiteren stellte sich nun die Frage, ob HUVEC, unter dem Einfluss von hPL, auch die Eigenschaft beibehalten, sich zu gefäßähnlichen Strukturen zu organisieren. Um diese Frage zu untersuchen wurden Versuche zur *in vitro*-Angiogenese durchgeführt. Hierfür wurden HUVEC, welche zuvor in hPL-haltigem FCS-freiem Kulturmedium kultiviert wurden, *Tube Formation Assays* unterzogen. Als Kontrolle dienten erneut Zellen, welche in Vollmedium kultiviert wurden.

Unter dem Einfluss aller drei getesteten Lysate, konnte die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen beobachtet werden. Die angiogene Wirkung der getesteten Lysate zeigte sich im Vergleich zu FCS sogar gesteigert. Die besten Ergebnisse mit MultiPL´30 konnten mit 5% erreicht werden, bei der Verwendung von MutliPL´100 und ml-hPL waren höhere Konzentrationen notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Bei MultiPL´100 lagen diese bei 8% und bei ml-hPL bei 10%.

Die Angiogenese ist ein sehr komplexer Prozess und viele Faktoren spielen eine wichtige Rolle und beeinflussen sich gegenseitig. Die beiden Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF sind beide in hPL enthalten (*MacoPharma, information sheets, 2017*)(97) und spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese *in vitro* und *in vivo*. VEGF entfaltet seine Wirkung über die Bindung an seine drei Rezeptoren VEGF-1, VEGF-2 und VEGF-3 (98, 99). Die Wirkung von VEGF ist dabei stark konzentrationsabhängig und bereits geringe Unterschiede in der Konzentration haben großen Einfluss auf die biologische Aktivität (100). Der Verlust eines VEGF-Allels bei der Maus bedingt fatale Fehlbildungen im embryonalen vaskulären System und ist letal (100, 101). Weiterhin führt ein Mangel zur Beeinträchtigung der postnatalen Angiogenese (102, 103). Bai und Kollegen zeigten eine konzentrationsabhängige Steigerung der Angiogenese von HUVEC *in vitro* unter dem Einfluss von VEGF. Zur Untersuchung der angiogenen Wirkung von VEGF auf HUVEC *in vitro* führten sie *Tube Formation Assays* durch. Ab einer Konzentration von 25 ng/ml VEGF wurde die Angiogenese signifikant gesteigert (97). Weiterhin zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Angiogenese *in vitro* unter dem Einfluss von bFGF (97).

Diese beiden Wachstumsfaktoren agieren allerdings nicht nur getrennt voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig (104). Über einen autokrinen und parakrinen Mechanismus stimuliert bFGF Endothelzellen zu einer gesteigerten Expression von VEGF und dessen Rezeptor (105, 106), und VEGF stimuliert Endothelzellen zur Produktion von bFGF, was wiederum die Proliferation und Migration von Endothelzellen anregt (107). Ashara und sein Team konnten die synergetische Wirkung von VEGF und bFGF im Tierversuch mit Hilfe eines Hasenmodells mit Ischämie der hinteren Gliedmaßen zeigen. Die Behandlung mit bFGF und VEGF in Kombination bewirkte eine signifikante

Steigerung der Angiogenese *in vivo* im Vergleich zur Verwendung der Wachstumsfaktoren allein (108). Dies konnte auch bei der Durchführung von *Tube Formation Assays* mit HUVEC bestätigt werden. Hier induzierten bFGF und VEGF zusammen effektiver die Gefäßneubildung (97).

Die Behandlung mit hPL fördert die Angiogenese *in vitro*. Diese Wachstumsfaktoren beeinflussen sich gegenseitig über verschiedene Signalwege, wobei die genauen Zusammenhänge noch nicht gänzlich geklärt sind. Es ist eine komplexe Interaktion von verschiedenen Rezeptorsystemen. Durch die Bindung von VEGF an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung, was verschiedene Signaltransduktionswege in Gang setzt. Es kommt unter anderem zur Aktivierung des Ras-MEK-MAPK- Signalweges, was eine gesteigerte Expression der Rezeptoren für VEGF und bFGF im Zellkern auslöst. Über den p38-Signalweg, den AKT-Signalweg und den PKC-Signalweg, welche ebenfalls durch die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor ausgelöst werden, kommt es zu einer gesteigerten Zellproliferation und Migration, was Einfluss auf die Angiogenese nimmt (97, 109-111). Durch die Bindung von bFGF an den dazugehörigen Rezeptor wird ebenfalls der Ras-MEK-MAPK-Signalweg aktiviert, was zu einer gesteigerten Rezeptorexpression führt. Weiterhin kommt es zur Aktivierung des SRC-Signalweges, den AKT/PI3K-Signalweg und den PKC-Signalweg, was Einfluss auf die Zellproliferation nimmt. Zwischen den Wachstumsfaktoren existiert eine synergetische Wirkung zur Förderung der Angiogenese (97, 112, 113).

Die Behandlung mit hPL fördert die Angiogenese *in vitro*. Dies bestätigen auch Tsai und sein Team. Die Behandlung mit 5% hPL steigerte die Proliferationsrate von HUVEC signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit 10% FCS. Des Weiteren führten sie Versuche zur Angiogenese *in vitro* und *in ovo* durch. Bei der Durchführung von *Tube Formation Assays* mit HUVEC induzierte 5% hPL die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen stärker als 10% FCS. In einem weiteren Schritt stellten sie ein Hydrogel her, welches hPL in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt. Mit diesem hPL-haltigem Hydrogel wurden Versuche zur zellulären Migration durchgeführt. Als Kontrolle diente serumfreies Medium. Hier konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der zellulären Migration beobachtet werden mit einem Maximum bei 22.4 µg/µl hPL. Zur Untersuchung der

Angiogenese *in ovo* wurden Versuche am CAM-Model durchgeführt. Hierfür wurde das selbst hergestellte hPL-haltige Hydrogel verwendet, welches 22.4 µg/µl hPL enthielt. Als Kontrolle diente Hydrogel, welches kein Serum oder hPL enthielt. hPL-haltiges Hydrogel steigerte die Bildung von Kapillaren signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Dies wurde auch durch immunhistologische Färbungen bestätigt. Im Bereich des hPL-haltigen Hydrogels konnten signifikant mehr Zytokeratin 13-positive Zellen nachgewiesen werden (114).

Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte bei allen drei getesteten hPL die Bildung gefäßähnlicher Strukturen nachgewiesen werden. Sie unterschieden sich allerdings bezüglich der optimalen Konzentration. MultiPL´30 induzierte die Gefäßbildung am effektivsten in einer Konzentration von 5%. Um gleiche Ergebnisse mit MultiPL´100 und ml-hPL zu erzielen mussten höhere Konzentrationen verwendet werden. Die Konzentration von VEGF und bFGF ist in MultiPL´30 im Vergleich zu MultiPL´100 erhöht. Dies bedingt möglicherweise, dass bereits geringere Konzentrationen von MultiPL´30 ausgereicht haben, um die Angiogenese *in vitro* optimal zu unterstützen. Weiterhin ist die gesteigerte angiogene Wirkung von MultiPL´30 im Vergleich zu MultiPL´100 und ml-hPL nicht nur durch die erhöhte Konzentration der Wachstumsfaktoren allein zu erklären, sondern zudem durch die Wechselwirkungen der Wachstumsfaktoren untereinander.

### 5.3 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hPL ein geeigneter Ersatz für die Kultivierung von HUVEC *in vitro* ist. Die Verwendung von hPL als Zusatz im Zellkulturmedium in den Konzentrationen von 1% bis 10% führte zu keinem Zellstress und die Proliferationsrate sowie die Zelllebensfähigkeit wurden nicht signifikant verringert im Vergleich mit 20% FCS supplementiertem Standardmedium. Die Behandlung mit hPL steigerte sogar die Angiogenese *in vitro*. Hier förderte MultiPL´30 die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen bereits bei niedrigen Konzentrationen. In Anbetracht der großen Bedeutung der Angiogenese im Rahmen des *Tissue Engineering* erwies sich MultiPL´30 deshalb als beste Alternative zu FCS.

## 6 Zusammenfassung

Mittels *Tissue Engineering* generierte Transplantate, welche für den Patienten sicher und gleichzeitig funktionell sind, sind für die Medizin von großer Bedeutung. Ein Problem bei der Verwendung von mittels *Tissue Engineering* generierten Gewebe-Äquivalenten ist die nicht ausreichend schnelle Vaskularisierung nach Transplantation. Die Prävascularisierung bereits *in vitro* stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Die Verwendung von FCS zur optimalen Kultivierung von primären Endothelzellen *in vitro* war bisher der Standard. Um diese Gewebe-Äquivalente jedoch einer klinischen Anwendung näher zu bringen, ist es notwendig eine Alternative zu finden.

Es konnte gezeigt werden, dass primäre Endothelzellen, HUVEC, welche in Medium kultiviert wurden, dem hPL beigefügt wurde, im Vergleich zur konventionellen Supplementierung mit 20% FCS keine Funktionseinbußen aufwiesen. Bereits geringe Konzentrationen hPL reichten aus, um die Zellen über einen längeren Zeitraum *in vitro* zu kultivieren, ohne dass Veränderungen der Morphologie auftraten. Sie behielten ihre typischen morphologischen Eigenschaften bei und wuchsen rasch zu Konfluenz. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die primären Endothelzellen unter dem Einfluss von kommerziell erhältlichem hPL und auch selbst hergestelltem hPL eine gute Proliferationsrate aufwiesen. Die Proliferation wurde durch die Behandlung mit MultiPL´100 und ml-hPL gesteigert im Vergleich zur Kontrolle mit 20% FCS, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. Um eine Prävascularisierung *in vitro* überhaupt zu ermöglichen ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Zellen ihre Eigenschaft sich zu gefäßähnlichen Strukturen zu organisieren beibehalten. In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass HUVEC unter dem Einfluss von hPL diese wichtige Eigenschaft beibehalten. Bei allen drei getesteten hPL bildeten die HUVEC erfolgreich gefäßähnliche Strukturen, nachgewiesen in *Tube Formation Assays*. MultiPL´30 stimulierte die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen stärker als 20% FCS. Die besten Ergebnisse zur *in vitro* Angiogenese zeigten sich bei der Verwendung von 5% MultiPL´30. Aber auch unter dem Einfluss der beiden anderen ausgetesteten hPL konnte erfolgreich

die Bildung von *Tubes* beobachtet werden. Hier waren lediglich etwas höhere Konzentrationen notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass hPL ein geeigneter und sicherer Kandidat ist als Alternative zu FCS. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung der Entwicklung von prävascularisiertem Gewebe *in vitro* im Rahmen des *Tissue Engineering* für die klinische Anwendung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Rowley SD. Regulation of hematopoietic stem cell processing and transplantation. *International journal of hematology*. 2002;75:237-45.
2. Giancola R, Bonfini T, Iacone A. Cell therapy: cGMP facilities and manufacturing. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2012;2(3):243.
3. Baker M. Reproducibility: Respect your cells! *Nature*. 2016;537(7620):433-5.
4. Wernscheid V. *Tissue Engineering: Rechtliche Grenzen und Voraussetzungen*. Göttinger Schriften zum Medizinrecht. Göttingen 2012.
5. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30.
6. Sadri-Ardekani H, Atala A. Regenerative medicine for the treatment of reproductive system disorders: Current and potential options. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;82-83:145-52.
7. Callens N, De Cuyper G, De Sutter P, Monstrey S, Weyers S, Hoebeke P, et al. An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia. *Human reproduction update*. 2014;20(5):775-801.
8. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 2008;26(8):434-41.
9. Heller M, Frerick-Ochs E, Bauer H-K, Schiegnitz E, Flesch D, Brieger J, et al. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials*. 2016;77:207-15.
10. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur : Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage ed. Berlin, Heidelberg 2013.
11. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. Experimentator. 3 ed. Heidelberg 2011.
12. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. 2003;20(4):275-81.
13. Montesano R, Vassalli J-D, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(19):7297-301.
14. Nicosia RF, Nicosia S, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *The American journal of pathology*. 1994;145(5):1023.
15. Gstraunthaler G, Lindl T. Auf der Suche nach brauchbaren Serumalternativen. *BIOspektrum*. 2017;23(6):724-5.
16. Jochems CE, Van Der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *ATLA-NOTTINGHAM*. 2002;30(2):219-28.
17. Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem cells international*. 2011;2011:504723.
18. Knepper PA, Mayanil CS, Goossens W, McLone DG, Hayes E. The presence of transcription factors in fetal bovine sera. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 1998;34(2):170-3.



19. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986;46(2):155-69.
20. Deuel TF. Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. *Annual review of cell biology*. 1987;3(1):443-92.
21. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*. 1979;48(1):193-216.
22. Bauman E, Granja PL, Barrias CC. Fetal bovine serum-free culture of endothelial progenitor cells-progress and challenges. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(7):1567-78.
23. Bolin SR, Matthews PJ, Ridpath JF. Methods for Detection and Frequency of Contamination of Fetal Calf Serum with Bovine Viral Diarrhea Virus and Antibodies against Bovine Viral Diarrhea Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1991;3(3):199-203.
24. Kniazeff A, Wopschall L, Hopps H, Morris C. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 1975;11(6):400-3.
25. Barile MF, Kern J. Isolation of *Mycoplasma arginini* from commercial bovine sera and its implication in contaminated cell cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1971;138(2):432-7.
26. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem cells*. 2005;23(9):1357-66.
27. Ironside JW, Head MW. Variant Creutzfeldt-Jakob disease and its transmission by blood. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1(7):1479-86.
28. Mojica-Henshaw MP, Morris J, Kelley L, Pierce J, Boyer M, Reems J-A. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*. 2013;15(12):1458-68.
29. Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2000;49(3):152-6.
30. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of Antibodies to Fetal Calf Serum With Arthus-Like Reactions in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients Given Syngeneic Lymphocyte Infusions. *Blood*. 1997;89(3):776-9.
31. Sakamoto N, Tsuji K, Muul LM, Lawler AM, Petricoin EF, Candotti F, et al. Bovine apolipoprotein B-100 is a dominant immunogen in therapeutic cell populations cultured in fetal calf serum in mice and humans. *Blood*. 2007;110(2):501-8.
32. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(13):8932-7.
33. Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(3):66.
34. Wuchter P, Bieback K, Schrezenmeier H, Bornhäuser M, Müller LP, Bönig H, et al. Standardization of Good Manufacturing Practice–compliant production of bone marrow–derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytotherapy*. 2015;17(2):128-39.

35. Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, Stark GB. Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung. *Der Chirurg*. 2000;71(9):1001-8.
36. Janicki P, Richter W. Neue Ansätze für die in situ Regeneration und das Tissue Engineering von Knochen. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2012;63(2):33.
37. Labitzke R, Friedl P. A serum-free medium formulation supporting growth of human umbilical cord vein endothelial cells in long-term cultivation. *Cytotechnology*. 2001;35(2):87-92.
38. Cánovas D, Bird N. Human AB serum as an alternative to fetal bovine serum for endothelial and cancer cell culture. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. 2012;29(4):426-8.
39. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105(S 06):S13-S33.
40. Radziwon-Balicka A, Moncada de la Rosa C, Jurasz P. Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2012;90(6):679-88.
41. Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. *British Journal of Dermatology*. 2008;159(3):537-45.
42. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion*. 2004;44(7):1013-8.
43. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends in biotechnology*. 2006;24(5):227-34.
44. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. *Cell transplantation*. 2004;13(4):343-56.
45. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of cellular physiology*. 2005;205(2):228-36.
46. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016;76:371-87.
47. Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R, et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *European journal of medical research*. 2004;9(7):337-44.
48. Barsotti MC, Losi P, Briganti E, Sanguinetti E, Magera A, Al Kayal T, et al. Effect of platelet lysate on human cells involved in different phases of wound healing. *PloS one*. 2013;8(12):e84753.
49. Adiwinata Pawitan J. Platelet rich plasma in xeno-free stem cell culture: the impact of platelet count and processing method. *Current stem cell research & therapy*. 2012;7(5):329-35.
50. Mishan MA, Balaghali S, Chamani T, Feizi S, Soheili Z-S, Kanavi MR. Potential effect of human platelet lysate on in vitro expansion of human corneal endothelial cells compared with Y-27632 ROCK inhibitor. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*. 2021;16(3):349.
51. Widyaningrum R, Burnouf T, Nebie O, Delila L, Wang T-J. A purified human platelet pellet lysate rich in neurotrophic factors and antioxidants repairs and protects corneal endothelial cells from oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142:112046.

52. Pons M, Conradi R, Brenner W, Krämer OH. Human Platelet Lysate as Valid Cell Growth Additive to Assess Protein Acetylation. HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development: Methods and Protocols: Springer; 2022. p. 87-94.
53. Bennardo F, Liborio F, Barone S, Antonelli A, Buffone C, Fortunato L, et al. Efficacy of platelet-rich fibrin compared with triamcinolone acetate as injective therapy in the treatment of symptomatic oral lichen planus: A pilot study. *Clinical Oral Investigations*. 2021;25:3747-55.
54. Mi B, Liu G, Zhou W, Lv H, Liu Y, Wu Q, et al. Platelet rich plasma versus steroid on lateral epicondylitis: meta-analysis of randomized clinical trials. *The Physician and sportsmedicine*. 2017;45(2):97-104.
55. Bennardo F, Bennardo L, Del Duca E, Patrino C, Fortunato L, Giudice A, et al. Autologous platelet-rich fibrin injections in the management of facial cutaneous sinus tracts secondary to medication-related osteonecrosis of the jaw. *Dermatologic Therapy*. 2020;33(3):e13334.
56. Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, editors. Springer-Lehrbuch. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg 2011.
57. Monagle P. Haemostasis Methods and Protocols. Monagle P, editor 2013.
58. Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. ed. München 2010.
59. Barthels M, Depka Prondzinski Mv. ~Das Gerinnungskompodium : Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen. Stuttgart u.a. 2003.
60. Shanskii YD, Sergeeva N, Sviridova I, Kirakozov M, Kirsanova V, Akhmedova S, et al. Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2013;156(1):146-51.
61. Bastian S, Dunbar A, Priebe I, Owens P, Goddard C. Measurement of betacellulin levels in bovine serum, colostrum and milk. *Journal of endocrinology*. 2001;168(1):203.
62. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;280(6):C1375-86.
63. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell differentiation*. 1986;19(1):1-17.
64. Gospodarowicz D, Bialecki H, Thakral TK. The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Experimental Eye Research*. 1979;28(5):501-14.
65. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development (Cambridge, England)*. 1992;116(2):435-9.
66. Delafontaine P, Song Y-H, Li Y. Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24(3):435-44.
67. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*. 2008;22(10):1276-312.
68. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(18):1350-8.
69. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *New England journal of medicine*. 1994;331(19):1286-92.

70. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;219(2):449-58.
71. Wieduwilt M, Moasser M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(10):1566-84.
72. Bertrand-Duchesne M-P, Grenier D, Gagnon G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *Journal of Periodontal Research*. 2010;45(1):87-93.
73. Müller-Esterl W. *Biochemie : Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*. 3. Aufl. 2018 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2018.
74. Nelson DL. *Lehninger Biochemie : mit 131 Tabellen*. Springer-Lehrbuch. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl., Übers. der 5. amerikan. Aufl. ed. Berlin u.a.2009.
75. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(4):777-94.
76. Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H, Itoh N. Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1444(1):148-51.
77. Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *International review of cytology*. 1999;185:45-106.
78. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(4):197-204.
79. Schallmoser K, Strunk D. Generation of a Pool of Human Platelet Lysate and Efficient Use in Cell Culture. In: Helgason CD, Miller CL, editors. *Basic Cell Culture Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 349-62.
80. Zimmermann R, Bender AW. Pool-versus Apherese-Thrombozytenkonzentrate. *Wissenschaftliches Gutachten zur Wertigkeit der Präparate und den rechtlichen Implikationen*. 2015.
81. Sachs UJH, Bux J. Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, editors. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 223-43.
82. Al-Ajlouni J, Awidi A, Samara O, Al-Najar M, Tarwanah E, Saleh M, et al. Safety and efficacy of autologous intra-articular platelet lysates in early and intermediate knee osteoarthritis in humans: a prospective open-label study. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2015;25(6):524-8.
83. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, Miceli M, Lavorino C, Totta P, et al. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *Journal of translational medicine*. 2014;12(1):28.
84. Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, Möller J, Laitinen S, et al. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology*. 2016;68(4):891-906.

85. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N, Knutson F, et al. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion*. 2017;57(4):1058-65.
86. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox sanguinis*. 2003;85(4):283-9.
87. Su CY, Kuo Y, Lin Y, Huang CT, Tseng Y, Burnouf T. A virally inactivated functional growth factor preparation from human platelet concentrates. *Vox sanguinis*. 2009;97(2):119-28.
88. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells*. 2007;25(5):1270-8.
89. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, et al. Platelet-Derived Growth Factors Stimulate Proliferation and Extracellular Matrix Synthesis of Pancreatic Stellate Cells: Implications in Pathogenesis of Pancreas Fibrosis. *Laboratory Investigation*. 2000;80(1):47-55.
90. Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chierigato K, Lievore C, Madeo D, et al. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2013;15(8):920-9.
91. Burnouf T, Tseng YH, Kuo YP, Su CY. Solvent/detergent treatment of platelet concentrates enhances the release of growth factors. *Transfusion*. 2008;48(6):1090-8.
92. Rauch C, Feifel E, Amann E-M, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. 2011;28(4):305-16.
93. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(7):a006502.
94. Hofbauer P, Riedl S, Witzeneder K, Hildner F, Wolbank S, Groeger M, et al. Human platelet lysate is a feasible candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Cytotherapy*. 2014;16(9):1238-44.
95. Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*. 2012;14(5):540-54.
96. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *The Journal of Immunology*. 2003;170(6):3369-76.
97. Bai Y, Leng Y, Yin G, Pu X, Huang Z, Liao X, et al. Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis in vivo. *Cell and tissue research*. 2014;356(1):109-21.
98. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The oncologist*. 2000;5(S1):3-10.
99. Veikkola T, Alitalo K, editors. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in cancer biology*; 1999: Elsevier.

100. Kelm JM, Diaz Sanchez-Bustamante C, Ehler E, Hoerstrup SP, Djonov V, Ittner L, et al. VEGF profiling and angiogenesis in human microtissues. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):213-29.
101. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature medicine*. 1999;5(12):1359-64.
102. Kelm JM, Sanchez-Bustamante CD, Ehler E, Hoerstrup SP, Djonov V, Ittner L, et al. VEGF profiling and angiogenesis in human microtissues. *Journal of biotechnology*. 2005;118(2):213-29.
103. Carmeliet P, Ng Y-S, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF 164 and VEGF 188. *Nature medicine*. 1999;5(5):495-502.
104. Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen–heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials*. 2007;28(6):1123-31.
105. Presta M, Dell’Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(2):159-78.
106. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of cell biology*. 1998;141(7):1659-73.
107. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans L, De Torres I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histology and histopathology*. 2006.
108. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1995;92(9):365-71.
109. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Cell Biology*. 2007;177(3):489-500.
110. Nilsson M, Heymach JV. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006;1(8):768-70.
111. Finkenzeller G, Hager S, Stark G. Effects of bone morphogenetic protein 2 on human umbilical vein endothelial cells. *Microvascular research*. 2012;84(1):81-5.
112. Boilly B, Vercoutter-Edouart A, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine & growth factor reviews*. 2000;11(4):295-302.
113. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug discovery today*. 2003;8(21):980-9.
114. Tsai C-C, Young T-H, Chen G-S, Cheng N-C. Developing a glyoxal-crosslinked chitosan/gelatin hydrogel for sustained release of human platelet lysate to promote tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):6451.

## 8 Anhang

### 8.1 Werte der Abbildungen

#### 8.1.1 Werte der Abbildung 2

		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
MultiPL'30	FCS Kontrolle	100	0	0
	1%	53,1396263	16,1583014	9,32899965
	2,5 %	72,217517	23,0837287	13,327397
	5%	71,0452351	24,0379881	13,8783389
	6%	71,1906564	22,6906789	13,1004696
	8%	65,8281832	21,5237634	12,4267506
	10%	64,1184008	16,5758965	9,57009828

		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
MultiPL'100	FCS Kontrolle	100	0	0
	1%	83,0317956	35,112266	20,2720762
	2,5 %	66,2553986	21,7495725	12,5571216
	5%	65,260102	18,4117167	10,6300096
	6%	66,887866	21,1425128	12,2066354
	8%	75,5626705	18,3256262	10,5803052
	10%	83,0263388	16,4938106	9,52270601

		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
ml-hPL	FCS Kontrolle	100	0	0
	1%	63,03875	17,2020355	9,93159985
	2,5 %	56,3894742	12,6440554	7,30004878
	5%	60,98921	12,7090695	7,33758471
	6%	66,7752273	12,6702071	7,31514747
	8%	72,9214699	15,841407	9,14604057
	10%	77,3203958	17,7709962	10,2600894

#### 8.1.2 Werte der Abbildung 3

		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
MultiPL'30	FCS Kontrolle	100	0	0
	1%	67,220802	25,5232017	14,73582735

2,5%	86,8503038	41,2891121	23,83827999
5%	99,3889723	51,2758214	29,60410927
6%	93,0100114	46,7118539	26,96910141
8%	100,56697	50,363452	29,07735255
10%	90,1007161	40,5819229	23,42998412

		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
MultiPL'100	FCS Kontrolle	100	0	0
	1%	104,040223	50,4156096	29,1074658
	2,5%	122,405511	62,8466902	36,2845535
	5%	131,386602	60,4654232	34,9097283
	6%	131,314866	65,457542	37,7919295
	8%	145,186593	69,269785	39,992929
	10%	134,637995	66,0400201	38,1282234

		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
ml-hPL	FCS Kontrolle	100	0	0
	1%	71,5346512	19,8489197	11,4597791
	2,5%	97,474112	18,4698964	10,6635996
	5%	104,081505	16,3995713	9,46829693
	6%	100,989983	20,5804668	11,882138
	8%	101,860405	19,3763491	11,1869404
	10%	109,799272	36,2165085	20,9096109



## **9 Danksagung**

in der Online-Version entfernt

## **10 Tabellarischer Lebenslauf**

in der Online-Version entfernt