

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. S. Grisanti

**Epitheliotrophe Kapazität von Thrombozyten-Releasate und Serum
immunsupprimierter Patienten mit rheumatoider Arthritis**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Susanne Wichmann-Harloff
aus Grevesmühlen

Lübeck, 2011

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Gerd Geerling

2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hennig

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2011

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.11.2011

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Anlagenverzeichnis.....	XI
1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
1.1 Grundlagen und Hintergründe	1
1.1.1 Grundlagen der allgemeinen Wundheilung	1
1.1.2 Wachstumsfaktoren, Zytokine.....	2
1.1.2.1 Allgemeines	2
1.1.2.2 Ausgewählte Wachstumsfaktoren, Zytokine und Vitamine	3
1.1.2.2.1 EGF	3
1.1.2.2.2 FGF	4
1.1.2.2.3 HGF	5
1.1.2.2.4 PDGF.....	5
1.1.2.2.5 IL-6	6
1.1.2.2.6 TGF- β	6
1.1.2.2.7 Fibronektin	7
1.1.2.2.8 Vitamin A und E	7
1.1.3 Die Hornhaut	8
1.1.3.1 Allgemeines	8
1.1.3.2 Korneale Wundheilung.....	8
1.1.3.3 Ursachen von Augenoberflächendefekten.....	10
1.1.3.4 Therapieoptionen von Augenoberflächendefekten	10
1.1.4 Der natürliche Tränenfilm.....	11
1.1.5 Tränenersatzmittel	12
1.1.6 Rheumatoide Arthritis	14
1.1.7 Immunsuppressive Medikation.....	15
1.1.8 Serum.....	16
1.1.8.1 Vorteile topischer Serum-AT-Anwendung	18
1.1.8.2 Nachteile topischer Serum-AT-Anwendung.....	18
1.1.9 Thrombozyten.....	19
1.2 Fragestellung	22
2. MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Untersuchungsgut, Versuchsplanung und statistische Auswertung	24
2.2. Untersuchungsmethodik.....	26

2.2.1.	Bestimmung der Krankheitsaktivität der RA-Patienten	26
2.2.2.	Gewinnung und Herstellung von Serum-Blutprodukten.....	26
2.2.3.	Gewinnung und Herstellung von Thrombozyten-Releasate	27
2.2.4.	Chemikalien.....	28
2.2.5.	Quantifizierung der Wachstumsfaktoren und Zytokine	28
2.2.6.	Zellkulturmodell.....	29
2.2.7.	Endpunktassays	30
2.2.7.1.	Proliferation.....	30
2.2.7.2.	Migration	31
2.2.7.3.	Differenzierung.....	32
3.	ERGEBNISSE	33
3.1	Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen.....	33
3.2	Krankheitsaktivität der RA-Patienten	37
3.3	Ermittlung ausgewählter Wachstumsfaktoren, Vitamine und Zytokine.....	37
3.4	Proliferation.....	43
3.4.1	Dosis-Wirkungs-Beziehung.....	43
3.4.2	Zeit-Wirkungs-Beziehung.....	47
3.5	Migration	51
3.6	Differenzierung.....	56
4.	DISKUSSION	62
4.1	Versuchsteilnehmer.....	62
4.2	Ergebnisse der klinischen Laboruntersuchungen	62
4.2.1	Vergleich von RA-Patienten mit der Kontrollgruppe	62
4.2.2	Vergleich der Thrombozytenkonzentratspender mit beiden Serumgruppen	63
4.3	Wachstumsfaktoren.....	63
4.3.1	Vergleich von RA-Patienten mit der Kontrollgruppe	63
4.3.2	Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum	66
4.4	Glukokortikoide und Proliferation.....	68
4.5	Einfluss von Serum und Thrombozyten-Releasate auf zelluläre Wachstumsprozesse	68
4.5.1	Proliferations-Experimente.....	69
4.5.1.1	Dosis-Wirkungs-Experimente.....	69
4.5.1.1.1	RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe	69
4.5.1.1.2	Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum	69
4.5.1.2	Zeit-Wirkungs-Experimente.....	71
4.5.1.2.1	RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe	71

4.5.1.2.2	Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum	71
4.5.2	Migration.....	73
4.5.2.1	RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe	73
4.5.2.2	Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum	73
4.5.3	Differenzierung	75
4.5.3.1	RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe	75
4.5.3.2	Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum	75
4.6	Fazit	75
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	LITERATURVERZEICHNIS	XII
7.	ANHANG	XX
8.	DANKSAGUNG	XLI
9.	LEBENS LAUF	XLII
10.	ORIGINALARBEITEN.....	XLIII

Abkürzungsverzeichnis

ARA	American Rheumatism Association
AT	Augentropfen
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Benzalkoniumchlorid
BB	Blutbild
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BSS	balanced salt solution
Ca	Calcium
CMV	Cytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
DAS-28	Disease Activity Score
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazellulärmatrix
Fa.	Firma
FBS	fötale Rinderserum
FGF	fibroblast growth factor
Hb	Hämoglobin
HCE	humanes Korneaepithel
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, eine Puffersubstanz
HGF	hepatocyte growth factor
Hkt	Hämatokrit
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
INR	international normalized ratio
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KGF	keratinocyte growth factor

Konfid.	Konfidenzintervall 95 %
Kontr.	Kontrollgruppe
KSFM	keratinocyte serum-free medium
Lu-Lu	Luziferin-Luziferase
m	männlich
Max.	Maximum
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MEM	minimal essential Medium
Min.	Minimum
MTX	Methotrexat
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
Pat.	Patienten
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PTT	partielle Thromboplastinzeit
Q	Quick
RA	rheumatoide Arthritis
REM	Rasterelektronenmikroskop
RF	Rheumafaktor
Serum-AT	Serum-Augentropfen
SD	Standardabweichung
sMM	(serum-)albuminhaltiges Minimalmedium
TCE	Tumorzell-Extraktionsreagenz
TGF	transforming growth factor
Thromb.	Thrombozyten-Releasate-Gruppe
Thromb.-Rel.	Thrombozyten-Releasate
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF- α	tumor necrosis factor α
U	Unit, Einheit
w	weiblich

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>	
Tabelle 1	Mögliche Ursachen schlecht heilender Augenoberflächendefekte	10
Tabelle 2	Vergleich von Tränenflüssigkeit und Serum	16
Tabelle 3	Demographische Daten der Versuchsteilnehmer	24
Tabelle 4	Paarbildung zwischen Patienten und nichtexponierten Probanden	25
Tabelle 5	Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen	33
Tabelle 6	Krankheitsaktivität der RA-Patienten nach DAS-28	37
Tabelle 7	Gehalt an Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Vitaminen	38
Tabelle 8	Dosis-Wirkungs-Beziehung	43
Tabelle 9	Zeit-Wirkungs-Beziehung	48
Tabelle 10	Zunahme der Zellhoffläche unter Einfluss von Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe sowie Thrombozyten-Releasate jeweils in unterschiedlichen Verdünnungen	52
Tabelle 11	Übersicht über die Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht	XXI
Tabelle 12	Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen - Patienten	XXIII
Tabelle 13	Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen - Kontrollgruppe	XXIV
Tabelle 14	Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen - Thrombozytenspender	XXV
Tabelle 15	Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren - RA-Patienten	XXX
Tabelle 16	Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren - Kontrollgruppe	XXXI
Tabelle 17	Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren - Thrombozyten-Releasate-Gruppe	XXXII
Tabelle 18	Dosis-Wirkungs-Ergebnisse der Patienten-Gruppe	XXXIII
Tabelle 19	Dosis-Wirkungs-Ergebnisse der Kontroll-Gruppe	XXXIII
Tabelle 20	Dosis-Wirkungs-Ergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe	XXXIV
Tabelle 21	Zeit-Wirkungs-Ergebnisse der Patienten-Gruppe	XXXV
Tabelle 22	Zeit-Wirkungs-Ergebnisse der Kontroll-Gruppe	XXXV
Tabelle 23	Zeit-Wirkungs-Ergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe	XXXVI

Tabelle 24 Migrationsergebnisse der Patientengruppe bei verdünnter Anwendung (mit 0,9 % NaCl auf 25 % verdünnt)	XXXVII
Tabelle 25 Migrationsergebnisse der Patientengruppe bei unverdünnter Anwendung	XXXVII
Tabelle 26 Migrationsergebnisse der Kontrollgruppe bei verdünnter Anwendung (mit 0,9 % NaCl auf 25 % verdünnt)	XXXVII
Tabelle 27 Migrationsergebnisse der Kontrollgruppe bei unverdünnter Anwendung	XXXVIII
Tabelle 28 Migrationsergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe bei verdünnter Anwendung (mit sMM auf 25 % verdünnt)	XXXVIII
Tabelle 29 Migrationsergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe bei verdünnter Anwendung (mit sMM auf 65 % verdünnt)	XXXVIII
Tabelle 30 Ergebnisse der Korrelationsanalyse	XXXIX

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abb. 1 Ergebnisse der Leukozytenzahl-Bestimmung	34
Abb. 2 Ergebnisse der BSG-Bestimmung	35
Abb. 3 Ergebnisse der CRP-Bestimmung	36
Abb. 4 Ergebnisse der Thrombozytenzahl-Bestimmung	36
Abb. 5 Gesamtproteingehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	39
Abb. 6 EGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	39
Abb. 7 FGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	39
Abb. 8 HGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	40
Abb. 9 PDGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	40
Abb. 10 TGF- β -Gehalt in Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	41
Abb. 11 Fibronektin-Gehalt im Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	41
Abb. 12 IL-6-Gehalt im Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	42
Abb. 13 Vitamin A-Gehalt in Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	42
Abb. 14 Vitamin E-Gehalt in Serum bzw. Thrombozyten-Releasate	42
Abb. 15 Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von RA-Patienten-Serum unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	44
Abb. 16 Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von Serum der Kontrollgruppe unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	45
Abb. 17 Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von Thrombozyten-Releasate unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	46
Abb. 18 Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	47
Abb. 19 Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Serum der RA-Patienten bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	49
Abb. 20 Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Serum der Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	50

Abb. 21	Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Thrombozyten-Releasate bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	50
Abb. 22	Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Serum und Thrombozyten-Releasate bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	51
Abb. 23	Zunahme der Zellhöfe unter dem Einfluss von Serum von RA-Patienten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	53
Abb. 24	Zunahme der Zellhöfe unter dem Einfluss von Serum der Kontrollgruppe unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	53
Abb. 25	Zunahme der Zellhöfe unter dem Einfluss von Thrombozyten-Releasate verdünnt mit sMM unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall	54
Abb. 26	Zunahme der Zellhöfe unter dem Einfluss von Serum der RA-Patienten und der Kontrollgruppe sowie Thrombozyten-Releasate unter Angabe der Mittelwerte	55
Abb. 27	REM-Aufnahme (350fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit sMM: Positivvergleich	56
Abb. 28	REM-Aufnahme (350fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit 0,9 % NaCl: Negativvergleich	57
Abb. 29	REM-Aufnahme (700fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit 20%igem Patienten-Serum	58
Abb. 30	REM-Aufnahme (700fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit 20%igem Kontrollgruppen-Serum	58
Abb. 31	REM-Aufnahme (700fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit unverdünntem Thrombozyten-Releasate	59
Abb. 32a	REM-Aufnahme humaner Hornhautepithelzellen (1.400fache Vergrößerung) nach Inkubation mit 20%igem Thrombozyten-Releasate (Verdünnung mit 0,9 % NaCl)	60
Abb. 32b	REM-Aufnahme humaner Hornhautepithelzellen (1.400fache Vergrößerung) nach Inkubation mit 20%igem Thrombozyten-Releasate (Verdünnung mit sMM)	61
Abb. 33	Ergebnisse der Erythrozytenzahl-Bestimmung	XXVI
Abb. 34	Ergebnisse der Hämatokrit-Bestimmung	XXVI

Abb. 35	Ergebnisse der MCV-Bestimmung	XXVI
Abb. 36	Ergebnisse der MCH-Bestimmung	XXVII
Abb. 37	Ergebnisse der MCHC-Bestimmung	XXVII
Abb. 38	Ergebnisse der INR-Bestimmung	XXVII
Abb. 39	Ergebnisse der Quickwert-Bestimmung	XXVIII
Abb. 40	Ergebnisse der PTT-Bestimmung	XXVIII
Abb. 41	Ergebnisse der Natrium-Bestimmung	XXVIII
Abb. 42	Ergebnisse der Kalium-Bestimmung	XXIX
Abb. 43	Ergebnisse der Calcium-Bestimmung	XXIX
Abb. 44	Ergebnisse der Hämoglobin-Bestimmung	XXIX
Abb. 45	Dosis-Wirkungs-Ergebnisse aller zehn Thrombozyten-Releasate	XXXIV
Abb. 46	Zeit-Wirkungs-Ergebnisse aller zehn Thrombozyten-Releasate	XXXVI

Anlagenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Anlage 1 Versuchsplanung und statistische Methodik der Versuchsauswertung	XX
Anlage 2 Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen	XXIII
Anlage 3 Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren	XXX
Anlage 4 Dosis-Wirkungs-Experimente	XXXIII
Anlage 5 Zeit-Wirkungs-Experimente	XXXV
Anlage 6 Ergebnisse der Migrationsversuche	XXXVII
Anlage 7 Korrelationsanalyse	XXXIX

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Persistierende Hornhauterosionen und Hornhautulzera sind oft schwierig therapierbare und rezidivierende Komplikationen von Augenoberflächenerkrankungen. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zu therapeutischen Ansätzen bei kornealen Wundheilungsstörungen zu leisten. Hierzu wurden zunächst die normale und die gestörte Wundheilung näher betrachtet. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die epitheliale Wundheilung gerichtet, da die Epithelschicht mit rezidivierender und persistierender Erosio corneae häufig der Ausgangspunkt schwerer Augenoberflächendefekte ist.

1.1 Grundlagen und Hintergründe

1.1.1 Grundlagen der allgemeinen Wundheilung

Neben dem physiologischen Zellersatz wegen Zellalterung kann es mehrmals im Leben zu kleineren und größeren Gewebetraumatisierungen kommen. Wundheilungsvorgänge zielen auf die Eliminierung von untergegangen Zellen und deren Ersatz durch Regenerierung der ursprünglichen Zellen oder Reparatur durch Narbengewebe ab, um die anatomische Struktur und Funktionalität des Gewebes wieder herzustellen. Diese Vorgänge sind ein Netzwerk der unterschiedlichsten zellulären Prozesse, die sich über eine Dauer von mehreren Monaten erstrecken können. Die normale Wundheilung eines vaskularisierten Gewebes gliedert sich in vier teilweise überlappende Phasen: Hämostase, Inflammation, Proliferation und Remodellierung.

In der Phase der Hämostase gelangen Blutkomponenten in Kontakt mit freigelegten Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM), was eine Kaskade in Gang setzt, in deren Verlauf es zur Aktivierung von Blutplättchen und deren Granulafreisetzung kommt. Sie bilden einen Gerinnungspropf, der Leckagen abdichtet und Defekte wieder auffüllt. Wachstumsfaktoren und Zytokine geben das Signal zur Chemotaxis der inflammatorischen Zellen. In der Phase der Inflammation migrieren Neutrophile in das Wundgebiet, um dort mit den Makrophagen zerstörtes und gewebefremdes Material mittels Phagozytose zu entfernen. Während der Proliferationsphase erhöht sich die Anzahl der Fibroblasten, sie beginnen, die EZM zu synthetisieren. Gleichzeitig mit der Kollagensynthese kommt es zur Hemmung von EZM-abbauenden Proteinase. In der abschließenden Phase der Remodellierung wird das neu synthetisierte Kollagen quervernetzt und organisiert. Dadurch gewinnt es an Zugfestigkeit. Proteasen neutralisieren überschüssig produzierte Extrazellulärmatrix-Proteine. Es kommt zur Wundkontraktion, die Wunde erhält ihre endgültige Form.

Wird die normale Wundheilung nachhaltig gestört, können sich zwei Zustände entwickeln. Entweder kommt es zu einer Gewebsfibrose durch exzessive EZM-Synthese und ungenügende Remodellierung. Dies äußert sich z. B. als Keloid, Striktur oder Kontraktur. Oder es entstehen chronische Ulzera, wobei die Wundheilung durch ausbleibende oder fehlge-

leitete Signale im Stadium der Inflammation persistiert. Ursachen sind u. a. vaskuläre Insuffizienz, Neuropathie und ein gestörtes Immunsystem. In verschiedenen Studien wurde eine Imbalance verschiedener hemmender und fördernder Mediatoren als Ursache von Wundheilungsstörungen identifiziert. Diese kann in vermehrter oder verminderter Produktion, exzessiver oder verminderter Granuladegradation, verzögerter oder beschleunigter Metabolisation bestehen (17).

1.1.2 Wachstumsfaktoren, Zytokine

1.1.2.1 Allgemeines

Wachstumsfaktoren und Zytokine umfassen eine heterogene Gruppe chemischer Substanzen, meist kurzkettige Polypeptide, die von verschiedenen Zellarten synthetisiert werden und modulierend auf alle Aspekte der normalen Zellreifung und -alterung sowie der Wundheilung (11, 39, 49, 60) einwirken. Die Eigenschaft der Wachstumsfaktoren, eine Zellmitose einzuleiten, unterscheidet sie von anderen für den Zellstoffwechsel essentiellen Substanzen, wie Spurenelemente und Nährstoffe. Über endokrine, autokrine oder parakrine Signalmechanismen regulieren sie ein komplexes Netzwerk. Sie entfalten ihre Wirkung nach einer hochspezialisierten Rezeptorbindung an der Empfängerzelle über eine Steuerung der Genexpression (1).

Die durch ein Gewebetrauma angelockten zirkulierenden Zellen, wie auch die ortsständigen Gewebezellen, sezernieren kontinuierlich und auf bestimmte Reize hin Zytokine. Dazu gehören u. a. IL-1, FGF, PDGF, TGF- β und TNF- α aus Monozyten, EGF, PDGF und TGF- β aus Thrombozyten, IL-2, -4, -8, -10, TGF- β und TNF- α aus T-Lymphozyten, weiterhin bFGF, PDGF und TGF- β aus Fibroblasten, letztlich auch EGF, FGF, IL-1, IL-6, PDGF, TGF- β und TNF- α aus Makrophagen (39). Zytokine sind in ihrer Struktur relativ stabil, können aber durch Proteinasen, wie sie z. B. von Neutrophilen zu Abwehrzwecken produziert werden, zerstört werden (19).

Erkrankungen verändern das normale Wachstumsfaktormilieu. So wurden bei Rosacea-Patienten mit Augenbeteiligung erhöhte Konzentrationen von EGF und IL-1 im Tränenfilm im Vergleich zu Gesunden dokumentiert (9). Außerdem unterscheidet sich die Wundflüssigkeit von frischen und chronischen Wunden voneinander. Studien zeigten, dass die Wundflüssigkeit spontan heilender Hautwunden die DNA-Synthese einer kutanen Fibroblastenzellkultur besser stimulierte als Wundflüssigkeit aus sekundär heilenden Wunden oder aus chronischen Wunden (12, 49). Das könnte an der veränderten Konzentration der Wachstumsfaktoren oder dem 125- bis 170-mal höheren Gehalt an proteolytischen Enzymen in der Wundflüssigkeit von chronischen Wunden liegen. Deshalb ist es u. U. eher erforderlich, Proteasen-Inhibitor anzuwenden, um eine sofortige Degradation von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren durch die wundeigenen Proteasen zu verhin-

dern. Frische Wunden haben die höchsten Wachstumsfaktor-Konzentrationen. Die schlechten Bedingungen in einer chronischen Wunde scheinen die wundheilungsunterstützenden Wirkungen der Wachstumsfaktoren abzuschwächen. Es mangelt nicht nur an mitogen wirkenden Biomolekülen, sondern es scheinen sogar mitogen-inhibierende Faktoren produziert zu werden.

Wachstumsfaktoren wirken an ihren Zielzellen durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Wenn man lokal Wachstumsfaktoren zur Unterstützung der chronischen Wundheilung einsetzen will, müssen auch die passenden Rezeptoren in ausreichender Menge vorhanden und intakt sein. In Wundgewebe werden vermehrt Rezeptoren exprimiert. Die Wachstumsfaktoren müssen auf den Zellverband eine längere Zeit einwirken, damit sie ihre Effekte entfalten können. Dies kann erreicht werden, indem man die Wachstumsfaktoren in einem Medium löst, das die Freisetzung über einen längeren Zeitraum gewährleistet. Bei anderen Wachstumsfaktoren genügt eine einmalige kurze Inkubation, um messbare Veränderungen zu erhalten (12).

Für die therapeutische Nutzung von Wachstumsfaktoren stehen synthetische Produkte zur Verfügung, die als rekombinante Wachstumsfaktoren große Vorteile hinsichtlich Reinheitsgrad und Beschaffung bieten. Die sichere Anwendung wurde für viele Wachstumsfaktoren demonstriert, u. a. für FGF. Der rekombinante Wachstumsfaktor war weder im Serum nachweisbar, noch wurden Antikörper gegen ihn gebildet oder traten toxische Effekte auf (49).

Das Zytokinangebot bzw. Wachstumsfaktor-Milieu der Augenoberfläche wird zum großen Teil über den Tränenfluss bestimmt. Hierbei ist nicht nur der Anteil der Zytokine aus der Tränendrüse zu beachten, sondern auch die von der Augenoberfläche selbst produzierten Zytokine (9). Verschiedene Zytokine und Vitamine wurden auf ihren Benefit in der epithelialen Wundheilung untersucht. Im Tierversuch zeigte sich u. a., dass viele Wachstumsfaktoren für sich allein nur geringe oder keine Wirkung auf die Wundheilung haben, diese jedoch durch Kombination mehrerer Faktoren stark gesteigert werden konnte (45). Wegen der schlechten Haltbarkeit und fehlendem klinischen Erfolg wurde die Applikation einzelner Substanzen nicht zur klinischen Routine.

1.1.2.2 Ausgewählte Wachstumsfaktoren, Zytokine und Vitamine

1.1.2.2.1 EGF

Das Epidermal growth factor (EGF)-Polypeptid ist einer der am meisten erforschten Wachstumsfaktoren. Es wird in Epithelzellen und in der Tränendrüse produziert und ist als physiologischer Bestandteil des Tränenfilmes für die Regenerationsfähigkeit des Hornhautepithels von großer Wichtigkeit. Barton et al. (9) wiesen durch Messung des Tränenfilms nach, dass beim Gesunden EGF gleichmäßig über den Tag ohne diurnale Schwan-

kungen produziert wird. Die Wirkungen dieses Wachstumsfaktors beziehen sich im Einzelnen auf eine Steigerung der Mitoseaktivität und Inhibition von Apoptosevorgängen aller drei kornealer Zelltypen sowie Steigerung der Synthese von Extrazellulärmatrixbausteinen. Um seine Wirkungen über Rezeptorbindung zu entfalten, muss EGF für mindestens 5-6 h im geschädigten Gewebe präsent sein, wird aber sehr schnell aus dem Tränenfilm ausgewaschen bzw. diffundiert in das Kammerwasser. Deshalb kann die einfache topische Applikation durch Kontaktlinsen, Kollagenschalen oder Epikeratophakieschalen ergänzt werden, die eine zu frühe Auswaschung verzögern. Optimale therapeutische Konzentrationen werden mit 10-50 ng/ml angegeben (11, 37, 38, 67).

Im menschlichen Körper kommt EGF in fast allen Körperflüssigkeiten vor. Im Plasma sind nur minimale Spuren nachweisbar. Während Knorr et al. (38) EGF-Konzentrationen im Serum mit 1,0-1,8 ng/ml, im Speichel mit 0,9-3,0 ng/ml und in der Tränenflüssigkeit mit 9,5-27 ng/ml angaben, fanden Bennett und Schultz (11) 130 pmol/l im Serum und Tsubota et al. (69) 0,52 ng/ml im Serum sowie 0,7-8,1 ng/ml in Tränenflüssigkeit. Die EGF-Konzentration in der Tränenflüssigkeit steigt nach kornealer Verletzung an. Bei einem chronischen Hornhautulcus findet sich dagegen eine verminderte Konzentration.

Bereits 1972 wiesen Frati et al. (26) bei Kaninchen eine erhöhte Proliferation von verletztem Korneaepithel nach, nachdem topisch Maus-EGF appliziert worden war. Bei Experimenten mit humanen Korneaepithelzellen und Keratinozyten unterstützte exogen zur Zellkultur zugeführtes EGF die Proliferation zwar dosisabhängig, aber durch mangelnde Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten entstand ein sehr vulnerabler Zellverband (56). Dies zeigte, dass eine Kombination von EGF und anderen Faktoren, die die Zell-Zell-Kontakte fördern, wie Fibronectin oder Laminin, erforderlich ist, um ein adultes, adhärentes Hornhautepithel zu induzieren. Gute Erfolge ließen sich hier mit einer Kombination von Steroiden, EGF und Fibronectin erreichen (67) oder mit Serum als Kofaktor (65). Es gibt aber auch Daten, die eine alleinige EGF-Anwendung unterstützen. Die Beschleunigung der Wundheilung wird bereits ausgenutzt bei rekurrenden Epitheldefekten, rheumatischen Ulzerationen und Verletzungen der Augenoberfläche durch Laugenverätzungen. Besonders positiv wird dabei der Aspekt bewertet, dass EGF auf Epithel und Stroma zusammen einwirkt (38). Verschiedene Studien beobachteten eine beschleunigte Heilungsrate nach topisch appliziertem rekombinantem EGF bzw. Maus-EGF bei Patienten mit Augenoberflächenerkrankungen bei guter Toleranz der Therapie (18, 57, 66).

1.1.2.2.2 FGF

Fibroblast growth factor (FGF) ist ein Zytokin, das in unterschiedlichen Subtypen in verschiedenen Zellarten synthetisiert wird. Dazu zählen u. a. Fibroblasten, Myozyten und T-Lymphozyten wie auch die Keratinozyten des Auges. Für FGF wurden bisher sowohl anti-

als auch proinflammatorische Effekte nachgewiesen (38). Dieses Polypeptid bindet bei Epitheldefekten an die freiliegende Basalmembran durch seine Affinität zu Heparansulfat. Eine einmalige Applikation genügt, um messbare Effekte zu erzielen. FGF wirkt proliferationsstimulierend auf alle drei kornealen Zelltypen, bei Kaninchen konnte eine beschleunigte Reepithelialisierung nachgewiesen werden. Es wirkt stimulierend auf die subepitheliale Extrazellulärmatrixsynthese und Angiogenese (11, 12, 21, 40, 60, 61). FGF scheint in ischämischen Wundgebieten, wo Hypoxie herrscht, schlechter zu wirken als in nicht ischämischen Wunden (49).

1.1.2.2.3 HGF

Hepatocyte growth factor (HGF) ist in Blutplättchen, Serum und Plasma nachweisbar. Es wird von der Tränendrüse produziert und sezerniert. Mit steigender Sezernierung der Tränendrüse steigt auch der Gehalt im Tränenfilm (34).

Als Bestandteil des menschlichen Tränenfilms übt HGF eine stimulierende Wirkung auf die korneale Wundheilung aus. HGF stimuliert nicht nur die Proliferation, sondern ebenso die Angiogenese. In Kaninchenaugen führte eine Implantation von HGF-Pellets zu einer Neovaskularisation der ursprünglich avaskulären Kornea. Weiterhin wirkt es als ein Motilitätsfaktor für verschiedene Zelltypen und unterstützt so die Migration (21, 14, 40).

1.1.2.2.4 PDGF

Es ist weiterhin bekannt, dass auch der Wachstumsfaktor platelet derived growth factor (PDGF) eine hervorragende Rolle bei der Induktion der Zellproliferation spielt. Es ist in hohen Mengen in Plättchengranula enthalten, wird aber auch von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten synthetisiert und freigesetzt (45). Es existieren drei Isoformen (AA, AB, BB), die in verschiedenen Anteilen in den unterschiedlichen Geweben vorkommen. In den Plättchengranula ist PDGF in allen seinen drei Isoformen zu folgenden Anteilen enthalten: 12 % AA, 65 % AB, 23 % BB (11).

PDGF scheint die Effekte von EGF auf Epithelzellen zu verstärken (38). In klinischen Studien mit topisch appliziertem humanem PDGF bei diabetischen Ulzera der unteren Extremität ließ sich ein stark positiv stimulierender, dosisabhängiger Einfluss auf die Wundheilung nachweisen (71). Es wirkt nicht nur modulierend auf Zellproliferation und -migration von inflammatorischen Zellen und glatten Muskelzellen, sondern auch auf die Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten, wie Kollagen III, IV und V, Hyaluronan und Fibronectin, und die Narbenkontraktion. Es inhibiert die Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten und wirkt regulatorisch auf die Wachstumsfaktorsekretion von u. a. TGF- β (10, 39, 51, 53, 60). PDGF wird bereits kommerziell eingesetzt bei Dekubitalulzera und diabetischen Fußulzera.

1.1.2.2.5 IL-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von mononukleären Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Hepatozyten und Fibroblasten produziert wird. Es induziert u. a. die Differenzierung von B-Zellen in Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen und wirkt damit auf die Produktion von IgA und IgG ein (35). Bei rheumatoider Arthritis (RA) ist IL-6 im Serum und v. a. auch in der Gelenkflüssigkeit entzündeter Gelenke erhöht. Es ist beteiligt an der Stimulation der Synthese von Akute-Phase-Proteinen, wie CRP, und der Leukozyteninfiltration. BSG und CRP, deren Regulierung durch mehrere Zytokine gelenkt wird, gelten als typische Marker der Akute-Phase-Reaktion (7). Der IL-6-Serumspiegel korreliert gut mit der Schwere der Erkrankung (7, 24, 62).

1.1.2.2.6 TGF- β

Transforming growth factor- β (TGF- β) zählt zu den wichtigsten Modulatoren der Reparaturvorgänge im Rahmen der Wundheilung. Hohe Konzentrationen finden sich in Thrombozyten, geringere Mengen auch in aktivierten Makrophagen, Neutrophilen, Fibroblasten und Keratinozyten. Auch TGF- β moduliert Prozesse der Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration, Matrixsynthese und Matrixabbau (10, 39, 45, 56, 62). Es wirkt proliferationsstimulierend oder -inhibierend, abhängig von Konzentration und Zelltyp. Dabei wirken niedrige Konzentrationen von TGF- β (0,02-0,1 ng/ml) stimulierend, hohe Konzentrationen (>0,5 ng/ml) inhibierend durch Einleitung von Apoptosevorgängen. Kruse und Tseng (42) wiesen nach, dass TGF- β bei Hornhautepithelzellen nur hemmende Einflüsse auf die Zellproliferation ausübt, gleich ob in niedriger oder in hoher Dosierung.

TGF- β greift modulierend in das Netzwerk anderer Wachstumsfaktoren, wie EGF, FGF und PDGF, ein. Dabei hemmt es die stimulierenden, proliferationsfördernden Einflüsse von EGF auf das Korneaepithel. Auf der anderen Seite übt TGF- β positive Effekte auf die Wundheilung über eine Steigerung der Synthese der Extrazellulärmatrix aus, was über eine Stimulation der Kollagenbildung, Elastinsynthese und Inhibition von Metalloproteinasen die Zugfestigkeit stromalen Gewebes steigert (11, 12, 38, 60, 66, 70). So konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass die Neutralisation von TGF- β die korneale Fibrose bei Kaninchen vermindert (56). Da TGF- β aber auch stark proinflammatorische Eigenschaften hat und bereits abnorme Differenzierungen unter TGF- β -Einfluss beschrieben wurden, sollte der Anteil an diesem Zytokin in einem künstlichen Tränenersatzmittel möglichst gering gehalten werden (38), weshalb sich eine Verdünnung des Serums auf ein Niveau, vergleichbar dem der Tränenflüssigkeit, anbietet. Da TGF- β mit ca. 50 ng/ml in Serum 5fach höher konzentriert ist als in der physiologischen Tränenflüssigkeit, empfiehlt sich u. a. deshalb eine Verdünnung des Serums auf 20 % (34, 69). Herminghaus et

al. (32) fanden dagegen in ihren Serumproben eine TGF- β -Konzentration von 6,03 ng/ml; allerdings hängt die messbare Konzentration vom Herstellungsprotokoll ab.

1.1.2.2.7 Fibronektin

Fibronektin - als adhäsives Glykoprotein - zählt zu den Extrazellulärmatrixproteinen. Es wird von Fibroblasten synthetisiert und wirkt auf die Gewebefestigkeit durch Vermittlung der Bindungen zwischen Zellmembran und Extrazellulärmatrix. Es wirkt synergistisch mit EGF auf die Ausprägung von Zellteilung, Differenzierung und Matrixsynthese, wenn auch deutlich schwächer als EGF. Fibronektin stimuliert Adhäsion, Chemotaxis und Haptotaxis von Fibroblasten und erleichtert durch Opsonierung die Phagozytose (39). Es bedeckt bei Epithelverletzungen das stromale Wundbett und dient den migrierenden Epithelzellen als Matrix, bevor die Basalmembran wieder restauriert wird. Nach Abschluss der epithelialen Wundheilung wird das Fibronektin wieder abgebaut, Kollagen IV und Laminin verbleiben als Komponenten der Basalmembran (55).

Fibronektin kommt im Serum mit einer Konzentration von 200 μ g/ml vor, in der Tränenflüssigkeit nur 20 μ g/ml. Es wird durch hohe Konzentrationen von Plasmin inaktiviert. Eine Inhibition dieser Fibronektininaktivierung kann durch Zusatz von Proteaseninhibitoren erreicht werden (61).

1.1.2.2.8 Vitamin A und E

Auch Vitamin A wird von der Tränendrüse produziert und ist in der Tränenflüssigkeit nachweisbar. Tsubota et al. (69) wiesen Vitamin A im Serum von Sjögren's Syndrom Patienten in einer Konzentration von 45,4 μ g/dl nach. Serum enthält eine ca. 1.000fach höhere Vitamin-A-Konzentration als Tränenflüssigkeit. Es scheint bei Glukokortikoidtherapie protektiv auf die Wundheilung einzuwirken (23). Zusammen mit Vitamin E fördert es v. a. die Differenzierung der Augenoberflächenepithelien. Vitamin A wirkt auf die Differenzierung der Becherzellen und die epithelialen Keratine ein. Ausgeprägter Vitamin-A-Mangel kann zur Xerosis der Augenoberfläche führen (60). Vitamin E verlängert die Zelllebensdauer.

Zusammenfassend wird die Proliferation von Korneaepithelzellen stimuliert u. a. durch EGF, FGF, HGF und PDGF. Gehemmt wird sie durch TGF- β . Die Migration wird stimuliert u. a. durch EGF, HGF und PDGF. Die Differenzierung des Epithels wird u. a. durch TGF- β , HGF, Vitamin A und E reguliert.

1.1.3 Die Hornhaut

1.1.3.1 Allgemeines

Die Kornea hat eine einfache anatomische Struktur aus drei Zelltypen: Epithelzellen, Keratinozyten, Endothelzellen. Diese sind in fünf Schichten von außen nach innen angeordnet: Epithel, Bowman-Lamelle, Stroma mit Keratinozyten, Descemet-Membran und Endothel. Die Kornea ist avaskulär, stark sensibel innerviert und transparent, um ihre Aufgabe im visuellen Apparat zu erfüllen. Mit einer Brechkraft von 43 Dioptrien übernimmt sie den größten Anteil an der Refraktion des Auges. Durch ihre exponierte Lage ist die Hornhaut anfällig für Angriffe aus der Umwelt. Zwei Mechanismen wirken dabei protektiv: Einerseits der mechanische Schutz durch Lidapparat und Tränenfilm und andererseits die Fähigkeit zur Wundheilung und Reparatur von Defekten.

Im gesunden Hornhautepithel läuft eine ständige Erneuerung der Zellen ab. Dabei kommt es innerhalb von wenigen Tagen zu einem kompletten Turn over des kornealen Epithels und einer stetigen Abschilferung der oberflächlichen Flügelepithelzellen. Dies wird durch Zellneubildung im Bereich der limbalen Stammzellen kompensiert. Diese undifferenzierten Stammzellen haben unter normalen Bedingungen nur eine sehr langsame Zellteilungsrate. Bei erhöhtem Zellbedarf differenzieren sie zu Teilungszellen mit hoher mitotischer Potenz. Ihre postmitotischen Tochterzellen differenzieren letztendlich zu Epithelzellen, die am Ende ihrer Wanderung durch das Epithel als Flügelzellen wieder abgestoßen werden. Die Ernährung der Hornhaut mit Glukose, Elektrolyten und Aminosäuren wird durch das Kammerwasser bereitgestellt. Wachstumsfaktoren, Immunglobuline, Vitamine und Neuropeptide werden über die Tränendrüse in die Tränenflüssigkeit abgegeben und erreichen so das Hornhautepithel. Die Sauerstoffversorgung wird ebenfalls über den Tränenfilm gewährleistet. Aus konjunktivalen Gefäßen werden zusätzlich Fibronektin, Komplement und weitere Immunglobuline abgegeben, besonders im Rahmen inflammatorischer Prozesse (8, 29, 60).

1.1.3.2 Korneale Wundheilung

Auch der Prozess der kornealen Wundheilung beinhaltet, wie oben dargestellt, die Teilaspekte Proliferation, Migration und Differenzierung der drei kornealen Zellarten. Bestimmend für die Prognose von epithelialen Verletzungen sind das Ausmaß der Gewebeschädigung und die Stärke der inflammatorischen Begleitreaktion. Jedes Epithelgewebe besitzt grundsätzlich die Fähigkeit zur Restitutio ad integrum, solange der Defekt auf das Epithel beschränkt bleibt (Erosio). Von den drei Zelltypen der Kornea zählt nur das Epithel zu den schnell regenerierenden Geweben.

Dies läuft am Beispiel der Erosio corneae folgendermaßen ab: Sehr schnell erreichen inflammatorische Zellen über die Tränenflüssigkeit das Wundgebiet und beginnen mit den

ersten Reparaturmechanismen im geschädigten Zellareal. Metalloproteinasen reinigen die Wundfläche von Zellfragmenten und Fremdstoffen. Gesteuert werden diese Zellfunktionen durch biologische Signale wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie Neurotransmitter. Sie erreichen die Kornea hauptsächlich über den Tränenfilm und z. T. auch über die limbale vaskuläre Versorgung. Ein Teil der Substanzen wird auch von den kornealen Zellen selbst synthetisiert und beeinflusst über autokrine bzw. parakrine Sekretion den Stoffwechsel der einzelnen Zelle bzw. der Nachbarzellen (55). Während der Wundheilung besteht ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen im Wundgebiet, wohingegen die verbrauchten Metaboliten und die ph-wirksamen Stoffe abtransportiert werden müssen (12, 19). Durch Erhöhung des Gehaltes an Serumproteinen in Tränenflüssigkeit und kapillärer Blutversorgung bildet sich eine Fibronektinschicht in der Wunde, die phagozytierenden Zellen und migrierenden Epithelzellen als Gerüst dient. Bevor es zum Auffüllen des Defektes kommt, müssen Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Kontakte durch Überexpression von Proteasen und Kollagenasen gelöst werden. Die Proliferation epithelialer Stammzellen und deren anschließende Migration ins Wundgebiet decken den Defekt mit einem einschichtigen Epithel. Die Stammzellen werden dabei zu Teilungszellen, die entlang der intakten Basalmembran von außen zur Defektmittle hin migrieren und sich auf dem Weg immer wieder teilen, bis dieser Vorgang durch Kontaktinhibition gestoppt wird. Nach erfolgter Migration müssen die zellulären und extrazellulären Kontaktstellen neu geknüpft werden. Dies geschieht mit Unterstützung von Adhäsionsfaktoren wie Fibronectin und Laminin. Defekte der Basalmembran werden aufgefüllt durch Kollagen, Laminin und Perlecan. Dieses Gerüst dient als Schiene für die nachfolgende Zelleinsprossung und wird nach Überwachsen durch basale epitheliale Zellen von diesen neu strukturiert. Die bisher einlagige Zellschicht verändert sich durch gesteigerte Mitose von proliferierenden Zellen in mehreren Schichten, wobei die refraktären Eigenschaften der Kornea durch gezielte Hyper- bzw. Hypoplasie der neuen Zellschichten gesteuert werden.

Defekte im Gebiet der azellulären Bowman-Lamelle (aus Typ I Kollagen) heilen über Defektheilung aus. Bei kombinierten Epithel-Stroma-Defekten treten dagegen Reparaturvorgänge in Kraft, die, je nach Größe des Defektes, in ein Narbengewebe münden. Über mehrere Monate führt nun die Remodellierung der zellulären und extrazellulären Anordnung zu einer Annäherung an möglichst optimale refraktive Eigenschaften. Dabei bestimmt die Ausdehnung der Narbenformation die refraktiven Eigenschaften. Diese Wundheilungsvorgänge bei Verletzungen der Augenoberfläche beinhalten immer die Gefahr einer funktionellen Beeinträchtigung der brechenden Medien des Auges durch transparenzgemindertes Narbengewebe. Folgen von Narbengewebe und Wundkontraktion können so irregulärer Astigmatismus und Stromatrübung sein (55, 39, 60, 61).

1.1.3.3 Ursachen von Augenoberflächendefekten

Schlecht heilende Augenoberflächendefekte sind Endpunkte verschiedenster Erkrankungen okulären oder systemischen Ursprungs (Tab. 1). Zu den häufigeren Ursachen von Augenoberflächendefekten zählen direkte mechanische Traumata, postoperative Zustände, virale oder bakterielle Infektionen oder trockene Augen im Rahmen verschiedener, häufig schwierig zu behandelnder Systemerkrankungen, wie Sjögren-Syndrom, Autoimmunerkrankungen wie RA, und Stoffwechselstörungen mit neurotrophen Affektionen. Wird ein kornealer Epitheldefekt erfolglos oder unzureichend therapiert, können sich Komplikationen entwickeln. Hier sind u. a. Narbenbildung, Neovaskularisation, Ulcus serpens, Durchwanderungsendophthalmitis, Perforation und dauerhafter Visusverlust zu nennen (22, 30).

Tabelle 1: Mögliche Ursachen schlecht heilender Augenoberflächendefekte

Extrinsisches Trauma:	Mechanisch (z. B. Astverletzungen), thermisch (Verbrennung), chemisch (Säure- und Laugenverletzungen), postoperative Zustände
Virale Infektion:	Okulärer Herpes simplex, Herpes zoster, CMV
Bakterielle Infektion:	Pseudomonas aeruginosa, Staphylokokken, Serratia sp.
Autoimmunerkrankung:	Sjögren-Syndrom, Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus erythematodes, M. Wegener
Gestörte Neurotrophik:	Diabetes mellitus, Trigeminusaffektionen, Exophthalmus
Andere:	Tränenmangel, Keratokonjunctivitis sicca, Limbusstammzellninsuffizienz

1.1.3.4 Therapieoptionen von Augenoberflächendefekten

Es gibt viele Optionen, Wundheilungsstörungen der Augenoberfläche therapeutisch zu beeinflussen. Der erste Schritt der Therapie ist meist die medikamentöse Behandlung. Hierbei werden unkonservierte Tränenersatzstoffe, benetzende Salben und Gele, topische Kortikoide, Lösungen aus Spurenelementen, Vitaminen, Mineralien und Aminosäuren, lokale Wärmeanwendung, einzelne rekombinante Wachstumsfaktoren, wie EGF, Fibronectin, Kollagenase-Inhibitoren, okkludierende Verbände, sauerstoffdurchlässige Kontaktlinsen und lokale Antibiose angewendet, aber auch Prostacyclin-Analoga, Aspirin und vasoaktive Medikamente, wie Diosmin, wurden erprobt (22, 23, 25, 61, 67). Zu den chirurgischen Optionen gehören u. a. die Korrektur einer Lidfehlstellung, Bindehautdeckung, homologe oder autologe Limbusstammzelltransplantation, Tarsorrhaphie, Botulinumtoxin-Anwendung zur temporären Ptosis, Trichiasis-OP, Keratektomie mit Excimerlaser, Amnionmembrantransplantation und lamelläre oder perforierende Keratoplastik.

Die Therapieoptionen sind also sehr vielschichtig, von unterschiedlicher Invasivität und insbesondere bei hoher Rezidivneigung von Wundheilungsstörungen kostenintensiv. Trotz der zum Teil sehr langwierigen und teuren Therapieverfahren ist es dennoch wirtschaftlicher, den Patienten zu rehabilitieren, da eine schwerwiegende Sehbehinderung sehr viel höhere Folgekosten verursacht (28).

1.1.4 Der natürliche Tränenfilm

Der Tränenapparat reguliert die Produktion des Tränenfilms und dessen Abtransport über den Nasen-Rachenraum. Tränenerzeugender Anteil (Tränen- und akzessorische Tränen-drüsen) sowie tränenableitender Anteil (Tränenpünktchen, Tränensack und Ductus nasolacrimalis) bilden zusammen das Tränenorgan. Die Blutversorgung erfolgt über die A. lacrimalis (A. ophthalmica), während die sensible Versorgung über den 1. Trigeminusast (N. lacrimalis) und die sekretorische Steuerung über die parasympathischen Anteile des N. intermedius erfolgt. Die Ernährung wird über das Kammerwasser bereitgestellt, welches Glucose und Aminosäuren enthält, während die Sauerstoffversorgung über den Tränenfilm selbst gewährleistet wird.

Der Tränenfilm des menschlichen Auges ist keine homogene Flüssigkeit, sondern besteht aus mehreren Schichten unterschiedlicher Zusammensetzung und mit unterschiedlichen Eigenschaften. Er wird in drei Schichten von den Haupt- und akzessorischen Tränendrüsen sowie den Lidranddrüsen und der Bindehaut erzeugt. Die oberflächliche mononukleare Lipidschicht wird durch die Meibom-Drüsen und Zeis-Drüsen synthetisiert. Darauf folgt die mittlere wässrige Schicht, die v. a. Proteine und Salze enthält und durch die Haupt- sowie akzessorischen Tränendrüsen gebildet wird. Als dritte folgt in der Tiefe die muzinöse Schicht mit ihren hydrophilen Eigenschaften, sie wird durch die Becherzellen der Konjunktiva erzeugt.

Die Tränenflüssigkeit spielt eine wichtige Rolle bei der Integrität des Hornhautepithels, indem sie durch ständige Befeuchtung die Austrocknung des Epithels verhindert und durch andere Faktoren, u. a. Wachstumsfaktoren und Zytokine, die Zellerneuerung und Abwehr unterstützt. Der Tränenfilm bietet Schutz vor Irritationen durch Umwelteinflüsse. Er transportiert jedoch auch nutritive Substanzen und Sauerstoff und wirkt ernährend auf die Oberfläche. Eine andere Aufgabe des Tränenfilms ist die Verdünnung und Entfernung potentiell schädigender Substanzen durch Auswaschung von der Augenoberfläche. Außerdem hat er durch antibakterielle Zusätze antiinfektiöse Eigenschaften und dient als Vehikel für metabolisch aktive Substrate.

Veränderungen im Tränenfilm hinsichtlich der physikalischen Eigenschaften, z. B. durch eine veränderte Zusammensetzung der einzelnen Komponenten untereinander oder durch das Fehlen ganzer Bestandteile, wirken sich negativ auf die Wundheilung der Kor-

nea aus (58, 61). Ein veränderter Tränenfilm oder -mangel führt zu Augenoberflächenerkrankungen, die bei gestörter Wundheilung zu persistierenden Epitheldefekten führen können. Symptome von Tränenfilmveränderungen sind u. a. Fremdkörpergefühl, Brennen, Photophobie, Epiphora, Juckreiz, Schmerz, konjunktivale Hyperämie, Lidschwellung, Lidverkrustung und Sehstärkenreduktion. Die Häufigkeit von Tränenfilmveränderungen nimmt zu. Ursächlich sind u. a. zunehmende Schadstoffbelastung durch Luftverschmutzung, sich ändernde Anforderungen im Privat- und Arbeitsleben, Medikamentennebenwirkungen, Veränderung der Bevölkerungsstruktur mit Vergreisung der Gesellschaft (36).

1.1.5 Tränenersatzmittel

Schwere Augenoberflächenerkrankungen bei trockenen Augen können nicht nur durch eine Minderproduktion der wässrigen Anteile des Tränenfilms, sondern auch durch eine verminderte Produktion des Mucin-Filmes bedingt sein (53). Bereits seit längerem werden hier künstliche Tränenersatzstoffe verabreicht, die eine häufige topische Anwendung erlauben. Künstliche Tränenersatzstoffe sind bei vielen Augenoberflächenerkrankungen indiziert. Hierzu zählen u. a. das Sicca-Syndrom mit und ohne Epithelheilungsstörungen, Hypästhesie der Hornhaut, Lidfehlstellung oder Lidschlaginsuffizienz, Zilienfehlstellung, Konjunktivaveränderungen und nach refraktiver Chirurgie (61). Künstliche Tränenersatzstoffe enthalten unterschiedliche Anteile an hydrophilen und lipophilen Komponenten. Sie können zwar die befeuchtende Wirkung des natürlichen Tränenfilmes imitieren, es fehlen jedoch wichtige nutritive Stoffe und die natürlicherweise enthaltenen bioaktiven Substanzen, die an den kontinuierlich ablaufenden Zellerneuerungen und Wundheilungsvorgängen beteiligt sind.

Pharmazeutische Benetzungsmittel können je nach Veränderung des Tränenfilms in unterschiedlichen Applikationsarten oder Inhaltsstoffen und deren spezifischen Eigenschaften ausgewählt werden. Sie sind aktuell erhältlich auf wässriger Basis, muzinartiger Basis mit hohen visko-elastischen Eigenschaften und hoher Wasserbindungspotenz, z. B. in Form von Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat-Basis oder lipidartiger Basis als Salbenform. Nachteilig wirkt sich aus, dass die einzelnen Tränenersatzstoffe jeweils meist nur eine Komponente des Tränenfilms ersetzen. Außerdem führen sie zu einer Verdünnung evtl. noch vorhandener, die Wundheilung unterstützender Faktoren. Unter der Vorstellung, dass ein erhöhter Zellmetabolismus durch Zufuhr von Metaboliten die Wundheilung positiv beeinflusst, fanden verschiedene Ideen Anwendung. Zu nennen sind hier z. B. eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes, Zufuhr von Vitaminen A-C, Aminosäuren, Metallionen und Pyrimidin- und Purinbasen. Außer der topischen Vitamin-A-Applikation (u. a. beim Sicca-Syndrom) konnte sich nichts durchsetzen, da nur ein geringer Einfluss auf die Syntheseleistung nachweisbar war (61).

In den letzten Jahren wurde der Einsatz von *natürlichen* Tränenersatzmitteln als viel versprechend berichtet. Dazu gehören unkonservierte Körperflüssigkeiten, wie Serum, Speichel und Kolostrum. Der entscheidende Vorteil liegt bei autologer Anwendung in der fehlenden Allergenität. Sie haben einerseits, wie künstliche Tränenersatzstoffe, gute befeuchtende Wirkung, aber auch eine epitheliotrophe Potenz, die den künstlichen Substanzen fehlt. Hier sind v. a. Wachstumsfaktoren und Fibronectin zu nennen. Die epitheliotropen Effekte von Kälberblutpräparationen in Gelform (z. B. EYPROTOR, Lee´Pharm., Hongkong) sind bekannt. Sie haben jedoch den Nachteil, dass Konservierungsstoffe benutzt werden und zusätzlich das Risiko von Antigenität und BSE-Infektion vorliegt.

Topisch applizierte Medikamente können jedoch auch diverse Nebenwirkungen haben. Es kann zu Schmerzreiz durch Einbringen des Medikamentes, allergischer Reaktion, Keratitis superficialis punctata, kornealer Ablagerung und Pigmentierung, Inhibition der Tränenproduktion, Veränderung des physiologischen Gleichgewichts des Tränenfilmes, Veränderung des Milieus und Destabilisierung der verschiedenen Phasen des Tränenfilmes in unterschiedlichem Ausmaß kommen. Dies kann durch mehr oder weniger potentiell schädliche Agenzien, wie Konservierungsstoffe und Stabilisatoren, verursacht werden, die die Haltbarkeit und physikalischen Eigenschaften des Tränenersatzmittels verbessern sollen. Mitunter werden zur physikalischen Lösung von Stoffen verschiedene Salze verwendet, die zur Ablagerung von Mineralien im Gewebe führen. Diese Zusätze können allergische oder toxische Reaktionen verursachen oder unterstützen. Konservierungsmittel sollen die Haltbarkeitsdauer verlängern sowie die Infektionswahrscheinlichkeit senken. Häufig verwendet werden Benzalkoniumchlorid 0,01 % und Chlorbutanol 0,5 %. Sie haben nachgewiesener Maßen toxische Effekte, wie Apoptoseinduktion und Erhöhung der Permeabilität der epithelialen Grenzflächen und führen damit zur Schädigung des Lipidfilmes. Bei trockenem Auge ist die hochfrequente (mehr als dreimal tägliche) Anwendung konservierter Tränenersatzmittel daher ungeeignet bzw. kontraindiziert (60).

Antibiotika als Zusatzstoffe können ebenfalls toxisch auf den Zellverbund einwirken. Es besteht die Möglichkeit der lokalen Disposition von Metaboliten, z. B. Ciprofloxacin in der Kornea bei der Anwendung von AT (36). Topisch angewandte Anästhetika können direkt toxisch und indirekt über die Neurotophik wirken.

Bei einem Vergleich von verschiedenen Tränenersatzstoffen, wie Speichel, Serum, konservierter (mit BAC) und unkonservierter Hypromellose anhand einer humanen Hornhautepithelzelllinie, wies 100%iges Serum die geringste Toxizität auf, gefolgt von Speichel, unkonservierter und konservierter Hypromellose (27).

1.1.6 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) wurde für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt, weil es bei dieser Erkrankung gehäuft zu schlecht heilenden Augenoberflächenerkrankungen kommt.

Die RA gehört in den Formenkreis der systemischen Autoimmunerkrankungen. Etwa 2 % der Bevölkerung erkranken an einer RA, wobei Frauen deutlich häufiger als Männer betroffen sind bei einer Geschlechterverteilung von 3:1 bis 4:1. Die Systemerkrankung findet Ausdruck nicht nur in chronisch entzündlicher Gelenkdestruktion, Rheumaknötchen und Wirbelsäulenbeteiligung, sondern auch durch extraartikuläre Erscheinungen, wie korneale Ulzerationen. Gerade die Keratokonjunctivitis sicca tritt gehäuft im Zusammenhang mit RA als sekundäres Sjögren-Syndrom auf, wobei es durch leukozytäre Infiltration der Tränendrüse über einen nachfolgenden Tränenmangel zu Alterationen der Epithelschicht kommt. Obwohl die Prävalenz der RA in den letzten Jahrzehnten abzunehmen scheint und sich zumindest bei Frauen mit mildereren Symptomen präsentiert, sind schwere okuläre Manifestationen noch immer gefürchtete Komplikationen.

Dass bei der Entstehung dieser Krankheit besonders Zytokine eine entscheidende Rolle spielen, wird u. a. durch Berichte belegt, in denen Patienten unter Therapie mit Interferon- α und Interleukin-2 an einem rheumatoiden Syndrom erkrankten (50). Bei der Entstehung der RA spielen v. a. von T-Lymphozyten und Makrophagen produzierte proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF- α , eine große Rolle. Sie modulieren u. a. die Migration und B- und T-Zell-Aktivierung und sind nicht nur im entzündeten Gelenk in erhöhter Konzentration vorhanden, sondern ihr Serumspiegel korreliert auch mit der Schwere der Erkrankung. Sie sind beteiligt an der Stimulation der Synthese von Akute-Phase-Proteinen, wie CRP und Leukozyteninfiltration (7). BSG und CRP gelten als typische Marker der Akute-Phase-Reaktion. Rheumafaktoren (RF) sind Autoantikörper, die bei 80 % der RA-Patienten nachgewiesen werden können. Sie richten sich gegen das Fc-Fragment von IgG. Der Nachweis von RF geht einher mit erhöhter Schwere der Erkrankung.

Der Aktivitätsgrad der Erkrankung wird anhand verschiedener klinischer Indices bestimmt. Verbreitet ist hier u. a. der 28-joint Disease Activity Score (DAS-28), in dessen Berechnung nicht nur die Anzahl schmerzhafter und geschwollener Gelenke eingeht, sondern auch verschiedene Laborparameter, Schmerzangabe, Morgensteifigkeit und andere Komponenten. Der DAS-28 ist ein klinisch häufig genutzter Index. Die Schwere einer Erkrankung summiert sich also aus objektiven (Anzahl geschwollener Gelenke, Einschränkung der Freiheitsgrade der Gelenke, Entzündungsparameter) und subjektiven Teilaspekten (Schmerz, Kraft, allgemeines Krankheitsgefühl, Verlust von Lebensgefühl) (64). Wichtig ist die Eingruppierung des aktuellen Krankheitsaktivitätsgrades als Entscheidungshilfe, z. B. in der Änderung des medikamentösen Therapieregimes (59).

1.1.7 Immunsuppressive Medikation

Seit langem ist die systemische Immunsupprimierung ein fester Bestandteil der Therapie bei rheumatoider Arthritis. Eine häufig angewandte Medikation ist die Wirkstoffkombination aus Kortison und Methotrexat. Glukokortikoide wirken in niedrigen, physiologischen Konzentrationen stimulatorisch, in höheren, therapeutischen Dosen dagegen hemmend auf die Produktion von Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen (7, 25, 62). Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass Kortisongabe bei Mäusen zu einer verminderten und verzögerten Granulation und Epithelialisierung bei Hautwunden führte (10).

Steroide, wie Kortison, verhindern über eine Beeinflussung der Gentranskription verschiedener Zytokine, Peptide und Zelloberflächenrezeptoren eine überschießende Entzündungsreaktion durch Blockierung der Prostaglandinsynthese und haben besonders in höheren systemischen Dosen einen ausgeprägten inhibitorischen Einfluss auf die Wundheilung (3, 23, 62). Vor allem ihre inhibitorische Wirkung auf die frühe inflammatorische Phase bedingt den antiinflammatorischen Effekt und die Modulation der Wundheilung. Hierdurch wird die Rekrutierung, Chemotaxis und Aktivierung inflammatorischer Zellen gebremst (10). Das führt zu einem fehlenden bzw. geringer ausfallenden Anstieg der proinflammatorischen Zytokine. Bei Patienten mit RA, die, begründet durch ihren Zytokinstatus, per se ein höheres Risiko tragen, an schweren Augenoberflächendefekten zu erkranken, wird das Risiko einer Wundheilungsstörung durch systemische Immunsupprimierung mit Kortison noch erhöht. In vivo kann dies besonders bei persistierenden Epitheldefekten zu erhöhter Ulzerations- und Perforationsgefahr führen, die gefördert werden durch die negativen Effekte, die Steroide auf die Kollagensynthese und Keratinozytenproliferation ausüben (10, 25).

Ein anderes, häufig in der RA-Therapie eingesetztes Medikament ist Methotrexat (MTX). MTX inhibiert kompetitiv als Folsäureantagonist die Dihydrofolatreduktase, wirkt antiinflammatorisch und immunsuppressiv, indem es die B-Zell- und Makrophagenfunktion und die Neutrophilen-Chemotaxis hemmt. Bei Versuchen an Mäusen reduzierte MTX signifikant die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α - und Interferon- γ (54). Alarcon et al. (2) konnten in einer klinischen Doppelblindstudie nachweisen, dass MTX einen direkten Einfluss auf die RF-Produktion hat, nämlich eine Abnahme der IgM- und IgA-RF-Produktion bewirkt. Die klinische Besserung der Symptomatik korreliert jedoch nur mit sinkendem IgM-RF-Level. Sany et al. (63) untersuchten die Einflüsse von MTX auf die Wundheilung bei Rheumatikern nach orthopädischen Eingriffen. In der prospektiven Studie mit 64 Patienten ließ sich kein Hinweis auf verzögerte oder gestörte Wundheilung unter MTX-Medikation dokumentieren.

Ein weiteres häufig eingesetztes Medikament in der antirheumatischen Therapie ist Sulfasalazin. Unter Sulfasalazintherapie kommt es zu einem Absinken des IL-6-Spiegels im Serum von RA-Patienten (35).

1.1.8 Serum

Augenoberflächenerkrankungen, die eine Substitution durch Tränenersatzstoffe benötigen, sind eine der häufigsten Erkrankungen im augenärztlich klinischen Alltag. Frauen sind häufiger betroffen als Männer, Rheumapatienten häufiger als die Normalbevölkerung, wobei mit zunehmendem Lebensalter die Prävalenz steigt.

Ein idealer Tränenersatzstoff muss mehrere Anforderungen erfüllen: Er soll protektiv, nämlich befeuchtend und antiinfektiös, sowie nutritiv auf die Augenoberfläche wirken. Dazu soll er ohne potentiell schädigende Konservierungsstoffe auskommen und trotzdem über einen längeren Zeitpunkt stabil in der Wirkung bleiben. Außerdem darf er nicht allergisierend oder toxisch wirken. Solch eine Substanz konnte bisher nicht hergestellt werden. Nahe kommt diesen Anforderungen aber v. a. Serum.

Serum ist der flüssige, zellfreie Überstand, der sich nach Ablauf der normalen Blutgerinnung nach Zentrifugation von Vollblut über den korpuskulären Blutbestandteilen sammelt. Im Serum finden sich u. a. Nährstoffe, Elektrolyte, Enzyme, Hormone, Eiweiße, Immunglobuline, diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren, abhängig von den genauen Präparationsbedingungen. Unter sterilen Laborbedingungen kann die Serumgewinnung (wie in Material und Methoden dargestellt unter 2.2.2) durchgeführt und schließlich als Kleinverpackung applikationsgerecht als Serum-Augentropfen (AT) gelagert werden.

Serum bzw. Serumkomponenten, wie Albumin und Immunglobuline, sind bereits in vielen Bereichen der Medizin in therapeutischer Anwendung erprobt (58). Eingesetzt wurden Serum-AT bisher bei schwerem Tränenmangel, persistierenden Epitheldefekten und als adjuvante Therapie bei chirurgischen Rekonstruktionsverfahren der Augenoberfläche.

Als natürlicher Tränenersatzstoff enthält Serum wichtige Zytokine, die für die Gesunderhaltung der Augenoberfläche essentiell sind. Serum enthält viele Substanzen in höheren Konzentrationen als die natürliche Tränenflüssigkeit (29) (Tab. 2).

Tabelle 2: Vergleich von Tränenflüssigkeit und Serum*

	Tränenflüssigkeit	Serum
pH	7,4	7,4
Osmolalität	298	296
EGF (ng/ml)	0,2-3,0	0,5
TGF- β (ng/ml)	2-10	12206
Lysozym (mg/ml)	1,4	6
IgA (μ g/ml)	1190	2
Fibronektin (μ g/ml)	21	205

*Modifiziert nach Geerling et al. (29)

Unter der Überlegung, dass die für die Integrität der Augenoberfläche benötigten Wachstumsregulatoren des Tränenfilms auch im Serum vorhanden sind, führten zuerst Fox et al. (24) 1984 eine klinische Studie mit 15 Patienten durch, die an Sjögren Syndrom bzw. Keratokonjunctivitis sicca litten. Über drei Wochen wurden die Patienten 2-stündlich oder öfter mit autologen Serum-AT behandelt. Bei allen Patienten kam es zu einer subjektiven (weniger Brennen und Fremdkörpergefühl) und objektiven (kleiner werdende Epitheldefekte) Verbesserung. Keiner hatte jedoch eine komplette Remission oder war vollkommen beschwerdefrei.

Bei 12 Patienten mit trockenen Augen bei Sjögren-Syndrom brachte die topische Applikation von autologem Serum-AT signifikante therapeutische Erfolge bei der Behandlung von konjunktivaler Zellmetaplasie, Zellmembrandesintegrität und Störungen des Muzin-Filmes (69). Auch andere klinische Studien dokumentieren eine verkürzte Reepithelialisierungszeit bei vorher therapieresistenten epithelialen Defekten (58) sowie hohe Heilungsraten von 81 % (nach vorheriger erfolgloser maximal-konservativer Therapie) (22) bis zu 100 % (46).

Die Erfolgsraten in klinischen Studien werden jedoch als unterschiedlich bewertet. Das erklärt sich z. T. dadurch, dass unterschiedliche Herstellungsverfahren für Serum-AT genutzt wurden, was einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis hinsichtlich Effektivität, gemessen an Proliferation, Migration und Differenzierung, zu haben scheint. Zu den beeinflussbaren Faktoren gehört die Gerinnungszeit des Vollblutes, Zentrifugationsstärke, Verdünnungsmittel und Verdünnungsschritte. Ein einheitliches Protokoll für die Serum-Präparation ist deshalb sinnvoll (32), wie es von Geerling et al. (29) und Liu et al. (44) etabliert und publiziert wurde.

Die Behandlung mit autologem Serum gilt als eine nebenwirkungsarme Therapie. Nur wenige Studien berichten von Komplikationen: Bei 15 mit Serum-AT behandelten Patienten wurde ein Fall beschrieben, bei dem es bei einem Patienten mit RA und skleraler Vasculitis unter der Therapie zu einer Ausdünnung des skleralen Stromas kam (24). In einer anderen Studie wurden bei einem Patienten mit Epitheldefekt aufgrund einer rezidivierenden Herpes simplex Keratitis persistierende Stromainfiltrate und kristalline Immunglobulin-Ablagerungen dokumentiert (48). Bei einer anderen Patientin mit RA trat unter der Anwendung eine periphere Infiltration und Ulzeration auf (58). Es gibt weitere Einzelfallberichte von Patienten, bei denen es unter der Therapie mit Serum-AT zu lokalen Komplikationen kam, doch handelt es sich hierbei nur um einen kleinen Teil aller behandelten Patienten (29).

1.1.8.1 Vorteile topischer Serum-AT-Anwendung

Verschiedene Verletzungsmuster der Hornhaut benötigen unterschiedliche Behandlungsansätze, z. B. werden bei einer Zerstörung von Extrazellulärmatrix durch Alkaliverletzung Faktoren benötigt, die vor allem die Migration und stromale Festigkeit stimulieren und Proteasenaktivität reduzieren, während persistierende Epitheldefekte proliferations- und migrationsfördernde Faktoren benötigen. Da es schwierig ist, für jede einzelne Wunde ein kombiniertes Substrat aus passenden Agentien zu schaffen, bietet sich hier Serum als Pool verschiedenster Wachstumsfaktoren an, die je nach Bedarf wirken können (66). Autologes Serum kann durch seine ähnliche Viskosität, Zusammensetzung und Wirkung auf Hornhautepithelzellen als sehr geeigneter Tränenersatzstoff gelten. Im Zellversuch wurde die Überlegenheit von Serum gegenüber Plasma im Hinblick auf die fördernde Wirkung auf Proliferation, Differenzierung und Migration bei Hornhautepithelzellen nachgewiesen (31). Da Serum ohne potentiell schädigende Konservierungsstoffe auskommt, ist es von geringer Toxizität (27). Serumkomponenten werden als relativ stabil in ihrer Haltbarkeit eingeschätzt. Durch Messung des Gehalts an EGF, Vitamin A und TGF- β ließ sich eine Stabilität der Serumkomponenten bei Lagerung für mehr als einen Monat bei 4 °C bzw. für mehr als 3 Monate bei -20 °C nachweisen (69). Allerdings sollte die Serum-Präparation dunkel gelagert werden, um eine Zerstörung UV-empfindlicher Bestandteile zu vermeiden (22). Serum kann relativ einfach autolog gewonnen und zu Serum-Augentropfen verarbeitet werden.

Ein weiterer Vorteil der autologen Serum-Anwendung ist die Tatsache, dass Serum nicht allergisierend wirkt. Es besteht allerdings die Möglichkeit einer mikrobiellen Kontamination der Serum-AT, deren Häufigkeit als sehr gering eingestuft wird. Ursächlich ist hier der natürliche Gehalt an IgG, Lysozym und Komplement (24, 69). Da jedoch eine mikrobielle Kontamination nicht auszuschließen ist, bieten sich antibiotische Zusätze an. Diese können jedoch die epitheliotropen Eigenschaften der Serum-AT nachteilig beeinflussen. Deshalb scheint der tägliche Wechsel der Applikationsfläschchen die bessere Alternative zu sein. Serum-AT sind einfach anzuwenden, zu lagern, und sie sind kostengünstig. Eine Tagesdosis von Serum-AT bei 20%iger Verdünnung kostet ca. 2,27 €, bei 100 % Anwendung erhöhen sich die Kosten entsprechend (4,61 €). Diese Angaben sind ähnlich den Kosten von künstlichen Tränen (29).

1.1.8.2 Nachteile topischer Serum-AT-Anwendung

Nachteilig beim Serum im Vergleich zu Tränenflüssigkeit ist der relativ hohe Gehalt an TGF- β und eine andere Zusammensetzung der Inhaltsstoffe (27). TGF- β kommt im Serum in 5fach höherer Konzentration als in der Tränenflüssigkeit vor (stark abhängig von der Präparationsform), EGF dagegen in annähernd äquivalenten Dosen (69). Es ist be-

kannt, dass TGF- β in höheren Konzentrationen stark antiproliferativ wirkt, weshalb sich eine Verdünnung des Serums auf ein Niveau, vergleichbar dem der Tränenflüssigkeit, anbietet. Unverdünnt angewendetes Serum kann die Augen verkleben, was die Compliance herabsetzt (52). Die Serum-Herstellung ist mit Aufwand von Zeit und Arbeitskraft verbunden, da es nicht als standardisiertes Blutprodukt von Blutbanken erhältlich ist. Der Herstellungsprozess von Serum hat deutlichen Einfluss auf die Inhaltsstoffe (44). Eine schärfere Zentrifugation reduziert den Gehalt an TGF- β , aber erhöht den Gehalt an EGF und Vitamin A. Unbeeinflusst von der Zentrifugationsstärke bleiben PDGF-AB, Fibronectin und Vitamin E.

Eine serologische Prüfung der Vollblutprobe vor Herstellung der Serum-AT auf Infektionskrankheiten sollte erfolgen, da das medizinische Personal in Kontakt mit der Serum-Zubereitung kommen könnte (61), was potentiell das Risiko einer Übertragung von Infektionskrankheiten beinhaltet, wie geschehen im Fall eines Laborangestellten, der sich okular über Tröpfchen einer bearbeiteten Probe mit HIV infizierte (20).

1.1.9 Thrombozyten

Neben Serum enthält menschliches Blut auch korpuskuläre Bestandteile, die für die Wundheilung essenziell sind. Blutplättchen sind nicht nur beteiligt an der Blutstillung nach einem Gewebetrauma, sondern viele thrombozytäre Faktoren nehmen auch wichtige Rollen bei der nachfolgenden Wundheilung ein. Die verschiedenen Granulae in den Thrombozyten sind Speicherformen von Wachstumsfaktoren, Metaboliten, Zytokinen und Chemokinen (4, 43). Dichte Granulae enthalten Calcium als Kofaktor für die Thrombozytenaggregation und Bildung des Fibrinpfropfes, Serotonin als Vasokonstriktor und gefäßpermeabilitätssteigernden Faktor, pro- und antiinflammatorisch wirkendes Histamin. α -Granula enthalten Adhäsionsproteine, wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin, des Weiteren fibrinolytische Faktoren, wie Plasminogen, sowie Proteasen und Antiproteasen. Außerdem sind die α -Granulae die Speicher der mitogen wirkenden Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine wie PDGF, TGF- β , FGF, EGF, HGF, IL-8, IL-1 β und IGF-1. Zusätzlich sind auch Membranglykoproteine und bakterizid wie auch fungizid wirkende Proteine gespeichert. Die lysosomalen Granulae speichern verschiedene Enzyme, u. a. saure Hydrolasen und Elastasen.

Die wundheilungsunterstützende Wirkung von Serum-AT auf persistierende Augenerkrankungen wird dem Gehalt an Wachstumsfaktoren und Zytokinen zugeschrieben. Thrombozyten sind als eine reichhaltige Quelle von verschiedenen Wachstumsfaktoren bekannt. Es ist daher nahe liegend, diese Substanzen zur Unterstützung der Wundheilung zu nutzen. Seit vielen Jahren werden thrombozytäre Wachstumsfaktoren in vielen medizinischen Bereichen genutzt, z. B. lokal bei verschiedenen Wundheilungsstörungen.

Häufige Indikationen sind periphere Ulzerationen der unteren Extremität, dentale Implantationen in der craniofacialen Chirurgie sowie kosmetischen Chirurgie und orthopädische Operationen mit ossärer Rekonstruktionschirurgie (4, 68).

Als Quelle der Thrombozyten bieten sich aus Blutbanken erhältliche Thrombozytenkonzentrate (TK) an. TK, die durch Apherese gewonnen werden, sind ein qualitätskontrolliertes Blutprodukt und werden normalerweise zur i. v. Substitution bei Patienten mit Thrombozytenmangel, z. B. aufgrund einer Knochenmarkssuppression bei Chemotherapie oder i. R. einer Massenblutung, genutzt. Eine andere Form der Gewinnung der thrombozytären Wachstumsfaktoren besteht in der Herstellung von plättchenreichem Plasma unter Zusatz von Thrombin. Prinzipiell lassen sich mittels Apherese und Präparation von Vollblut zu plättchenreichem Plasma gleich hohe Konzentrationen an Blutplättchen und ihren Inhaltsstoffen erreichen (73), jedoch ist die TK-Gewinnung mittels Apherese ein bereits etabliertes Verfahren, in dem Thrombozyten in großen Mengen hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil der Thrombozytengewinnung mittels Apherese ist die Möglichkeit der autologen Spende, durch die das Infektionsrisiko minimiert wird. Bei Patienten, bei denen eine Eigenspende nicht möglich ist, bietet sich die konventionelle allogene Spende an (30). Das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten durch TK wird bei Hepatitis B mit 1:137.000, bei Hepatitis C mit 1:1.000.000 und bei HIV mit 1:1.900.000 beziffert. TK haben allerdings ein höheres Risiko der bakteriellen Kontamination als Erythrozytenkonzentrate, da sie wärmer aufbewahrt werden müssen. TK haben nur eine kurze Gebrauchsdauer von 5 Tagen für den klinischen Einsatz bei Thrombozytopenie, danach steigt das Risiko bakterieller Kontamination (15). Ein weiterer möglicher Risikofaktor in der Anwendung thrombozytärer Inhaltsstoffe liegt in der Verwendung von bovinem Thrombin während des Präparationsvorganges. Hier ist die Gefahr der Antikörperbildung sowie im Rahmen der BSE-Problematik die Übertragung der CJV-Variante gegeben. Humanes Thrombin ist daher dem bovinen Thrombin vorzuziehen (68). Es kommt aber v. a. auch sehr schnell zum Verlust des hämostatischen Potentials. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass auch nach Verfall des TK wegen Verlust der Hämostase-Regulation eine weitere Nutzung der enthaltenen wundheilungsfördernden Wachstumsfaktoren, Zytokine und Mediatoren möglich ist, da sich kein Unterschied hinsichtlich der Wirkung auf die Proliferation zwischen zwei Tage altem und 21 Tage altem Präparat darstellte (15). Alle TK, die älter als fünf Tage sind, werden verworfen, könnten aber weiter als Quelle von Wachstumsfaktoren genutzt werden. TK sind vom finanziellen Aufwand viel günstiger als rekombinante Faktoren allein oder synthetische Gemische. In der Herstellung kostet ein TK 800 Dollar. Ein abgelaufenes TK kostet nur noch 80 Dollar und enthält Substrat für die Therapie eines Patienten, abhängig von Größe und Lokalisation des Defekts für einen Monat (15).

Da die Blutplättchen auch proinflammatorische Mediatoren enthalten, müssen die Patienten gut beobachtet werden, um mögliche okuläre Inflammation frühzeitig zu bemerken. Des Weiteren sollte Vorsicht bei Patienten mit erhöhtem Thromboserisiko wegen möglicher prothrombotischer Effekte walten (4).

Modifizierte thrombozytenhaltige Produkte wurden bereits in den 90er Jahren in der Oralchirurgie eingesetzt. Thrombozyten und ihr Inhalt sind als therapeutisches Instrument zur Förderung der Wundheilung in verschiedenen Darreichungsformen herstellbar - als TK, Gel, Releasate oder Lysat. TK werden mittels Apherese gewonnen. In dieser Form können die thrombozytären Inhaltsstoffe aber nicht direkt lokal im Auge angewendet werden, da die Blutplättchen nur kurz haltbar sind und die korpuskulären Bestandteile bei einer Anreicherung zu Komplikationen führen könnten. Um die Wachstumsfaktoren lokal am Auge anwenden zu können, müssen sie aus der relativ instabilen Darreichungsform als TK in eine stabile, leicht am Auge anwendbare Präparation umgewandelt werden. Dabei werden die Thrombozyten stimuliert, damit sie ihre Inhaltsstoffe freisetzen, anschließend werden die korpuskulären Bestandteile (Thrombozytenhüllen) entfernt. Die Degradation der Granula lässt sich *in vitro* mittels Calciumgluconat oder Thrombin auslösen. Die gelösten Mediatoren befinden sich in einer klaren, transparenten und farblosen flüssigen Lösung, die eine mehrmals tägliche Anwendung erlaubt und über Monate kryokonserviert werden kann. Thrombozyten-Releasate als flüssiges Produkt entsteht, wenn die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin ausgelöst wird (51) - so wie es in den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, praktiziert wurde - wohingegen eine Zerstörung der Zellwand der Thrombozyten durch einen Gefrierungsprozess zu Lysat führt (13, 65).

Eine andere Anreicherungsform der thrombozytären Inhaltsstoffe besteht in der Verwendung von plättchenreichem Plasma, das entweder direkt angewendet wird oder aus dem die Thrombozyten vorher separiert werden. Plättchen-Gel entsteht, wenn plättchenreiches Plasma mit Thrombin und Calcium durch Fibrinverkettung eine gelatinöse Masse formt (17). Die enthaltenen Thrombozyten werden aktiviert und entlassen ihre enthaltenen Chemokine und Wachstumsfaktoren.

Schultz et al. (65) zeigten im Zellkulturmodell, dass Serum sowie Plättchenextrakt mitosestimulierend wirken, Plasma dagegen nicht. Daraus wurde geschlossen, dass die Wachstumsfaktoren in den Thrombozyten verantwortlich sind für die Mitosestimulierung des Serums, da diese Faktoren im Plasma fehlen. Dies legt nahe, dass Thrombozyten eine der Hauptquellen für die Mitogenese sind. In vielen experimentellen Studien ließ sich die wichtige Rolle der Blutplättchen in der Wundheilung demonstrieren. Als maßgeblich für den therapeutischen Erfolg wird hier v. a. der Gehalt an PDGF, TGF- β und EGF angesehen.

In einem retinalen Pigmentepithel-Zellkulturmodell wurden die überlegenen Wundheilungseffekte von autologem TK und PDGF gegenüber Serum hinsichtlich einer Steigerung der Proliferation und Migration belegt (70). Untersuchungen an Kreuzbandsehnenzellen bestätigten die Überlegenheit von Releasate einer plättchenreichen Präparation in der Proliferationsstimulierung gegenüber der plättchenarmen (5). In Tierversuchen wurde eine verbesserte Wundheilung in Rattenkorneas (40) und eine verkürzte Neupithelialisierungszeit von Hautwunden nach Behandlung mit Thrombozyten-Releasate (43) festgestellt. Bei diabetischen Ratten war Thrombozyten-Releasate ebenfalls in der Lage, die Qualität und Geschwindigkeit der diabetischen Wundheilung deutlich zu verbessern (51). Auch klinische Studien belegen die positiven Effekte von Plättchenpräparationen. Bei dehiszenten Sternotomiewunden konnte durch Plättchen-Gel die Heilungszeit halbiert und damit die Dauer des stationären Aufenthalts verkürzt werden (47). Bei Patienten mit kutanen Ulzera unterschiedlicher Ätiologie erzielte Plättchen-Gel sehr gute Erfolge hinsichtlich Schmerzreduktion, Wundverkleinerung und sogar kompletter Heilung (17).

Rekombinante Wachstumsfaktoren wurden in den letzten beiden Jahrzehnten häufig eingesetzt. Es ist bekannt, dass zusammen eingesetzte Wachstumsfaktoren häufig synergistische Effekte haben. Es konnte aber auch nachgewiesen werden, dass Thrombozyten-Releasate deutlich stärkere Effekte hat als Wachstumsfaktoren in gleicher Konzentration als Einzelsubstanz, wie Chan et al. (15) an einer Fibroblastenzellkultur zeigten.

1.2 Fragestellung

Viele Patienten mit schweren Augenoberflächenerkrankungen leiden an immunologischen Grunderkrankungen und hier insbesondere an rheumatoider Arthritis (RA). Ursächlich für die okuläre Symptomatik ist häufig ein schwerer Tränenmangel, bei dem die topische Applikation von artifiziellen Benetzungsmitteln oft nicht ausreichend ist, denn der natürliche Tränenfilm schützt die Augenoberfläche nicht nur vor Austrocknung und Irritation durch biomechanische und infektiöse Einflüsse, sondern hat auch eine ernährende Funktion. Ein idealer Tränenersatzstoff konnte bisher nicht pharmazeutisch hergestellt werden.

Als natürlicher Tränenersatzstoff enthält v. a. Serum wichtige Zytokine, die für die Erhaltung einer gesunden Augenoberfläche essentiell sind. Durch seine Zusammensetzung kommt es einem idealen Tränenersatzmittel nahe. Verschiedene Studien, vorrangig mit Patienten mit Sjögren-Syndrom und Keratokonjunctivitis sicca, dokumentierten Erfolge bei der Behandlung mit Serum-Augentropfen. Viele dieser immunologischen Erkrankungen - wie die RA - sind Zytokin-vermittelt und erfordern eine immunsuppressive Therapie. Bisher ist nicht geklärt, ob die Erkrankung an sich und/oder die medikamentöse Immunsuppression möglicherweise das Serum so verändern, dass sich hierdurch Veränderungen hinsichtlich der epitheliotrophen Kapazität von Serum-AT ergeben.

Thrombozyten gelten als Quelle verschiedenster im Serum enthaltener Wachstumsfaktoren und Zytokine. Thrombozytenkonzentrate werden bereits in unterschiedlichen Darreichungsformen bei chronischen Wunden der unteren Extremitäten eingesetzt (17). Es ist daher vorstellbar, dass sie bei topischer Anwendung einen positiven Effekt auf Augenerkrankungen haben könnten.

Die vorliegende Arbeit untersucht an Hand von in-vitro-Experimenten, ob auch das Serum von Patienten, die an einer immunologischen Grunderkrankung leiden und deshalb unter immunsuppressiver Therapie stehen, geeignet sein könnte für die Behandlung von Defekten der Augeneroberfläche, nämlich inwiefern sich Effekte auf die Eigenschaften einer humanen Hornhautepithelzelllinie nachweisen lassen. Des Weiteren wird geprüft, ob und welchen Einfluss ggf. thrombozytäre Inhaltsstoffe, gewonnen aus Thrombozytenkonzentraten in Form von Thrombozyten-Releasate, auf korneale epitheliale Wundheilungsvorgänge haben. Hierzu wurde die Konzentration einzelner Zytokine in Serum und Thrombozyten-Releasate sowie die Effekte dieser beiden Blutprodukte auf Wachstum, Migration und Differenzierung einer humanen Hornhautepithelzelllinie ermittelt, um folgende Kernfragen zu beantworten:

1. Hat eine immunologische Grunderkrankung wie die RA mit systemischer Immunsuppression Einfluss auf die Konzentration von epitheliotropen Faktoren/proinflammatorischen Zytokinen im Serum?
2. Wie verhalten sich die Konzentrationen der epitheliotropen Faktoren/proinflammatorischen Zytokine in Thrombozyten-Releasate, das aus Thrombozytenkonzentraten hergestellt wurde?
3. Bestehen Unterschiede in der epitheliotropen Kapazität zwischen den drei verschiedenen Blutprodukten (1. Serum gesunder Spender, 2. Serum RA-Erkrankter unter medikamentöser Immunsuppression, 3. Thrombozyten-Releasate)?
4. Korreliert der Gehalt ausgewählter Wachstumsfaktoren mit spezifischen Zellfunktionen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsgut, Versuchsplanung und statistische Auswertung

Die Probengewinnung erfolgte im Jahr 2003. Nach den damaligen Regeln für Anträge an die Ethikkommission wurde kein Antrag gestellt. Es wurden zehn Patienten mit RA, zehn gesunde Kontrollprobanden sowie zehn gesunde Thrombozytenspender identifiziert, denen einmalig Vollblut bzw. Thrombozyten entnommen wurden. Mit den Präparationen dieser Blut- bzw. Thrombozytenproben wurden die weiteren in-vitro-Versuche an einer humanen Korneaepithelzelllinie durchgeführt. Die Untersuchung wurde als Fall-Kontroll-Studie unter Angabe der entsprechenden demographischen Daten der Versuchsteilnehmer (Tab. 3) angelegt.

Tabelle 3: Demographische Daten der Versuchsteilnehmer

	RA-Patienten	Kontrollgruppe	Thrombozytenspender
Anzahl	10	10	10
Alter	49,3 (25 - 78)	49,5 (23 - 73)	29,6 (25 - 32)
Geschlecht (m:w)	3:7	3:7	10:0
Kortison	10	-	-
Methotrexat	10	-	-
Azulfidine	1	-	-

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie in der Gruppe der „RA-Patienten“ war die Diagnosestellung einer rheumatoiden Arthritis entsprechend den Kriterien der American Rheumatism Association (ARA) sowie eine aktuelle immunsuppressive Therapie. Alle RA-Patienten erhielten eine immunsupprimierende Therapie mit Methotrexat (7,5 - 25 mg/Woche) und Decortin (5 - 20 mg/d), in einem Fall zusätzlich Azulfidine (3 x 1 g/d).

Als Vergleichsgruppe zu den RA-Patienten diente eine „Kontrollgruppe“ aus zehn gesunden Probanden. Diese Probanden wurden nach dem Prinzip des individuellen Matching (matched pairs) ausgewählt (41), wobei Alter und Geschlecht, die nicht Gegenstand des Untersuchungsinteresses sind, als Confounder eliminiert wurden. Als Ausschlusskriterien galten akute oder chronische Erkrankungen, insbesondere Systemerkrankungen, Schwangerschaft oder Stillzeit, Hypotonieneigung und Medikation jeglicher Art.

Die dritte Untersuchungsgruppe bestand aus zehn „Thrombozytenspendern“. Die Thrombozytenkonzentrate wurden aus dem Routineprogramm der Blutspendezentrale der Universität zu Lübeck geliefert. Bei den Spendern handelte es sich größtenteils um Langzeit-spender, alle waren männlichen Geschlechts. Da zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine weiblichen Thrombozytenspender vorhanden waren und die Spender mehrheitlich sehr jung sind, war ein Matching zur Gruppe 1 und 2 nicht möglich.

Allen Spendern wurde ebenfalls Blut für orientierende Laboruntersuchungen (BSG, CRP, Blutbild, Gerinnungsstatus und Elektrolyte) entnommen.

Versuchsplanung Matching:

Bei der Auswahl der Fallgruppe bestand eine erhebliche Schwierigkeit, überhaupt ausreichend Patienten zu erhalten, die bereit waren, den entsprechenden Untersuchungen mit der Abnahme von 200 ml Blut zuzustimmen. Erst nach 8-wöchiger Suche gaben insgesamt zehn Patienten ihre schriftliche Einwilligung zu den entsprechenden Untersuchungen. Ihnen wurde jeweils 200 ml Vollblut abgenommen und den jeweiligen Untersuchungen zugeführt. Die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen ohnehin erforderlicher Probenahmen. Die Proben wurden umgehend anonymisiert gelagert und weiterverarbeitet.

Ebenfalls nicht unproblematisch war das Finden einer nichtexponierten Kontrollgruppe. Für das Matching wurde zu jedem der zehn Patienten ein nicht exponierter Proband gleichen Geschlechts und ungefähr gleichen Alters (Abweichung max. ± 5 Jahre) zugeordnet (Tab. 4). Die Kontrollgruppe besteht aus Probanden, die im Umkreis von bis zu 100 km von Lübeck akquiriert wurden.

Tabelle 4: Paarbildung zwischen Patienten und nichtexponierten Probanden

Geschlecht	Alter in a	Patient	Proband	Alter in a	Geschlecht	Altersdifferenz in a
w	78	1	5	73	w	5
w	38	2	4	40	w	2
w	34	3	6	38	w	4
m	64	4	9	62	m	2
m	49	5	7	51	m	2
w	55	6	10	57	w	2
w	25	7	3	23	w	2
m	51	8	2	51	m	0
w	45	9	1	50	w	5
w	52	10	8	50	w	2

Statistische Versuchsauswertung:

Um die Signifikanz der Versuchsergebnisse ermitteln zu können, wurden diese den entsprechenden statistischen Testroutinen unterworfen (Anl. 1). Angenommen wurden *nicht-parametrische Bedingungen* (das Vorhandensein der Normalverteilung der Daten wird hierbei nicht vorausgesetzt), was erfahrungsgemäß bei Kleinststichprobenumfängen zwischen 5 und 10 in der Regel gegeben ist (33).

- a. Vergleich Patienten- und Kontrollgruppe: Für den Einstichprobenfall und/oder gepaarte Daten bei kleinen Stichprobenumfängen ($n \geq 5$ bis 20) unter nichtparametrischen Bedingungen wurde der *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest* (Wilcoxon signed rank test, paired) eingesetzt (33).
- b. Problem Thrombozytenspender: Wie schon vorher festgestellt, war ein Matching zu den Thrombozytenspendern nicht möglich. Aus dem Reservoir der Blutspender

wurde daher eine Stichprobe mit gleichem Umfang wie bei den Patienten gezogen. Damit entsteht die Situation zweier unabhängiger Stichproben, bei denen aber die Wirkung der Confounder Alter und Geschlecht nicht ausgeschlossen werden kann. Für den Fall des Vergleichs zweier Stichproben im ungepaarten Fall bei kleinen Stichprobenumfängen (3 bis 20) unter nichtparametrischen Bedingungen wurde auf den *Wilcoxon-Rangsummentest* (Wilcoxon rank sum test, unpaired) zurückgegriffen (33). Allerdings dürfen die Stichprobenumfänge nicht kleiner als drei sein, um einseitige Alternativhypothesen prüfen zu können (bei zweiseitiger Alternativhypothesenprüfung n_1 bzw. n_2 mindestens vier).

- c. Korrelation innerhalb einer Stichprobe: Untersucht wurde auch die Korrelation zwischen den ermittelten Parametern innerhalb einer Stichprobe mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentests im Ein-Stichproben-Fall bei unbekannter Verteilung (33).

Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 5\%$ wurden als statistisch signifikant definiert.

Bei Annahme der Alternativhypothese (= Signifikanz) werden die konkreten p-Schwellenwerte bei i. d. R. zweiseitiger Fragestellung angegeben. Sollte nur bei einseitiger Fragestellung die Alternativhypothese angenommen werden, wird der p-Schwellenwert mit (e) = einseitig gekennzeichnet.

2.2. Untersuchungsmethodik

2.2.1. Bestimmung der Krankheitsaktivität der RA-Patienten

Die aktuelle Krankheitsaktivität der RA-Patienten wurde abgeschätzt anhand des Disease Activity Score (DAS 28), in dessen Berechnung die Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke (dG), der geschwollenen Gelenke (gG), die BSG in mm nach einer Stunde und ein subjektives Patientenurteil zur Krankheitsaktivität der letzten sieben Tage, dargestellt auf einer visuellen Skala von 0 bis 100 mm, eingehen.

Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\text{DAS 28} = 0,56 \times (\sqrt{\text{dG}}) + 0,28 \times (\sqrt{\text{gG}}) + 0,70 \times \ln(\text{BSG}) + \text{Patientenurteil in mm}$$

2.2.2. Gewinnung und Herstellung von Serum-Blutprodukten

Jedem Teilnehmer der Gruppe der RA-Patienten und der Kontrollgruppe wurden 200 ml Vollblut für die Serumpräparation und für orientierende Laboruntersuchungen aus BSG, CRP, kleinem Blutbild, Gerinnungsstatus und Elektrolyten entnommen. Die nicht-antikoagulierten Vollblutproben wurden für 120 Minuten bei 21 °C in sterilen Einmalbehältnissen aufbewahrt, um die möglichst vollständige Spontangerinnung abzuwarten. Danach wurden die Präparate bei 3.000 g für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand unter

sterilen Bedingungen separiert und das gewonnene Serum für die spätere Verwendung bei -70 °C tiefgefroren gelagert. Auch in den so gewonnenen Serumproben wurde eine Zellzählung („GenS Haematology Analyzer“ der Fa. Beckmann Coulter Inc., Fullerton, CA) durchgeführt.

2.2.3. Gewinnung und Herstellung von Thrombozyten-Releasate

Am Tag der Thrombozytenspende wurde den Thrombozytenspendern zusätzlich Blut für ein klinisches Labor entnommen, bestehend aus BSG, CRP, kleinem Blutbild, Gerinnungsstatus und Elektrolyten. Die TK wurden durch Einzel-Spende-Apharese mit einem Zellseparator der Fa. Amicus (Baxter, Deerfield, IL) gewonnen. Diese TK enthalten routinemäßig $2 - 3 \times 10^{11}$ Thrombozyten, gelöst in 200 ml Suspension.

Für die geplanten Versuche mussten die Thrombozytenkonzentrate zu einem Thrombozyten-Releasate weiter aufbereitet werden, da letztlich nur die thrombozytären Inhaltsstoffe benötigt wurden, nicht aber die Suspension und Thrombozytenhüllen. Die Thrombozyten wurden deshalb durch verschiedene Waschungen von der Suspension gereinigt und anschließend auf eine Konzentration von 4×10^9 Thrombozyten/ml verdünnt.

Hierzu wurden die suspendierten Thrombozyten am Tag der Thrombozytenspende in sterile 50 ml-Gefäße aliquotiert und für 15 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Diese relativ niedrige g-Zahl wurde gewählt, um nicht bereits durch den Vorgang der Zentrifugation die Thrombozytenmembranen zu schädigen und ein vorzeitiges Freisetzen der thrombozytären Inhaltsstoffe zu verhindern. Nachdem der Überstand verworfen und die Thrombozyten vorsichtig durch Schwenken in 20 ml Plättchen-Puffer (50 mmol/l HEPES, 10 mmol/l NaCl, 6 mmol/l KCL, 3 mmol/l Glucose und 0,35 % humanes Serum-Albumin) resuspendiert wurden, erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 800 g. Dieser Schritt wurde wiederholt und das gewonnene Hochkonzentrat von Thrombozyten schließlich in 10 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Thrombozytenkonzentration dieser Lösung an einem Zählautomaten der Blutbank („GenS Haematology Analyzer“, Beckmann Coulter Inc., Fullerton, CA) bestimmt. Um eine Zählung überhaupt zu ermöglichen, wurde eine 10 μ l-Probe mit 990 μ l PBS auf eine 1:100-Lösung verdünnt. Gemäß der bestimmten Konzentration wurde die Probe auf 4×10^9 Thrombozyten/ml mit PBS verdünnt. Danach erfolgte die Stimulation der Thrombozyten zur Freisetzung ihrer Inhaltsstoffe mit humanem Thrombin (1 U Thrombin/ml Thrombozytenlösung; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) und Inkubation für 20 Minuten bei 37 °C bis eine Ausflockung deutlich sichtbar wurde. Die nun leeren Thrombozytenhüllen wurden durch Zentrifugation bei 3.000 g für 15 Minuten von dem an thrombozytären Wachstumsfaktoren reichen Releasate separiert und das Releasate aliquotiert und eingefroren.

2.2.4. Chemikalien

Zur Wachstumsfaktorquantifizierung wurden ELISA-Kits für humanen Epidermal Growth Factor (EGF), humanen Fibroblast Growth Factor (FGF), humanen Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF-AB) von R&D Systems, (Minneapolis, USA), Transforming Growth Factor-beta-1 (TGF- β 1) von Bender MedSystems (Wien, Österreich), Interleukin 6 (IL-6) von Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK) und Fibronectin von Chemikon International (Temecula, USA) genutzt. Das Gesamtprotein wurde mittels Bradford-Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories, Cambridge, MA) bestimmt.

Für die Zellkultur wurden Kulturschalen der Fa. Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Ham's F12 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland), MEM Eagle (Fa. Gibco, Grand Island, New York, USA), foetales Rinderserum (Fa. Gibco, Grand Island, New York, USA), Penizillin (Fa. Gibco, Grand Island, New York, USA) (10.000 Einheiten), Streptomycin (Fa. Gibco, Grand Island, New York, USA) (10.000 μ g) und Amphotericin B (Fa. Gibco, Grand Island, New York, USA) (25 μ g), gelöst in 0,85 % NaCl in einem Mischverhältnis von 1 mg/100 ml Medium, Fa. Gibco (Grand Island, New York, USA) und Defined KSFM der Firma Gibco (Grand Island, New York, USA) verwendet. EGF, Cholera-Toxin und Insulin wurden von der Firma Sigma (St. Louis, USA) bezogen. HEPES-Puffer und FBS stammten von der Firma Gibco-BRL, die restlichen Agenzien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Poole, UK) bezogen. Zur Passagierung der Zellen wurde Trypsin/EDTA der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) verwendet. Zellextraktionsreagenz, Luziferin-Luziferase, Rekonstitutionspuffer und ATP-Standard für die Quantifizierung des zellulären ATP-Gehalts stammten von der Firma DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, Deutschland). Nach Passagierung wurden die Zellen für die eigentlichen Untersuchungen in 96-Loch-Platten (code 3595, Costar, Cambridge, MA) ausgesät. Für den Migrationsassay wurden Silikonzyylinder („Flexiperm“) der Fa. Heraeus (Osterode, Deutschland), die Färbelösung Hämalaun nach Mayer der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) und Kollagen I der Fa. Sigma (St. Louis, USA) verwendet. Für die Raster-elektronenmikroskopie kamen Thermanox-Kulturträger (Fa. Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark), Fixans nach Monti-Graziadei (Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) sowie eine Sputter-Anlage (Fa. Balzers, Lichtenstein) mit Platin-Targets (Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland) (Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck) zur Anwendung.

2.2.5. Quantifizierung der Wachstumsfaktoren und Zytokine

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mittels Bradford-Protein-Assay bestimmt und mit Hilfe einer dupliziert mitgeführten Standardreihe berechnet.

In jeder Serumprobe wurde EGF, HGF, FGF, TGF- β 1, PDGF-AB, Fibronectin und IL-6 mittels handelsüblicher, qualitätskontrollierter Enzym-Immunoassay-Technik (ELISA) quantifiziert, bei der eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit immobilisierten, monoklonalen Antikörpern gegen den jeweils zu messenden Parameter beschichtet war. Gemäß der Anleitung des entsprechenden Herstellers wurden je 200 μ l Standard in Duplikaten und je 200 μ l Proben in Triplikaten auf die 96-Lochplatte aufgetragen und nach vorgeschriebener Inkubationszeit durch Waschung entfernt. Nach erneuter Inkubation mit einem enzymgebundenen, polyklonalen, spezifischen sekundären Antikörper erfolgte wieder eine Waschung zur Entfernung aller ungebundenen Antikörper-Enzym-Verbindungen. Anschließend wurde die Substratlösung des entsprechenden ELISA-Kits hinzugefügt und der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 450 nm (ELISA-Reader FLUOstar OPTIMA, bmg Lab-Technologies, Jena, Deutschland) quantifiziert. Entsprechend der mitgeführten Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Konzentration des jeweiligen Wachstumsfaktors in der Probe berechnet wurde. Beim kompetitiven Fibronectin-ELISA verhielt sich der Gehalt an Fibronectin in der Probe invers proportional zur Farbintensität, während bei allen anderen ELISA eine direkte Proportionalität vorlag.

Vitamin A und E wurden mit Hilfe einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Dazu wurden die verschiedenen Serumproben, Kontrollen und Standards (Fa. Chromsystems) im Wellenlängenbereich von 190-800 nm gemessen (Diodenarray-Detektor L-4500, Hochleistungs-UV/VIS-Detektor) (Institut für Klinische Chemie, Universität zu Lübeck).

2.2.6. Zellkulturmodell

Da Primärkulturen humaner Hornhautepithelzellen bei eingeschränktem Materialzugang nur schwer zu etablieren sind und meist nach ein oder zwei Passagen ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren, wurden die Versuche an einem Kulturmodell SV-40 immortalisierter kornealer Epithelzellen (RCB1384, HCE-T, Riken Cell Bank, Ibaraki, Japan) durchgeführt. Diese Zelllinie, ursprünglich von Araki-Sasaki entwickelt (6), besteht aus Zellklonen, die durch Immortalisierungstechniken hergestellt wurden. Diese Zellklone sind unbegrenzt passagierbar, wobei sie die originären Eigenschaften der Spenderzelle beibehalten. Das heißt, es handelt sich weiterhin um nicht verhornende Epithelzellen, wobei sie je nach Wachstumsdauer und Platz in der Zellkultur auch eine Mehrschichtigkeit erreichen, die jedoch nicht der in-vivo-Histologie eines Hornhautepithels entspricht. Die Zellform ist polygonal, die Kerne sind prominent vorgewölbt. Zelldifferenzierung und Stoffwechselprozesse entsprechen denen der Primärkultur, wobei lediglich die Zellverdopplungszeit, welche in der Primärkultur 8 - 13 h entspricht, auf 24,4 h verlängert wurde. In-vitro-Versuche haben den Vorteil, dass sie unter standardisierten, stabilen Bedingungen häufig wieder-

holt werden können. Andererseits können sie nicht das komplexe Zusammenspiel der lebenden Augenoberfläche mit dem natürlichen Tränenfilm in Gänze simulieren. In diesem Zellkulturmodell wurde der Einfluss von Serumproben auf Proliferation, Migration und Differenzierung in Dosis- und Zeit-Wirkungs-Experimenten untersucht (6, 27). Die Zellen wurden bei 5 % CO₂, 95 % O₂ und 37 °C in Kulturmedium bestehend aus 1:1 Ham's F12 und MEM, unter Zusatz von 25 mM HEPES Puffer, 5 % fötalem Rinderserum (FBS), 1 ml Antibiotikum/Antimykotikum pro 100 ml Medium, 0,01 % EGF, 0,22 % Insulin und 0,01 % Cholera-toxin kultiviert (im Weiteren nur noch Anzuchtmedium genannt). Das Anzuchtmedium wurde alle 48 bis 72 h ausgetauscht und die Zellen bei Konfluenz mit Hilfe von 5 mg/ml Trypsin-EDTA (Biochrom) und 5 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor im Verhältnis 1:3 passagiert. Weitere Medien, die zur Kultivierung genutzt wurden, waren definiertes Wachstumsmedium (Defined KSFM, Wachstumsfaktorzusatz) und ein albuminhaltiges Minimalmedium (sMM) (1:1 Ham's F12 und MEM, 1 % Serum-Albumin). Alle Kulturmedien und Testsubstanzen enthielten Antibiotikum/Antimykotikum in einer Konzentration von 1 ml/100 ml Medium.

2.2.7. Endpunktassays

2.2.7.1. Proliferation

Zur Quantifizierung der Proliferation diente ein Luziferin-Luziferase (Lu-Lu) basierter Lumineszenz-Assay, der die Biolumineszenz des zellulären ATP misst. ATP als ein zentraler Bestandteil des zellulären Energiestoffwechsels gilt als Indikator für die metabolisch aktive, lebende Zelle. Zelluntergang bzw. Substratmangel führen zu sinkendem ATP-Spiegel. In der Nachweisreaktion wird die Zelle lysiert. Das so freigesetzte zelluläre ATP geht mit der Lu-Lu einen chemischen Prozess ein, an dessen Ende eine Lichtemission steht. Diese Emission wird photometrisch detektiert und korreliert mit dem anfänglich zellulär gebundenen ATP. Die ATP-Menge korreliert wiederum direkt mit der Zellzahl und kann somit auch als Maß für die Proliferation genutzt werden (16). Die Lu-Lu-Reaktion ist der früher verwendeten Messung der Aufnahme von Radioisotopen durch eine Vereinfachung der Reaktion überlegen.

Für den Assay wurden die Zellen, nach Aussaat auf 96-Loch-Platten (Falcon, Plymouth, UK) mit 3.000 Zellen/Loch, zunächst in 200 µl Anzuchtmedium für 24 h inkubiert. Danach erfolgte eine 24-stündige Inkubation in albuminhaltigem Minimalmedium (sMM). Nach 2-maliger Waschung mit PBS wurden pro Loch einer 96-Loch-Platte 200 µl Probe in Triplicaten pipettiert. Als positive Kontrolle (maximale Wachstumsförderung) diente definiertes Wachstumsmedium, als negative Kontrolle (maximale Wachstumshemmung) eine 1%ige Benzalkoniumchlorid-Lösung (BAC) (27).

Für die Dosis-Wirkungs-Experimente wurden die Zellen mit den unverdünnten (100 %) und mit 0,9 % NaCl zu 50 %, 25 %, 12,5 %, 6 % und 3 % verdünnten Konzentrationen der Testpräparate über 24 Stunden inkubiert. Für die Zeit-Wirkungs-Experimente wurden die Zellen mit einer 20 % -Verdünnung der Testpräparate (mit 0,9 % NaCl) verschieden lang (0 h, 2 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Testpräparat abgesaugt, die Löcher wurden zweimal mit PBS gewaschen und pro Loch erneut 200 µl PBS aufgetragen und 50 µl Tumorzell-Extraktionsreagenz (TCE) (Fa. DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland) zur Extraktion des intrazellulären ATP hinzugefügt. Nach raschem Durchmischen und Inkubation der Platten für 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Platten bis zur Auswertung bei -70 °C tiefgefroren. Nach dem lichtgeschützten Auftauen der Platten wurden Zellysate-Aliquots zu je 25 µl auf weiße Half-Area-Platten (Dynex, Chantilla, VA, USA) übertragen und 1:1 mit je 25 µl Luziferin-Luziferase-Reagenz versetzt, gemischt und sofort die Lumineszenz bzw. der ATP-Gehalt mit Hilfe eines Lumineszenz-Plattenlesegerätes (FLUOstar Optima, bmg Lab-Technologies; Offenburg, Deutschland) gemessen. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Eine Standardreihe einer Stammlösung von 250 ng/ml und anschließender 1:3 serieller Verdünnung wurde mitgeführt.

Aus dem Mittelwert der Triplikate jeder Testsituation (Test) wurde unter Bezug auf den mittleren ATP-Gehalt der negativen (MI) und positiven (MO) Kontrolle der prozentuale ATP-Gehalt als Maß für das Zellwachstum (% ZW) errechnet:

$$\% \text{ ZW} = [(\text{Test-MI}) / (\text{MO-MI})] \times 100$$

Der prozentuale Variationskoeffizient wurde als Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

2.2.7.2. Migration

Die Migration der humanen Hornhautepithelzellen unter Einfluss der Testsubstanzen wurde in einem Kolonie-Dispensions-Assay untersucht. Dazu wurden 6-Loch-Zellkulturplatten mit 700 µl 0,01%iger Kollagen-I-Lösung (Sigma-Aldrich) pro Loch beschichtet. Auf dieser Beschichtung wurden pro Loch 3 Silikonzyylinder (flexiPERM micro 12, Vivascience, Sartorius, Göttingen, Deutschland) fixiert, diese mit je 10.000 Zellen pro Zylinder in je 150 µl Anzuchtmedium besät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert, so dass standardisiert große Zellhöfe entstanden. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die weitere Proliferation der Zellen durch Zugabe von 150 µl einer 200 µM Hydroxyurea-Lösung (Sigma-Aldrich) zum Anzuchtmedium vollständig inhibiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, Entfernung der Medium-Hydroxyurea-Lösung und vorsichtiger 2-maliger Wäsche mit PBS wurden pro Zylinder 150 µl Defined KFSM aufgetragen. Nach erneuter 24-stündiger Inkubation wurden die Zylinder entfernt und die Zellkulturen 3-mal mit PBS

gewaschen, bevor die Zellen mit den verdünnten (25 %, 0,9%iger NaCl-Lösung als Diluent) oder unverdünnten Testlösungen (100 %) jeweils in Triplikaten inkubiert wurden. Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 144 h wurden die Kulturen mit 90%igem Methanol für 10 Minuten fixiert und für 30 Minuten mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt. Nach Auswaschen der Färbelösung mit PBS wurden die Zellhöfe unter standardisierten Bedingungen digital fotografiert (Digital Still Camera, Sony DSC-S75) und anhand des Programms Uthesca Image Tool, Version 2.00 alpha die Fläche der Zellhöfe ausgemessen. Dabei dienten die Flächen der Zellhöfe zum Zeitpunkt 0 h als Bezugspunkt von 100 %. Die Flächen zum Zeitpunkt 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 144 h wurden dazu in Relation gesetzt.

2.2.7.3. Differenzierung

Die Differenzierung der Epithelzelloberflächen wurde rasterelektronenmikroskopisch beurteilt (27). Dazu wurden 24-Loch-Zellkulturplatten mit Thermanox-Plättchen bestückt und auf diesen 60.000 Zellen pro Loch in je 500 µl Anzuchtmedium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurden das Anzuchtmedium durch ein serumhaltiges Minimalmedium ersetzt und die Zellen erneut für 24 h inkubiert. Nach 2-maliger Waschung mit PBS wurden die verdünnten Serumproben und Thrombozyten-Releasateproben in Triplikaten aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle diente definiertes Kulturmedium, als Negativ-Kontrolle 0,9%ige NaCl-Lösung. Der Versuch wurde nach 48 h durch Waschung mit PBS und Fixierung mit der Lösung nach Monti-Graziadei (2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer bei pH 7,4) gestoppt, die Zellkulturen in aufsteigender Acetonreihe entwässert und einer Kritischen-Punkt-Trocknung sowie abschließenden Platin-Palladium-Beschichtung unterzogen. Die Untersuchung des morphologischen Wachstumsverhaltens sowie der zellulären Oberflächenbeschaffenheit erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop SEM 505 (Fa. Phillips, Eindhoven, Niederlande) bei einer Spannung von 10 bis 15 kV. Die Befunde wurden auf APX 100 Filmen (Agfa, Deutschland) dokumentiert. Dabei entspricht ein weißer Balken am unteren Bildrand 0,1 mm im Original.

Kriterien, nach denen die Zellformationen beurteilt wurden, waren die Formung eines kohärenten Zellrasens mit polygonal geformten Epithelzellen, die Intaktheit von Zellformationen, Zell-Zell-Kontakte und im Besonderen die Dichte der Ausprägung von Microvilli als deutlichstes Zeichen einer Zelldifferenzierung.

3. ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen

Allen Versuchsteilnehmern wurde zusätzlich zu den für die Versuche selbst vorgesehenen Blutproben (Vollblut bzw. Thrombozyten) auch Blut für orientierende Untersuchungen der klinischen Chemie abgenommen. Bestimmt wurden die Entzündungsparameter CRP und BSG, Blutbild sowie Gerinnungsstatus und Elektrolyte. Von den Ergebnissen der zehn Individuen einer Gruppe wurde jeweils der Mittelwert errechnet (Tab. 5). Angegeben ist zusätzlich die Konfidenz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 %. Signifikante Unterschiede wurden durch die entsprechenden p-Schwellenwerte gekennzeichnet.

Tabelle 5: Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen

Laborwerte (Einheit)	BSG (mm/h)	p	CRP (mg/l)	p	Leukozyten (/nl)	p	Erythrozyten (/pl)	p
Patienten	37,40 ± 17,16*	0,03 (e)	22,85 ± 19,57		9,50 ± 1,05*	0,0001	4,29 ± 0,32	
gesunde Probanden	15,40 ± 9,38 [#]	0,0234	4,10 ± 3,48 [#]	0,042 (e)	6,81 ± 1,16		4,82 ± 0,87	
Thrombozyten-Releasate	4,30 ± 2,39°	0,0009	0,90 ± 1,21°	0,0032	7,91 ± 1,61°	0,0349 (e)	4,79 ± 0,21°	0,0113

Laborwerte (Einheit)	Hb (g/dl)	p	Hkt	p	MCV (fl)	p	MCH (pg)	p
Patienten	12,99 ± 1,32		0,39 ± 0,03		90,90 ± 4,07		29,83 ± 1,70	
gesunde Probanden	13,63 ± 1,17		0,38 ± 0,03 [#]	0,0127	84,48 ± 3,76		30,04 ± 1,17	
Thrombozyten-Releasate	14,40 ± 0,47		0,42 ± 0,01		87,63 ± 3,59		30,20 ± 1,40	

Laborwerte (Einheit)	MCHC (g/l)	p	Thrombozyten/nl (pg/ml)	p	Q (%)	p	INR	p
Patienten	327,70 ± 8,85*	0,0001	357,00 ± 53,20*	0,0030	94,20 ± 5,06*	0,0001	0,99 ± 0,05	
gesunde Probanden	355,60 ± 3,86 [#]	0,0025	216,80 ± 63,48 [#]	0,0127	100,80 ± 4,04		1,11 ± 0,20	
Thrombozyten-Releasate	344,30 ± 5,04°	0,0052	310,40 ± 32,16		99,70 ± 5,29		1,03 ± 0,06	

Laborwerte (Einheit)	PTT (sec)	p	Na (mmol/l)	p	K (mmol/l)	p	Ca (mmol/l)	p
Patienten	31,94 ± 1,56*	0,0001	140,70 ± 1,30		4,23 ± 0,22		2,34 ± 0,07	
gesunde Probanden	23,60 ± 1,47 [#]	0,0007	139,30 ± 0,99		4,25 ± 0,46		2,39 ± 0,06	
Thrombozyten-Releasate	27,80 ± 0,93°	0,0007	140,40 ± 0,90		4,02 ± 0,17		2,35 ± 0,04	

Signifikanz Patienten-Kontrollgruppe: * (p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung; (e) = einseitige Fragestellung)

Signifikanz Patienten-Thrombozytenspender: ° (p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung; (e) = einseitige Fragestellung)

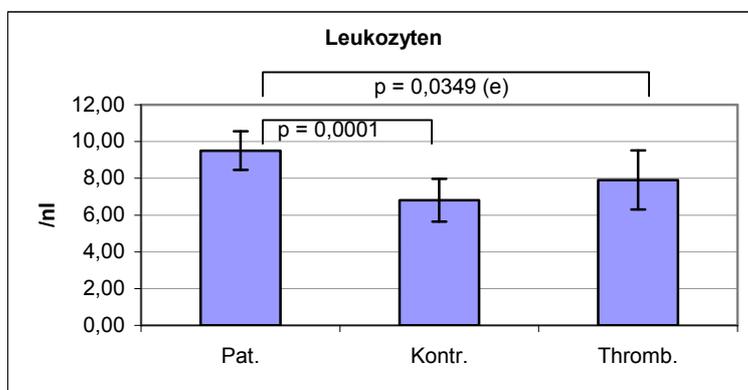
Signifikanz Kontrollgruppe-Thrombozytenspender: [#] (p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung; (e) = einseitige Fragestellung)

Die Rohdaten sämtlicher Ergebnisse wurden für jede Gruppe zusammengefasst (Anl. 2, Tab. 12 - Patientengruppe, Tab. 13 - Kontrollgruppe, Tab. 14 - Gruppe der Thrombozytenspender). Graphische Darstellungen der Einzelergebnisse, die keine relevanten Zusatzinformationen liefern, wurden im folgenden Text nicht abgebildet (Anl. 2, Abb. 33 bis Abb. 44).

Bei den orientierenden Laboruntersuchungen der RA-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe wurde festgestellt, dass Patientenblut signifikant ($p = 0,0001$) mehr Leukozyten enthielt als das der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 1). Insgesamt fünf RA-Patienten wiesen eine Leukozytose über 10 Leukozyten/nl auf, in der Kontrollgruppe waren sämtliche Leukozytenwerte im Normbereich. Auch die BSG (Abb. 2) der RA-Patienten war signifikant erhöht ($p = 0,0300$ (e)). Pathologische Werte über 11 mm/h bei Frauen bzw. 8 mm/h

bei Männern fanden sich bei acht der zehn RA-Patienten. Demgegenüber standen sieben gesunde Probanden mit pathologischer BSG, wobei die Einzelwerte insgesamt aber deutlich geringer ausfielen (Mittelwert der Patienten 37,4 mm/h, Mittelwert der Kontrollgruppe 15,4 mm/h). RA-Patienten wiesen im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant erhöhte ($p = 0,0001$) PTT-Werte (Anl. 2, Abb. 40) auf, MCHC ($p = 0,0001$) (Anl. 2, Abb. 37) und Quick ($p = 0,0001$) (Anl. 2, Abb. 39) waren signifikant erniedrigt. Weiterhin ließ sich eine tendenzielle Erhöhung hinsichtlich der Werte des CRP (Abb. 3) und des MCV (Anl. 2, Abb. 35) bei den RA-Patienten nachweisen, der Unterschied zu den Werten der Kontrollgruppe war jedoch nicht statistisch signifikant. Insgesamt fand sich bei sechs der zehn RA-Patienten ein pathologischer CRP-Wert über 5 mg/l, bei der Kontrollgruppe hatten drei Teilnehmer erhöhte CRP-Werte (Mittelwert der RA-Patienten 22,85 mg/l, Mittelwert der Kontrollgruppe 4,1 mg/l). Gegenüber der Kontrollgruppe waren die Thrombozytenwerte der RA-Patienten ($p = 0,0030$) ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 4). Vier Patienten zeigten eine milde Thrombozytose über 400/nl, ebenso ein Teilnehmer der Kontrollgruppe. Es fand sich kein statistischer Unterschied bei der Betrachtung der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins, des Hämatokrits, des MCH sowie des INR, ebenso wenig für Natrium, Kalium und Calcium (Anl. 2, Abb. 41 bis 43).

Abbildung 1: Ergebnisse der Leukozytenzahl-Bestimmung



Darstellung der Mittelwerte mit Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls bei RA-Patienten, Kontrollgruppe und Thrombozytenspendern.

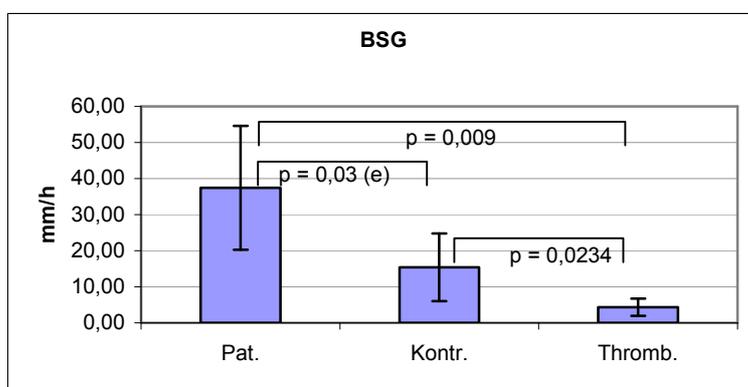
□ signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Um die Vollständigkeit der Gerinnung zu belegen und zu prüfen, inwieweit noch Blutzellen im Serum enthalten waren, wurde das Serum direkt nach Herstellung ebenfalls einer Zellzählung unterzogen. Dabei fanden sich im Serum von Patienten und Kontrollgruppe nach Zentrifugation nur noch gleiche, minimale Mengen an Thrombozytenhüllen.

Vergleicht man in einem zweiten Schritt nun die Gruppe der Thrombozytenspender mit den RA-Patienten lässt sich feststellen, dass die RA-Patienten signifikant höhere CRP-Werte ($p = 0,0032$) (Abb. 3) aufwiesen (Mittelwert der RA-Patienten 22,85 mg/l, Mittelwert

der Thrombozytenspender 0,9 mg/l). Bei den Thrombozytenspendern fand sich lediglich ein Teilnehmer mit einer milden CRP-Erhöhung gegenüber sechs RA-Patienten mit zum Teil stark erhöhten Werten. RA-Patienten hatten ebenfalls signifikant erhöhte BSG-Werte ($p = 0,0009$) im Vergleich mit den Thrombozytenspendern (Abb. 2). Die BSG aller Thrombozytenspender befand sich im Normbereich, während bei acht RA-Patienten pathologische Werte gemessen wurden. RA-Patienten hatten im Vergleich mit den Thrombozytenspendern ebenfalls signifikant erhöhte ($p = 0,0349$ (e)) Leukozytenzahlen (Tab. 5, Abb. 1). Fünf RA-Patienten mit Leukozytose stehen einem Thrombozytenspender mit Leukozytose gegenüber. Thrombozytenspender hatten dagegen signifikant mehr Erythrozyten ($p = 0,0113$) als die RA-Patienten, wobei sich bei sechs Patienten und bei einem Thrombozytenspender pathologisch niedrige Werte fanden (Anl. 2, Abb. 33). Nicht signifikant unterschieden sich RA-Patienten und Thrombozytenspender hinsichtlich Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH und Quick sowie Natrium, Kalium und Calcium (Anl. 2, Abb. 41 bis 43). Thrombozytenspender wiesen bei der Thrombozytenzahl deutlich niedrigere Werte auf als die RA-Patienten (Abb. 4), aber wieder war der Unterschied nicht als statistisch signifikant zu werten.

Abbildung 2: Ergebnisse der BSG-Bestimmung



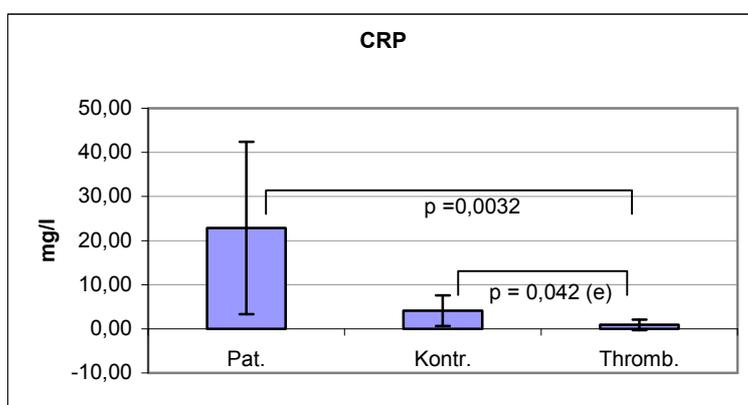
Darstellung der Mittelwerte mit Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls bei RA-Patienten, Kontrollgruppe und Thrombozytenspendern.

signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Ein weiterer Vergleich von Thrombozytenspendern und gesunder Kontrollgruppe zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede, obwohl sich beide Gruppen ähnlich sind in der Hinsicht, dass sie gemäß der Definition gesund sein müssten. Trotzdem hatten die Teilnehmer der Kontrollgruppe signifikant höhere Werte ($p = 0,0234$) für die BSG (Abb. 2). Es finden sich vier Probanden mit pathologisch erhöhten Werten, aber keiner in der Thrombozytenspender-Gruppe (Mittelwert der Kontrollgruppe 15,4 mm/h, Mittelwert der Thrombozytenspender 4,3 mm/h). Auch bei der CRP-Bestimmung erreichten die Probanden ($p = 0,0420$ (e)) signifikant höhere Werte (Mittelwert der Kontrollgruppe 4,1 mg/l, Mittelwert der Thrombozytenspender 0,9 mg/l) (Abb. 3). Dagegen fielen Thrombozytenspender durch eine signifikante Erhöhung der Thrombozytenzahl gegenüber der Kontrollgruppe ($p =$

0,0127) auf (Mittelwert der Kontrollgruppe 216,8/nl, Mittelwert der Thrombozytenspender 310,4/nl) (Abb. 4). In beiden Gruppen fand sich nur jeweils ein Teilnehmer mit einer milden Thrombozytose. Kein statistischer Unterschied fand sich bei der Bestimmung der Leukozytenzahl der Kontrollgruppe und der Thrombozytenspender (Abb. 1). Lediglich ein Thrombozytenspender wies eine milde Leukozytose auf, alle Teilnehmer der Kontrollgruppe zeigten normale Werte. Kontrollgruppe und Thrombozytenspender unterschieden sich ferner nicht bei den Ergebnissen der Erythrozytenzahlbestimmung, Hämoglobin, MCV und MCH, den Gerinnungsparametern Quick und INR sowie den Elektrolyten Natrium, Kalium und Calcium (Anl. 2, Abb. 41 bis 43).

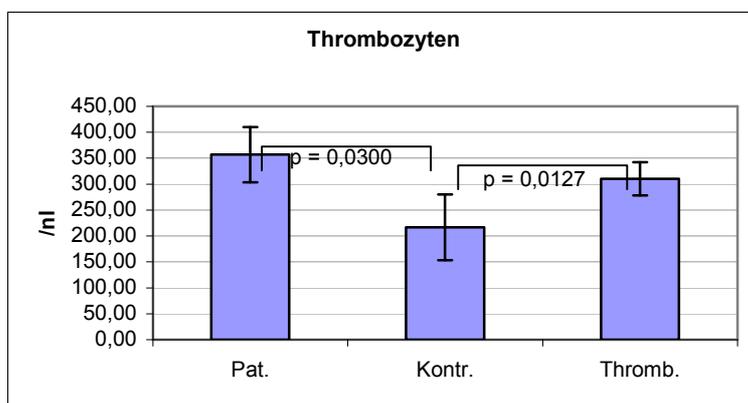
Abbildung 3: Ergebnisse der CRP-Bestimmung



Darstellung der Mittelwerte mit Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls bei RA-Patienten, Kontrollgruppe und Thrombozytenspendern.

signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 4: Ergebnisse der Thrombozytenzahl-Bestimmung



Darstellung der Mittelwerte mit Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls bei RA-Patienten, Kontrollgruppe und Thrombozytenspendern.

signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Zusammenfassend hatten die RA-Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere Leukozyten- und Thrombozytenzahlen. PTT und BSG waren ebenfalls signifikant erhöht, CRP zumindest tendenziell erhöht, Quick und MCHC signifikant vermindert. Kein statistischer Unterschied zeigte sich bei Betrachtung der Parameter der restlichen roten Reihe, der Elektrolyte sowie übriger Gerinnungsparameter.

Im Vergleich mit den TK-Spendern fielen die RA-Patienten durch signifikant höhere Werte bei CRP, BSG, Leukozytenzahlen und PTT auf, wohingegen TK-Spender signifikant hö-

here Erythrozytenzahlen und MCHC erreichten. Zwischen diesen beiden Gruppen fand sich kein statistischer Unterschied hinsichtlich Hb, Thrombozytenzahl, Elektrolyten, INR und anderen Gerinnungsparametern.

Ein Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe der TK-Spender zeigte, dass die Kontrollindividuen signifikant höhere Werte bei BSG, CRP und PTT erreichten, wogegen TK-Spender signifikant höhere Thrombozytenzahlen und Werte beim MCHC hatten. Kein Unterschied fand sich bei der Bestimmung von Leukozyten- und Erythrozytenzahlen, Hb, übrigen Gerinnungsparametern und Elektrolyten.

3.2 Krankheitsaktivität der RA-Patienten

Zur Abschätzung der Krankheitsaktivität wurde der DAS-28 herangezogen. Gemäß den DAS-28-Kriterien zeigen Werte $\leq 3,2$ eine inaktive RA an, Werte $> 3,2 \leq 5,1$ sprechen für mäßige Krankheitsaktivität und $> 5,1$ für eine sehr aktive RA. Der mittlere DAS-28 lag bei 5,58 (Tab. 6).

Tabelle 6: Krankheitsaktivität der RA-Patienten nach DAS-28

Patient	DAS-28	Krankheitsaktivität
1	5,20	sehr aktiv
2	4,69	mäßig aktiv
3	5,49	sehr aktiv
4	5,33	sehr aktiv
5	6,21	sehr aktiv
6	6,06	sehr aktiv
7	6,31	sehr aktiv
8	6,11	sehr aktiv
9	5,54	sehr aktiv
10	4,81	mäßig aktiv

3.3 Ermittlung ausgewählter Wachstumsfaktoren, Vitamine und Zytokine

Zur Bestimmung des Gehaltes an Wachstumsfaktoren, Zytokinen bzw. Vitaminen wurden die Proben aus Serum und Thrombozyten-Releasate verschiedenen Quantifizierungen mittels ELISA- bzw. HPLC-Technik unterzogen, wobei als Ergebnis die Mittelwerte der Gruppen sowie das Konfidenzintervall und die Signifikanz ausgewiesen werden (Tab. 7). Die Einzelergebnisse der Messungen sind für jede Gruppe im Anhang zusammengefasst (Anl. 3, Tab. 15 bis Tab. 17).

Tabelle 7: Gehalt an Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Vitaminen

	Gesamtproteingehalt (mg/ml)			p	EGF (pg/ml)			p	
Patienten	305,19	±	57,08	*	0,0100	819,28	±	286,55	
Kontrollgruppe	540,32	±	52,94	#	0,0002	745,74	±	285,02	#
Thrombozyten-Releasate	3,69	±	1,28	°	0,0002	1.457,24	±	209,15	°
	FGF (pg/ml)			p	HGF (pg/ml)			p	
Patienten	16,46	±	5,50			932,20	±	566,07	
Kontrollgruppe	18,11	±	4,97	#	0,0032	740,16	±	162,11	#
Thrombozyten-Releasate	43,49	±	14,22	°	0,0032	164,51	±	102,35	°
	PDGF (pg/ml)			p	TGF-β1 (pg/ml)			p	
Patienten	16.511,30	±	4.292,86			41.768,82	±	2.478,37	*
Kontrollgruppe	15.447,85	±	3.559,34	#	0,0002	46.100,45	±	2.001,40	#
Thrombozyten-Releasate	95.055,00	±	18.281,42	°	0,0002	309.768,24	±	80.329,19	°
	Fibronektin (ng/ml)			p	IL-6 (pg/ml)			p	
Patienten	279.146,96	±	25.482,57	*	0,0010	5,85	±	3,68	
Kontrollgruppe	438.619,40	±	42.726,99	#	0,0002	1,29	±	0,73	
Thrombozyten-Releasate	6.375,21	±	1.049,78	°	0,0002	unterhalb der Nachweisgrenze			
	Vitamin A (µmol/l)			p	Vitamin E (µmol/l)			p	
Patienten	3,57	±	0,69			38,21	±	11,65	
Kontrollgruppe	3,45	±	0,58	#	0,0002	33,52	±	5,45	#
Thrombozyten-Releasate	0,06	±	0,02	°	0,0002	0,44	±	0,10	°

Signifikanz Patienten-Kontrollgruppe: * (p - zweiseitige Fragestellung)

Signifikanz Patienten-Thrombozytenspender: ° (p - zweiseitige Fragestellung)

Signifikanz Kontrollgruppe-Thrombozytenspender: # (p - zweiseitige Fragestellung)

Ein Vergleich der beiden Serumpräparationen untereinander zeigte, dass der Gesamtproteingehalt von Serum bei der Gruppe der RA-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,0100) signifikant vermindert war (Abb. 5). Thrombozyten-Releasate enthielt nur kleine Mengen an Protein, ungefähr einem Hundertstel der Serummenge entsprechend. Der Unterschied zu beiden Serumgruppen ist signifikant (p jeweils 0,0002).

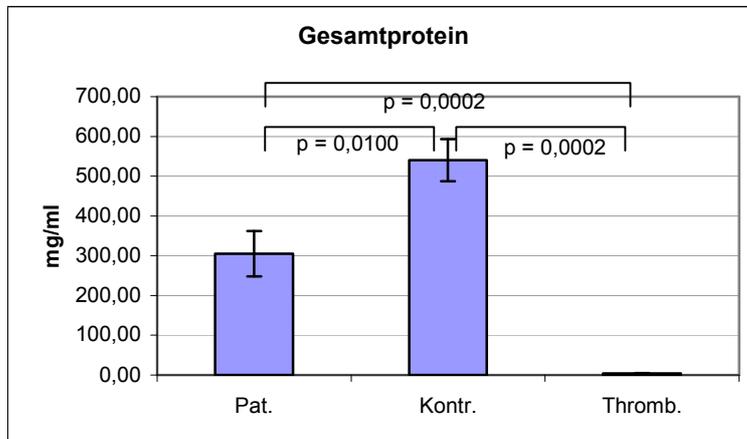
Das Serum von RA-Patienten wies gegenüber dem der Kontrollgruppe minimal erhöhte Konzentrationen an EGF auf (Abb. 6), statistisch unterscheiden sich beide Gruppen aber nicht signifikant voneinander. Thrombozyten-Releasate dagegen enthielt signifikant mehr (etwa doppelt so viel) EGF als das Serum von RA-Patienten (p = 0,0041) und Kontrollgruppe (p = 0,0020).

Der FGF-Gehalt in beiden Serumgruppen unterschied sich nur wenig (Abb. 7). Tendenziell war die FGF-Konzentration in der Kontrollgruppe gegenüber der Gruppe der RA-Patienten erhöht, der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant. Thrombozyten-Releasate hingegen enthielt signifikant mehr FGF als RA-Patienten (p = 0,0032) und Kontrollgruppe (p = 0,0032), mit 43,49 pg/ml nämlich mehr als doppelt so viel.

HGF fand sich im RA-Patienten-Serum zwar in höheren Mengen als im Serum der Kontrollgruppe, die Werte unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (Abb. 8). Es scheint aber eine Tendenz zu höheren HGF-Werten bei RA-Patienten vorzuliegen. Signifikant weniger HGF war in Thrombozyten-Releasate (p = 0,0012 in Bezug auf RA-

Patienten und $p = 0,0004$ in Bezug auf die Kontrollgruppe) enthalten. Der Mittelwert der Gruppe beträgt nur etwa ein Sechstel des Mittelwertes der RA-Patienten-Gruppe.

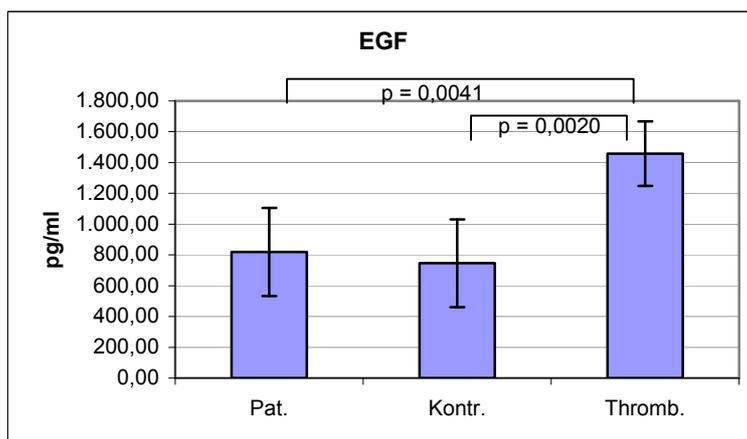
Abbildung 5: Gesamtproteingehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate



Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

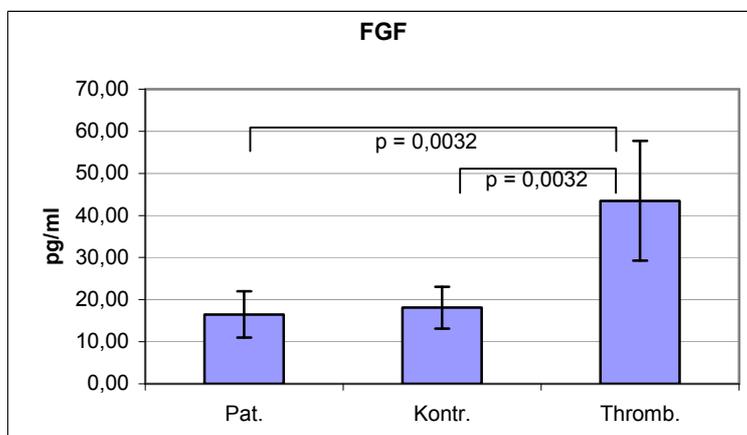
Abbildung 6: EGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate



Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

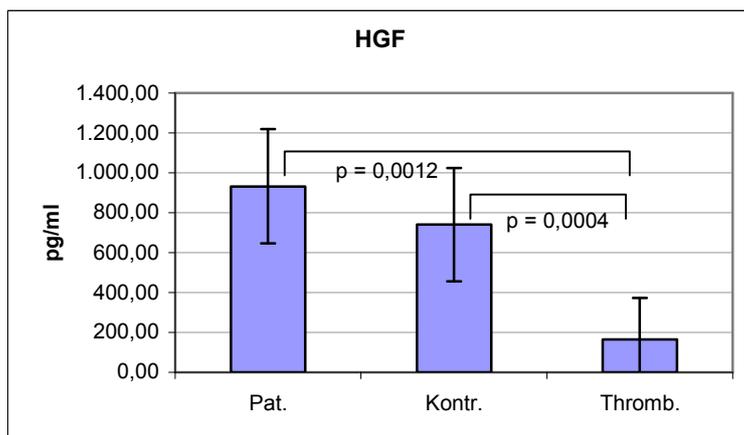
signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 7: FGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate



Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 8: HGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate

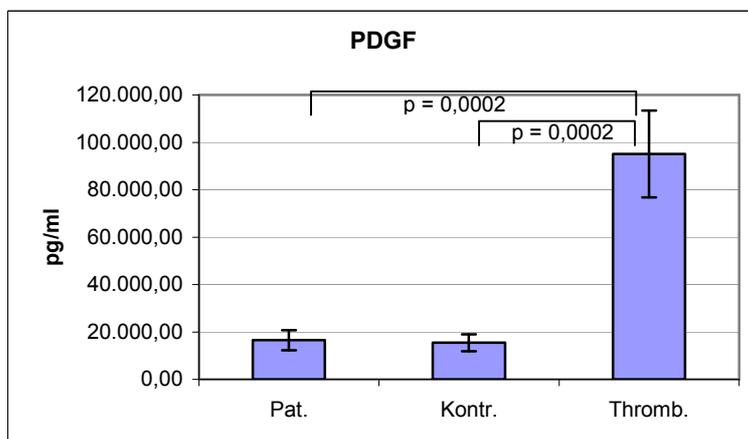
Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

□ signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

In den Messungen fanden sich statistisch gleiche PDGF-Konzentrationen bei RA-Patienten und Kontrollgruppe (Abb. 9). In den Thrombozyten-Releasate war der PDGF-Spiegel gegenüber beiden Serumgruppen signifikant erhöht (p jeweils 0,0002), Serum enthält nur knapp ein Sechstel der PDGF-Menge von Thrombozyten-Releasate.

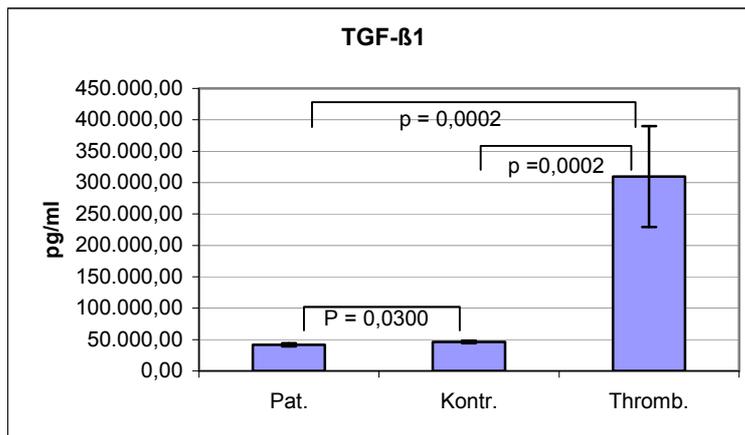
Bei den durchgeführten Messungen war der Gehalt an TGF- β im Patientenserum signifikant niedriger (p = 0,0300) als im Serum der Kontrollgruppe (Abb. 10). In Thrombozyten-Releasate war TGF- β in wesentlich höheren Mengen messbar. Der Unterschied zu Serum ist statistisch signifikant (p jeweils 0,0002). In Serum war nur ca. ein Siebtel der TGF- β -Menge von Thrombozyten-Releasate enthalten.

Bei der Quantifizierung des Fibronectin-Gehalts fiel auf, dass das Serum von RA-Patienten signifikant weniger Fibronectin enthielt (p = 0,0010) als das Serum der gesunden Kontrollgruppe. Gesunde Probanden hatten fast doppelt so hohe Fibronectin-Konzentrationen im Serum verglichen mit RA-Patienten (Abb. 11). Thrombozyten-Releasate enthielt dagegen signifikant weniger (p jeweils 0,0002) und mit 6,38 $\mu\text{g/ml}$ nur einen Bruchteil der Fibronectinmenge, die im Serum vorhanden war.

Abbildung 9: PDGF-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate

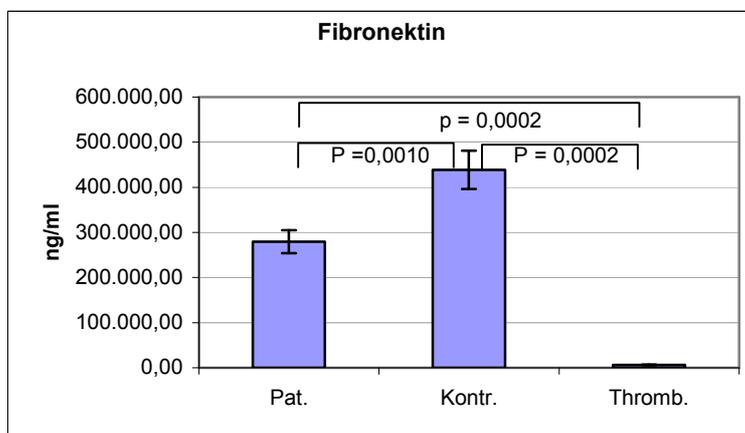
Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

□ signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 10: TGF- β -Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

— signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 11: Fibronektin-Gehalt von Serum bzw. Thombozyten-Releasate

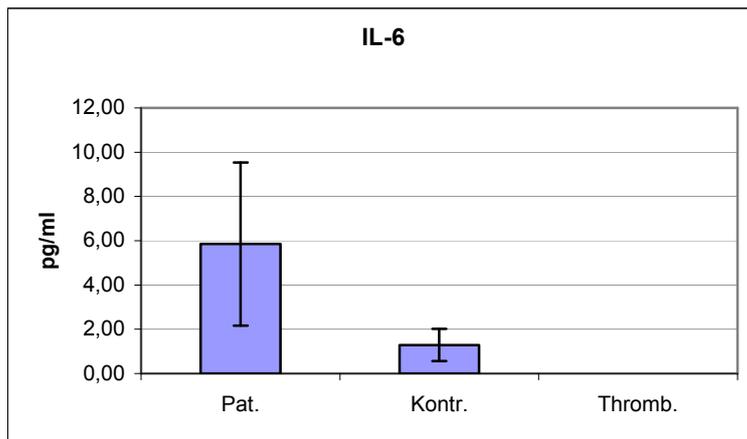
Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

— signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Der Serum-Gehalt an IL-6 war in der Patientengruppe höher, aber nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 12). Es ist anzumerken, dass bei zwei RA-Patienten und vier Kontrollprobanden die IL-6-Werte unterhalb der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze von 0,6 pg/ml lagen. In der Gruppe der Thrombozyten-Releasate war bei keiner Probe IL-6 nachweisbar; alle Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,6 pg/ml.

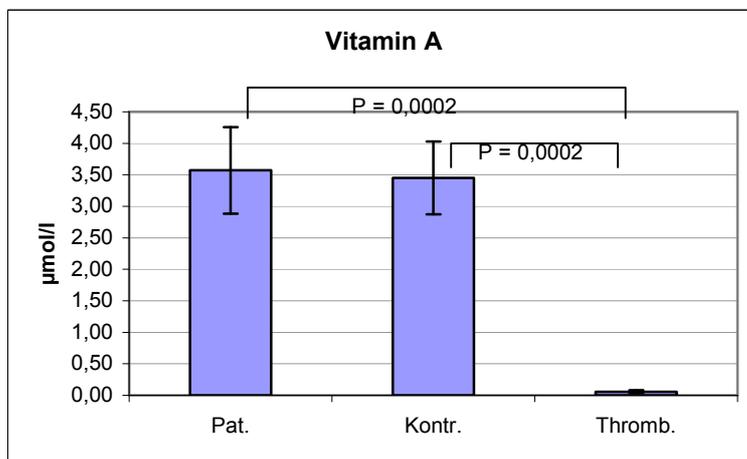
Das Serum von Patienten und Probanden enthielt statistisch gleiche Konzentrationen an Vitamin A (Abb. 13). In Thrombozyten-Releasate fand sich nur ein Bruchteil der im Serum enthaltenen Menge. Der Unterschied zwischen Serum und Thrombozyten-Releasate hinsichtlich des Vitamin A-Gehalts ist signifikant (p jeweils 0,0002).

Vitamin E ist im Serum von RA-Patienten nicht signifikant erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 14). Wie beim Vitamin A war auch Vitamin E nur in minimalen Mengen in Thrombozyten-Releasate nachweisbar. Dieser Unterschied zu den beiden Serumgruppen ist signifikant (p jeweils 0,0002).

Abbildung 12: IL-6-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate

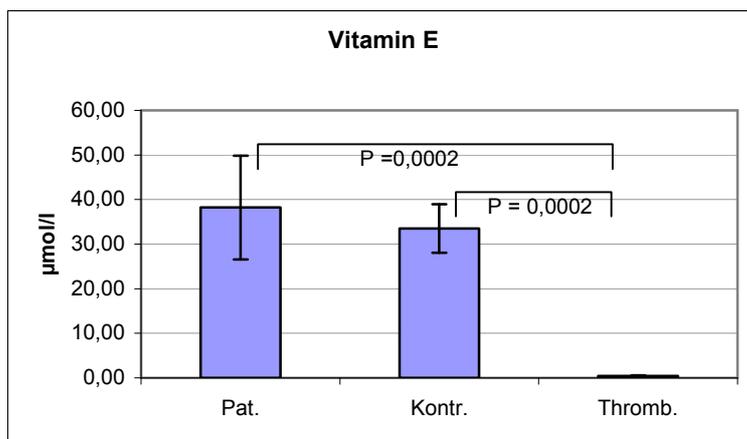
Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

□ signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 13: Vitamin A-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

□ signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Abbildung 14: Vitamin E-Gehalt von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des Konfidenzintervalls.

□ signifik. Unterschied
(p - i.d.R.zweiseitige Fragestellung;
(e) = einseitige Fragestellung)

Zusammenfassend fanden sich in den Untersuchungen bei gesunden Spendern der Kontrollgruppe signifikant höhere Mengen an Fibronectin, TGF- β 1, Gesamtprotein und tendenziell mehr FGF als im Serum von immunsupprimierten RA-Patienten. RA-

Patientenserum enthielt dagegen mehr Vitamin E sowie tendenziell höhere Mengen an HGF, PDGF, EGF, IL-6 und Vitamin A verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe.

Vergleicht man die beiden Serumgruppen mit dem Thrombozyten-Releasate, zeigt sich, dass sich diese beiden Präparationsarten im Gehalt der einzelnen Mediatoren deutlicher differenzieren. So unterschieden sich die Thrombozyten-Releasate-Proben in allen untersuchten Faktoren signifikant von den RA-Patienten und der Kontrollgruppe. Dabei erreichten sie höhere Konzentrationen an den in den Thrombozytengranulae gespeicherten Mediatoren, wie PDGF, EGF, FGF und TGF- β , während die Serumproben der RA-Patienten und Kontrollgruppe mehr HGF, Gesamtprotein, Vitamin A, Vitamin E und Fibronectin enthielten.

3.4 Proliferation

3.4.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um einen dosisabhängigen Effekt der Blutprodukte auf die Proliferation der Zellkultur zu messen, wurden alle Präparationen unverdünnt oder mit 0,9 % NaCl auf 3 %, 6 %, 12,5 %, 25 % und 50 % verdünnt aufgetragen. Nach 24 h-Inkubation wurde der ATP-Gehalt als Maß für die Proliferation der Zellen gemessen.

Die Einzelergebnisse der Messungen sind für die Patientengruppe, die Kontrollgruppe und Thrombozyten-Releasate-Gruppe zusammengefasst (Anl. 4, Tab. 18 bis 20). Zusätzlich wurden von allen drei Gruppen die Mittelwerte, deren Konfidenz sowie die Signifikanz angegeben. Dargestellt ist hierbei die Zunahme von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen der Testsubstanzen unter Angabe der Konfidenz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Tab. 8).

Tabelle 8: Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zuwachs an ATP in %									
Verdünnung der Testsubstanz	3 %		p	6 %		p	12,5 %		p
Patienten	0,15	± 0,29		0,40	± 0,22 *	0,0500	12,28	± 4,46	
Kontrollgruppe	0,08	± 0,10 #	0,0004	0,80	± 0,25 #	0,0330	16,46	± 5,59 #	0,0008
Thrombozyten-Releasate	2,96	± 1,28 °	0,0060	1,56	± 0,60 °	0,0014	3,58	± 2,10 °	0,0100

Verdünnung der Testsubstanz	25 %		p	50 %		p	100 %		p
Patienten	10,12	± 4,68		6,62	± 3,90		4,87	± 1,58	
Kontrollgruppe	9,67	± 3,47		3,72	± 2,05 #	0,0060	4,60	± 1,52 #	0,0045
Thrombozyten-Releasate	15,31	± 10,58		27,61	± 17,64 °	0,0026	31,25	± 11,21 °	0,0004

Signifikanz Patienten-Kontrollgruppe: * (p - zweiseitige Fragestellung)

Signifikanz Patienten-Thrombozytenspender: ° (p - zweiseitige Fragestellung)

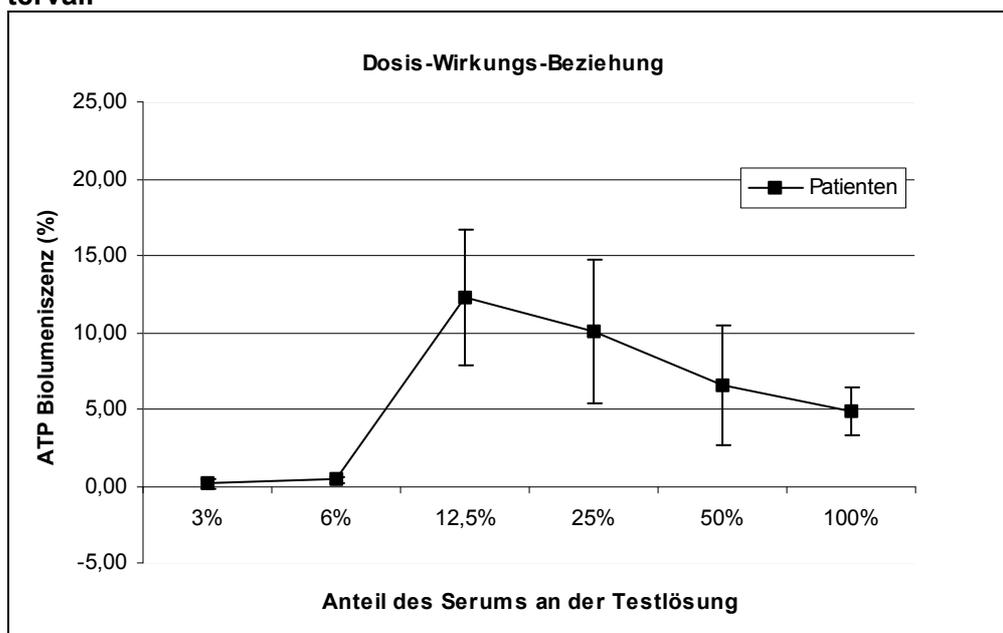
Signifikanz Kontrollgruppe-Thrombozytenspender: # (p - zweiseitige Fragestellung)

Im Folgenden wird jede Gruppe einzeln für sich betrachtet, bevor ein Vergleich der drei Gruppen untereinander stattfindet.

Der Verlauf der Proliferationskurve der humanen Hornhautepithelzellen unter Einfluss von Serum von RA-Patienten zeigt, dass es innerhalb des 24-stündigen Versuchsablaufes bei

jeder Testlösung zu einem Zuwachs des zellulären ATP kam (Abb. 15). Mit Testlösung sind in diesem Zusammenhang die verschiedenen Verdünnungen des Serums der RA-Patienten mit isotoner NaCl-Lösung gemeint. Bei keiner der Testlösungen kam es mikroskopisch betrachtet zu einem Ablösen der Zellen bzw. bei Messung der ATP-Biolumineszenz zu einem Abfall des ATP im Vergleich zum Ausgangswert. Der Grad der Verdünnung hat einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum. Die Wachstumskurve ist nicht linear. Am wenigsten proliferieren die Zellen bei einer sehr starken Verdünnung des Serums. Bei 3 % bzw. 6 %-Serum-Gehalt der Testlösung ist der ATP-Zuwachs nur minimal, die Proliferation wurde so gut wie gar nicht stimuliert. Von 6 % zu 12,5 % kommt es zu einem sehr steilen Anstieg der Wachstumskurve, die bei 12,5 % ihr Maximum erreicht (12,28 %), um dann mit steigendem Serum-Anteil an der Testlösung wieder abzufallen. Der Abfall der Kurve zwischen 12,5 % und 100 % ist jedoch deutlich flacher als der Anstieg zwischen 3 % und 12,5 %. Die Ergebnisse der 25%igen Lösung fallen nur um wenig schlechter aus als bei der optimalen 12,5%igen Verdünnung. Bei einer 50%igen Verdünnung ist der ATP-Zuwachs nur noch etwa halb so groß. Wird das Serum nicht mit NaCl verdünnt, also pur aufgetragen, beträgt der ATP-Zuwachs sogar nur noch ca. ein Drittel der Menge, die bei einer 12,5%igen Verdünnung erreicht werden kann. Optimale Bedingungen zur Unterstützung der Proliferation finden die Zellen also bei einer Lösung, die 12,5 % Serum enthält.

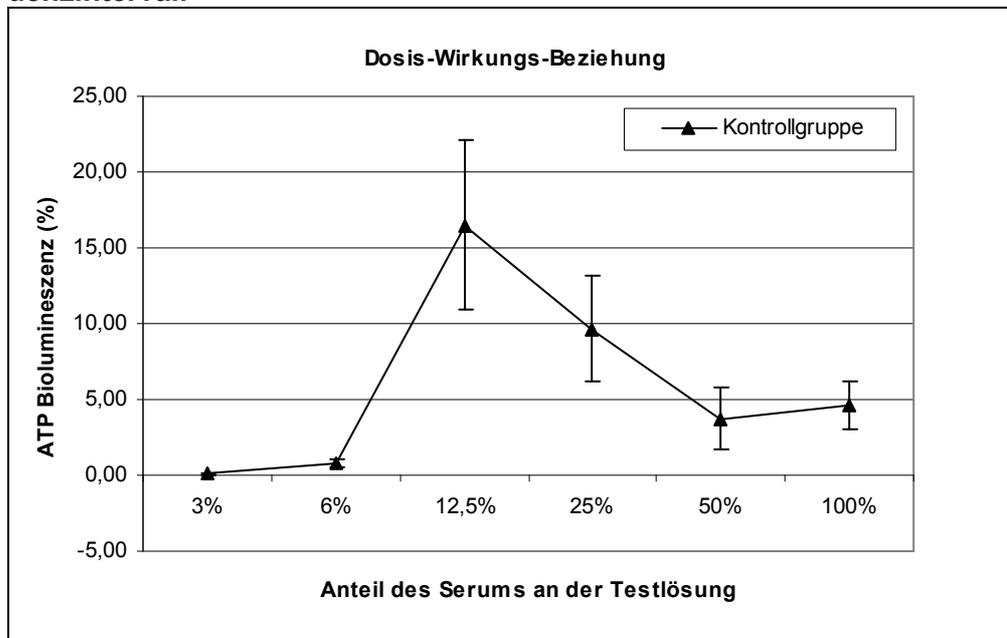
Abbildung 15: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von RA-Patienten-Serum unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Wenn man nun die Proliferationskurve der Zellen unter Einfluss des Serums der Kontrollgruppe betrachtet, fällt vor allem die offensichtliche Ähnlichkeit des Verlaufs mit der Kurve

der RA-Patienten auf. Auch bei der Kontrollgruppe wirken alle Verdünnungen stimulierend auf die Zellproliferation, sichtbar gemacht am ATP-Zuwachs (Abb. 16). Wie auch beim Serum der RA-Patienten wirkt sich eine sehr starke Verdünnung des Serums der gesunden Probanden nur schwach positiv auf die Proliferation aus. Bei 3 % und 6 % Serum-Anteil an der Testlösung lässt sich nur ein minimaler Zuwachs der ATP-Biolumineszenz messen. Es folgt ein steiler Anstieg bei 12,5 % Verdünnung (16,46 %). Dies ist die optimale Verdünnung, bei der eine maximale Proliferation stattfindet. Mit weiter steigendem Serum-Anteil an der Testlösung verringert sich die Proliferationspotenz. Bei einer 50%igen Serum-Lösung wird nur noch ca. ein Viertel der maximal möglichen ATP-Biolumineszenz erreicht. Bei der unverdünnten Serum-Anwendung steigt die Kurve nochmals gering an.

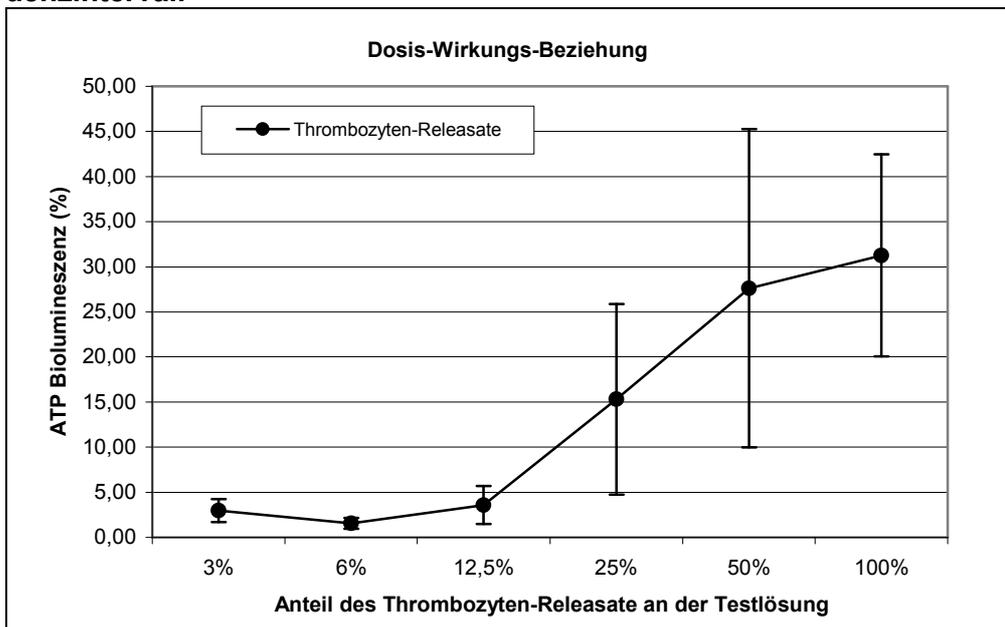
Abbildung 16: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von Serum der Kontrollgruppe unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Wurden die Zellen im Proliferationsversuch mit den verschiedenen Verdünnungen des Thrombozyten-Releasate inkubiert, resultiert eine Wachstumskurve, die sich deutlich von der der Patienten- und Kontrollgruppe unterscheidet (Abb. 17). Auch in dieser dritten Gruppe führt jede Verdünnung der Testlösung zu einem Zuwachs der ATP-Biolumineszenz verschiedenen Ausmaßes. Bei einer sehr starken Verdünnung mit einem Anteil von nur 3 % Thrombozyten-Releasate an der Testlösung kommt es zu einem relativ geringen Anstieg der ATP-Biolumineszenz. Bei einer 6%igen Lösung fällt der ATP-Anstieg etwas geringer aus, um bei einer 12,5%igen Lösung den Ausgangswert der 3%igen Lösung gering zu übertreffen. Erst bei einem Anteil von 25 % Thrombozyten-Releasate an

der Testlösung wird die Proliferation der Zellen in relevantem Umfang stimuliert, der ATP-Anstieg wächst deutlich. Je höher nun der Thrombozyten-Releasate-Anteil an der Testlösung wird, desto höher fällt auch der ATP-Anstieg aus. Bei einer 50%igen Lösung werden die Werte fast verdoppelt. Die unverdünnte Anwendung des Thrombozyten-Releasate erreicht Maximalwerte (31,25 %), indem sie nochmals zu einer, wenn auch flacheren Steigerung der Proliferation führt. Werden die Zellen mit Thrombozyten-Releasate inkubiert, so führt die unverdünnte Anwendung zu optimalen Ergebnissen.

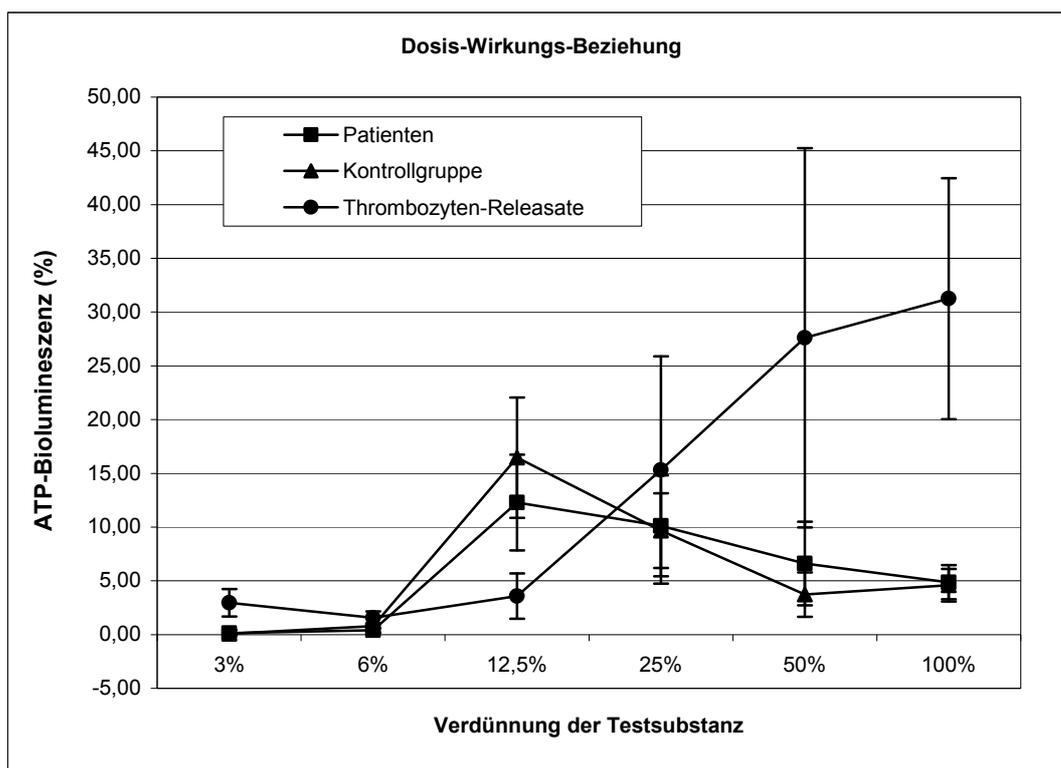
Abbildung 17: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von Thrombozyten-Releasate unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Bei einem Vergleich aller drei Gruppen untereinander lässt sich feststellen, dass Serum von RA-Patienten und gesunden Kontrollindividuen sowie Thrombozyten-Releasate die Proliferation in jeder Verdünnung positiv unterstützten (Abb. 18). Beide Serumgruppen zeigten die höchste Proliferationsstimulierung bei einer 12,5%igen Verdünnung. Bei dieser Verdünnung stieg der gemessene ATP-Anteil um 12,28 % bei der Gruppe der RA-Patienten und um 16,46 % bei der Kontrollgruppe. Mit zunehmender Serumkonzentration fiel die ATP-Zunahme immer geringer aus. Bis auf die 6%ige Verdünnung, bei der das Patientenserum dem Serum der Kontrollgruppe signifikant unterlegen war ($p = 0,0500$), unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Serumgruppen nicht signifikant voneinander. Bei den 3 %-, 25 %-, 50 %- und 100 %-Verdünnungen war das Patientenserum dem Serum der Kontrollgruppe sogar gering überlegen, wenn sich auch keine statistischen Signifikanzen ergaben. Es ließ sich hinsichtlich des Effektes der Wachstumsstimulierung auf die Zellkultur somit kein nennenswerter Unterschied zwischen dem Serum von immunsupprimierten RA-Patienten und dem Serum der Kontrollgruppe nachweisen. Throm-

bozyten-Releasate dagegen unterstützte die Proliferation mit zunehmender Konzentration stetig mehr und wirkte unverdünnt aufgetragen optimal stimulierend auf die Zellproliferation, messbar an einer ATP-Zunahme von 31,25 %. Damit erreichte es auch insgesamt deutlich bessere Ergebnisse als beide Serumgruppen. Die Ergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe unterschieden sich signifikant in allen Verdünnungen von den Ergebnissen der RA-Patienten. Ausgenommen hiervon war lediglich der 25%ige Gehalt der Testsubstanz. In allen Verdünnungsgruppen bis auf die 12,5 %-Lösung übertraf die Thrombozyten-Releasate-Gruppe die RA-Patienten. Die Ergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe unterschieden sich ebenfalls signifikant in allen Verdünnungen von den Ergebnissen der Kontrollgruppe. Ausgenommen hiervon war ebenfalls nur der 25%ige Gehalt der Testsubstanz. Wieder war die Wirkung des Thrombozyten-Releasate der des Serums überlegen bis auf die 12,5%ige Verdünnung.

Abbildung 18: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschiedener Verdünnungen von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



3.4.2 Zeit-Wirkungs-Beziehung

Zusätzlich zum Einfluss der Verdünnung wurde auch der zeitliche Einfluss auf die Proliferation untersucht. Um den Einfluss der Dauer der Inkubation mit den Testlösungen auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden alle Proben auf 20 % mit 0,9 % NaCl verdünnt und für 2 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mit der Testsubstanz inkubiert. Als Vergleich

diente der ATP-Gehalt von Zellen, die direkt am Zeitpunkt 0 h ohne Inkubation mit einer Testsubstanz abgestoppt und vermessen wurden.

Dargestellt ist der Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss verschieden langer Inkubationszeiten mit den Testsubstanzen in Form des Mittelwertes der drei Gruppen unter Angabe der Konfidenz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Zusätzlich wurde eine mögliche Signifikanz ermittelt (Tab. 9). Die Einzelergebnisse der Messungen sind für die Patientengruppe, die Kontrollgruppe und Thrombozyten-Releasate-Gruppe zusammengefasst (Anl. 5, Tab. 21 bis 23).

Tabelle 9: Zeit-Wirkungs-Beziehung

ATP-Biolumineszenz (%)											
Inkubationszeit (h)	2			p	12			p	24		p
Patienten	11,20 ±	3,02			13,97 ±	2,75 *	0,0100		11,28 ±	3,21	
Kontrollgruppe	8,86 ±	3,37 #	0,0010		9,88 ±	2,36 #	0,0100		7,77 ±	1,59	
Thrombozyten-Releasate	62,63 ±	32,35 °	0,0006		32,79 ±	22,38 °	0,0254 (e)		22,13 ±	20,55	

Inkubationszeit (h)	48			p	72			p	96		p
Patienten	13,94 ±	3,22			10,66 ±	2,71 *	0,0500		7,70 ±	2,22 *	0,0500
Kontrollgruppe	11,58 ±	2,98 #	0,0100		7,35 ±	1,35			4,87 ±	1,79	
Thrombozyten-Releasate	5,19 ±	3,32 °	0,0017		9,44 ±	9,66 °	0,0380 (e)		5,27 ±	5,44 °	0,0210

Signifikanz Patienten-Kontrollgruppe: * (p - zweiseitige Fragestellung)

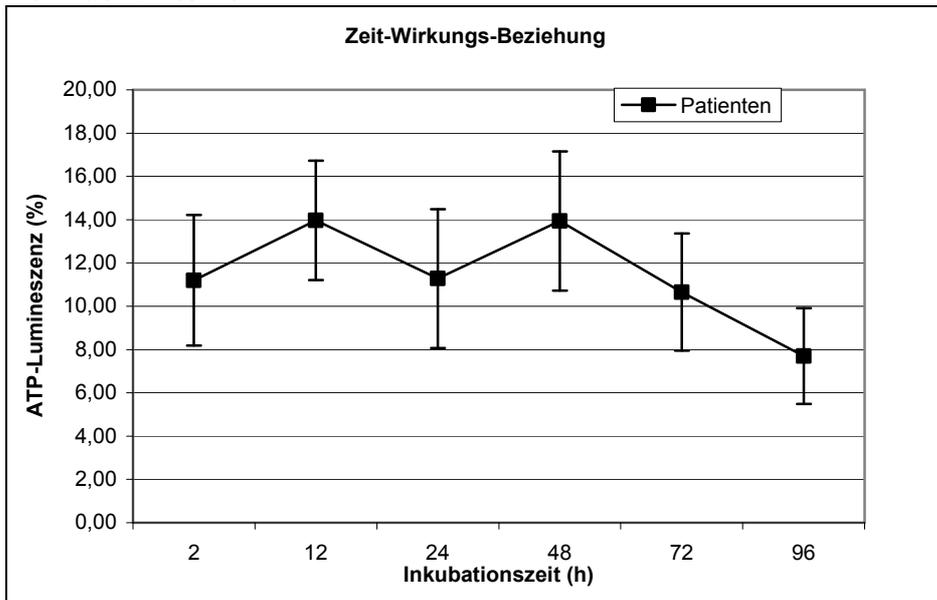
Signifikanz Patienten-Thrombozytenspender: ° (p - i.d.R. zweiseitige Fragestellung; (e) = einseitige Fragestellung)

Signifikanz Kontrollgruppe-Thrombozytenspender: # (p - zweiseitige Fragestellung)

Wie in den Dosis-Wirkungs-Versuchen wird im Folgenden jede Gruppe einzeln für sich betrachtet, bevor ein Vergleich der drei Gruppen untereinander stattfindet.

Wurden die Zellen mit RA-Patientenserum inkubiert, fand während des gesamten Zeitraumes der Inkubation ein messbares Zellwachstum statt, sichtbar gemacht am Zuwachs der ATP-Biolumineszenz (Abb. 19). Die optimale Zeit bei Inkubation mit Serum von RA-Patienten beträgt zwischen 2 h und 48 h. In diesem Zeitfenster wurden die besten Proliferationsergebnisse erreicht. Der ATP-Zuwachs als Maß für die Stärke der Proliferation betrug hier zwischen 11,20 % und 13,94 %. Die Werte innerhalb dieses Zeitraumes unterscheiden sich nur wenig voneinander. Der M-förmige Kurvenverlauf zeigt seine beiden Maxima bei 12 h und 48 h. Beide Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Danach fiel der ATP-Gehalt deutlich ab. Bei 72 h Inkubationszeit mit Patientenserum verringerte sich das Wachstum auf 10,66 %. Nach 96 h betrug der ATP-Zuwachs nur noch 7,70 %. Innerhalb der letzten 48 h Inkubationszeit kam es also zu einem Verlust von ATP. Beste Bedingungen findet die Zellkultur bei eher kurzen Inkubationszeiten bis 48 h; längere Inkubationszeiten wirken sich eher nachteilig auf das Zellwachstum aus. Innerhalb des Zeitraumes von 2 h bis 48 h unterscheiden sich die Werte nur so wenig voneinander, dass es sinnvoll erscheint, die 12-stündige Inkubation als optimal zu bezeichnen, da auch eine Verlängerung auf 48 h keine Vorteile verspricht.

Abbildung 19: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Serum der RA-Patienten bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Ähnlich zu den RA-Patienten verhält sich auch die Wachstumskurve unter Einfluss von Serum der Kontrollgruppe (Abb. 20). Auch bei Inkubation der Zellen mit Kontrollgruppen-Serum ließ sich zu jedem Zeitpunkt des Versuches ein ATP-Zuwachs dokumentieren. Analog zu den RA-Patienten fand in der Zeit zwischen 2 h und 48 h die meiste Proliferation statt. Der ATP-Zuwachs betrug zwischen 8,86 % und 11,58 %. Wie schon bei den RA-Patienten (Abb. 19) zeigte sich auch hier wieder ein M-förmiger Kurvenverlauf, wenn auch etwas verzerrter. Die beiden Maxima finden sich bei 12 h und 48 h, wobei die 48 h-Ergebnisse mit 11,58 % ATP-Zunahme die der 12-stündigen Inkubation noch übertreffen. Danach fiel der ATP-Anstieg geringer aus. Das Minimum fand sich bei der längsten Inkubationszeit von 96 h.

Wie auch bei den Serum-Versuchen wurde für die Untersuchung der Zeit-Wirkungs-Beziehung beim Thrombozyten-Releasate durchgängig eine 20 %-Verdünnung genutzt. Die Wachstumskurve der Thrombozyten-Releasate-Gruppe (Abb. 21) unterscheidet sich jedoch deutlich von denen der Serum-Gruppen. Bei der Analyse der Kurve fällt vor allem auf, dass mit zunehmender Inkubationszeit der ATP-Gehalt stetig abfällt, was für einen Stoffwechselstillstand bzw. Zelltod spricht. Das Maximum der Wachstumsstimulierung wird mit der kürzesten Inkubationszeit von 2 h erreicht, bei der es zu einem ATP-Anstieg von 62,63 % kommt. Nach 12 Stunden ist noch etwa halb so viel ATP-Anstieg detektierbar. Nach 24 h wurde nur noch ca. ein Drittel des maximal möglichen ATP-Zuwachses gemessen. Danach sind nur noch, im Vergleich zum 2-Stundenwert, relativ kleine ATP-Mengen nachweisbar. Minimalwerte werden bei 48 h und 96 h erreicht. Insgesamt lässt

sich feststellen, dass je kürzer die Inkubationszeit mit Thrombozyten-Releasate ist, desto höher fällt der ATP-Anstieg aus.

Abbildung 20: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Serum der Kontrollgruppe bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall

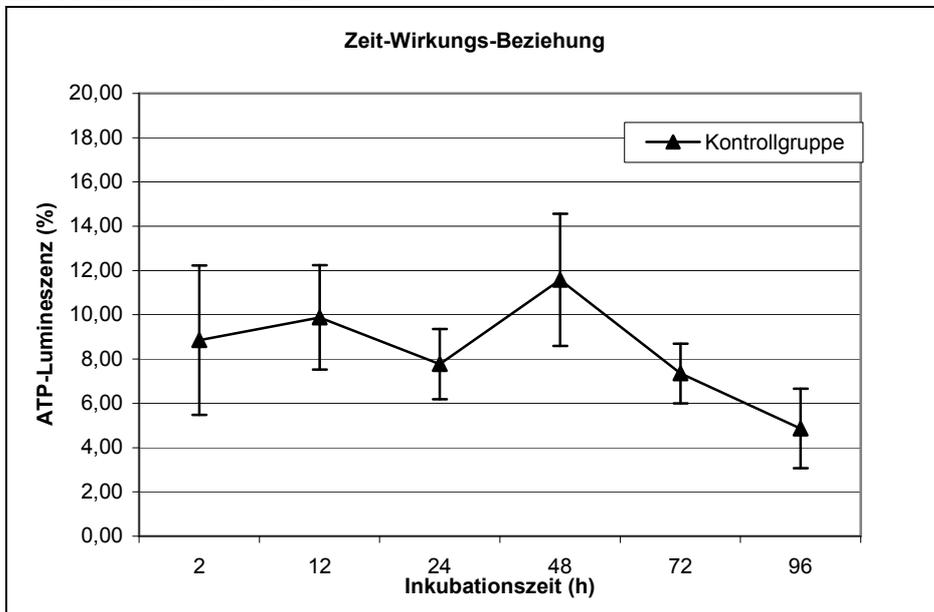
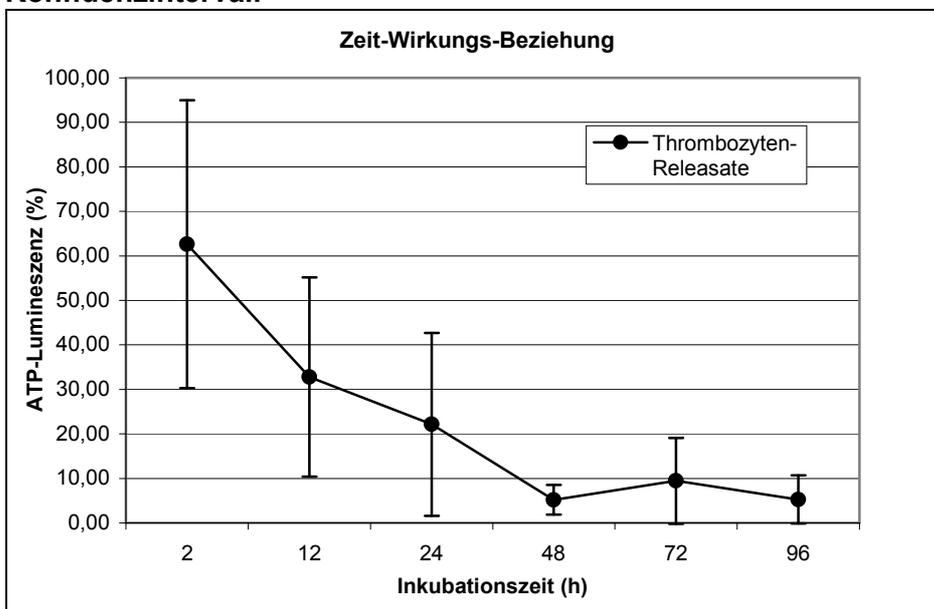


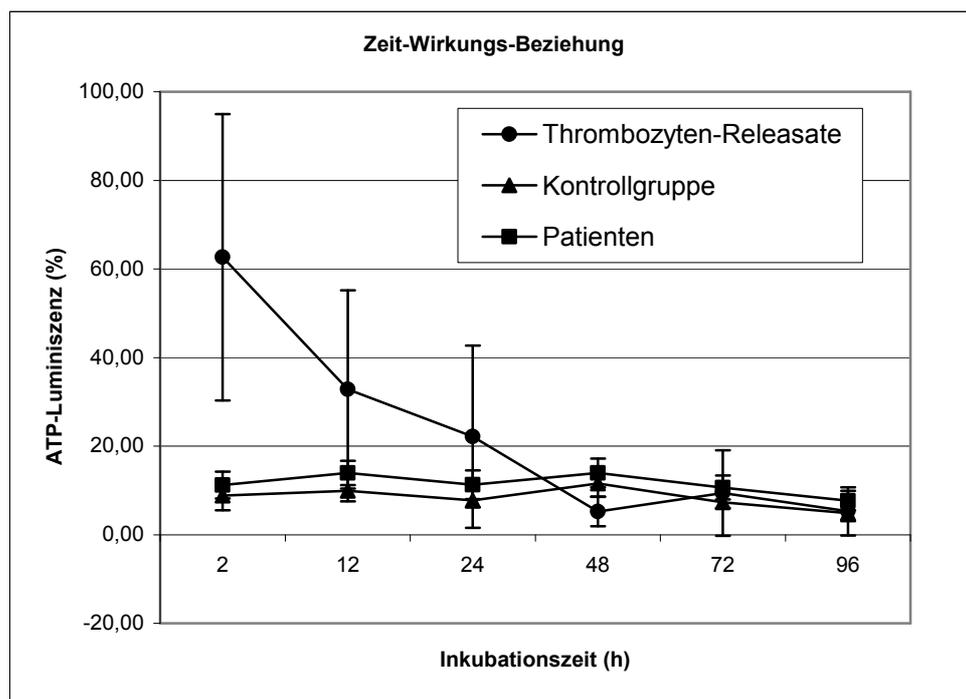
Abbildung 21: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Thrombozyten-Releasate bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Wenn man nun alle drei Kurven zusammenfasst und vergleicht, so lässt sich, wie auch bereits in den Dosis-Wirkungs-Experimenten, konstatieren, dass über die gesamte Dauer der Versuche der ATP-Gehalt der Zellen unter Einfluss von Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe sowie Thrombozyten-Releasate im Vergleich zum Versuchsstart zuge-

nommen hat. Aber bei den Zeit-Wirkungs-Experimenten fällt auch auf, dass mit zunehmender Dauer der Inkubation es eher zu einem Abfall des ATP-Gehalts kommt (Abb. 22). Bei einer Inkubation mit den verschiedenen Testsubstanzen ist in den ersten 24 h Thrombozyten-Releasate dem Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe deutlich überlegen. Danach nähern sich die Wachstumskurven einander an. Die Ergebnisse der RA-Patienten unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen der Thrombozyten-Releasate-Gruppe bei den Inkubationszeiten von 2 h, 12 h, 48 h, 72 h und 96 h. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe unterscheiden sich signifikant von den Ergebnissen der Thrombozyten-Releasate-Gruppe bei den Inkubationszeiten von 2 h, 12 h und 48 h. Bei 12-stündiger ($p = 0,0100$), 72-stündiger ($p = 0,0500$) und 96-stündiger ($p = 0,0500$) Inkubation waren die RA-Patienten der Kontrollgruppe signifikant überlegen hinsichtlich ihres proliferationsunterstützenden Effektes, obwohl sich dieser Effekt in einem geringen Bereich von 1-2 % bewegte.

Abbildung 22: Zuwachs von zellulärem ATP unter dem Einfluss von Serum und Thrombozyten-Releasate bei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



3.5 Migration

Zur Evaluierung der Migrationstendenz der Zellkultur unter Einfluss von Serum bzw. Thrombozytenlysat wurden die Zellen zuvor wachstumsinhibiert. Die Flächenzunahme der Zellhöfe ist somit auf Migrationsbewegungen und nicht auf Zellteilung zurückzuführen. Aus jeder der drei Gruppen wurden zufällig drei Proben ausgewählt und diese in Triplikaten untersucht. Alle drei Gruppen wurden in verschiedenen Verdünnungen über definierte

Zeiträume getestet. Die Fläche der Zellhöfe zum Zeitpunkt 0 h entspricht 100 %. Es wurden von allen drei Gruppen die Mittelwerte, deren Konfidenz sowie die Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Tab. 10) angegeben. Die Einzelergebnisse der Messungen jeder Gruppe wurden zusammengefasst (Anl. 6, Tab. 24 bis 29). Das Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe wurde sowohl in einer 25%igen Verdünnung mit 0,9 % NaCl als auch unverdünnt aufgetragen. Thrombozyten-Releasate wurde in einer ersten Versuchsreihe unverdünnt sowie ebenfalls mit 0,9 % NaCl auf 25 % bzw. 65 % verdünnt appliziert. In einer zweiten Versuchsreihe wurde Thrombozyten-Releasate mit einem albuminhaltigen Minimalmedium (sMM) auf 25 % und 65 % verdünnt.

Tabelle 10: Zunahme der Zellhoffläche unter Einfluss von Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe sowie Thrombozyten-Releasate jeweils in unterschiedlichen Verdünnungen

Inkubationszeit (h)	Flächenveränderung (%)								
	24		p	48		p	72		p
Patienten 25 %	121,22 ±	11,42		136,35 ±	21,78		149,71 ±	18,78 #	0,05 (e)
Patienten 100 %	127,61 ±	1,76 *	0,05 (e)	159,30 ±	16,04 *	0,05 (e)	184,50 ±	41,68	
Kontrollgruppe 25 %	123,08 ±	4,14		150,21 ±	7,58		168,84 ±	8,88 o	0,05 (e)
Kontrollgruppe 100 %	122,45 ±	12,23		152,54 ±	21,64		204,03 ±	38,15 □	0,05 (e)
Thromb.-Rel. 100 %	104,33 ±	1,93		101,76 ±	1,86		x		
Thromb.-Rel. 25 % + NaCl	98,34 ±	0,02		x			x		
Thromb.-Rel. 65 % + NaCl	99,80 ±	0,27		x			x		
Thromb.-Rel. 25 % + sMM	126,11 ±	3,81		152,04 ±	10,86		187,43 ±	5,34	
Thromb.-Rel. 65 % + sMM	121,23 ±	1,47		143,39 ±	5,26		160,15 ±	9,61	

Inkubationszeit (h)	96				144			
			p			p		
Patienten 25 %	164,60 ±	49,00		216,48 ±	28,69 #	0,05 (e)		
Patienten 100 %	225,79 ±	69,78 *	0,05 (e)	314,26 ±	116,54 *	0,05 (e)		
Kontrollgruppe 25 %	204,79 ±	8,26		242,24 ±	11,38 o	0,05 (e)		
Kontrollgruppe 100 %	256,55 ±	35,53 □	0,05 (e)	336,65 ±	137,64			
Thromb.-Rel. 100 %	x			x				
Thromb.-Rel. 25 % + NaCl	x			x				
Thromb.-Rel. 65 % + NaCl	x			x				
Thromb.-Rel. 25 % + sMM	219,83 ±	20,18		267,70 ±	6,38			
Thromb.-Rel. 65 % + sMM	175,27 ±	6,84		212,31 ±	10,86			

x deutliche Ablösung der Zellen

Zu keinem Zeitpunkt Signifikanz zw. Patienten 25 % und Kontrollgruppe 25 %

Zu keinem Zeitpunkt Signifikanz zw. Patienten 100 % und Kontrollgruppe 100 %

Signifikanz (einseitig) Patienten 25 % - Thromb.-Rel. 25 % (sMM)

* Signifikanz (einseitig) Patienten 100 % - Thromb.-Rel. 65 % (sMM)

o Signifikanz (einseitig) Kontrollgruppe 25 % - Thromb.-Rel. 25 % (sMM)

□ Signifikanz (einseitig) Kontrollgruppe 100 % - Thromb.-Rel. 65 % (sMM)

Unverdünntes Serum von RA-Patienten wirkte positiv auf die zelluläre Migration. Dies wird durch die Flächenzunahme der Zellhöfe bei steigender Inkubationszeit dokumentiert (Abb. 23). Dieser positive Einfluss findet sich sowohl bei verdünnter wie auch bei unverdünnter Anwendung. Unverdünntes Serum wirkte stimulierender als eine verdünnte Lösung auf das Migrationsverhalten der Hornhautepithelzellen. Die Flächenzunahme ist deutlich stär-

ker ausgeprägt. Bei länger währenden Inkubationszeiten tritt diese Überlegenheit der unverdünnten gegenüber der verdünnten Serumanwendung immer deutlicher hervor.

Das gleiche Migrationsverhalten findet sich auch bei der Anwendung von Serum der Kontrollgruppe. Auch hier wurde die Migration positiv durch unverdünntes wie auch verdünntes Serum beeinflusst. Längere Inkubationszeiten führten zu steigender Migration. Wieder war unverdünntes Serum dem verdünnten überlegen (Abb. 24).

Abbildung 23: Zunahme der Zellhoffläche unter dem Einfluss von Serum von RA-Patienten unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall

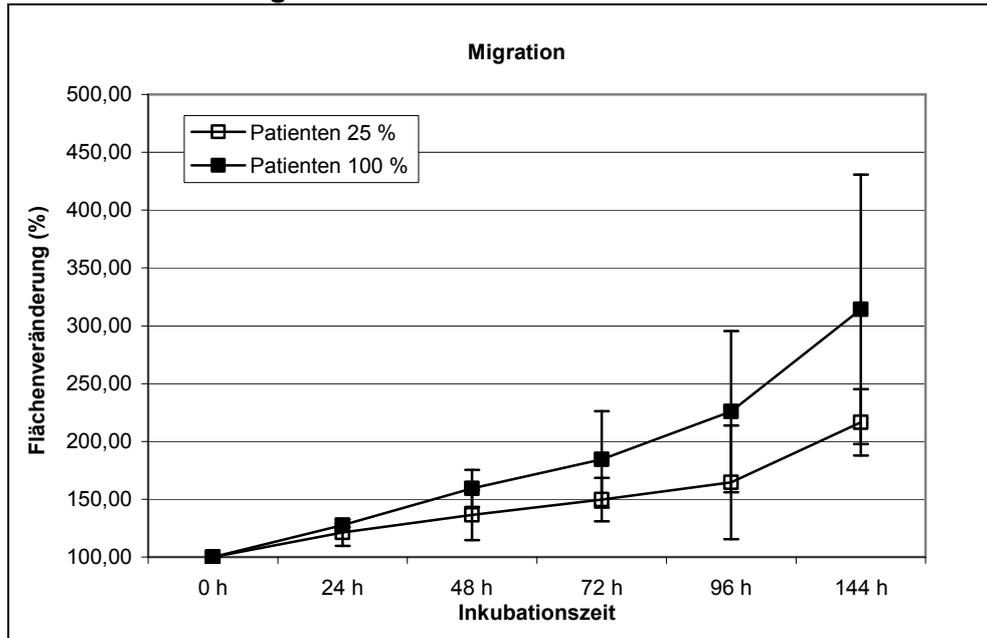
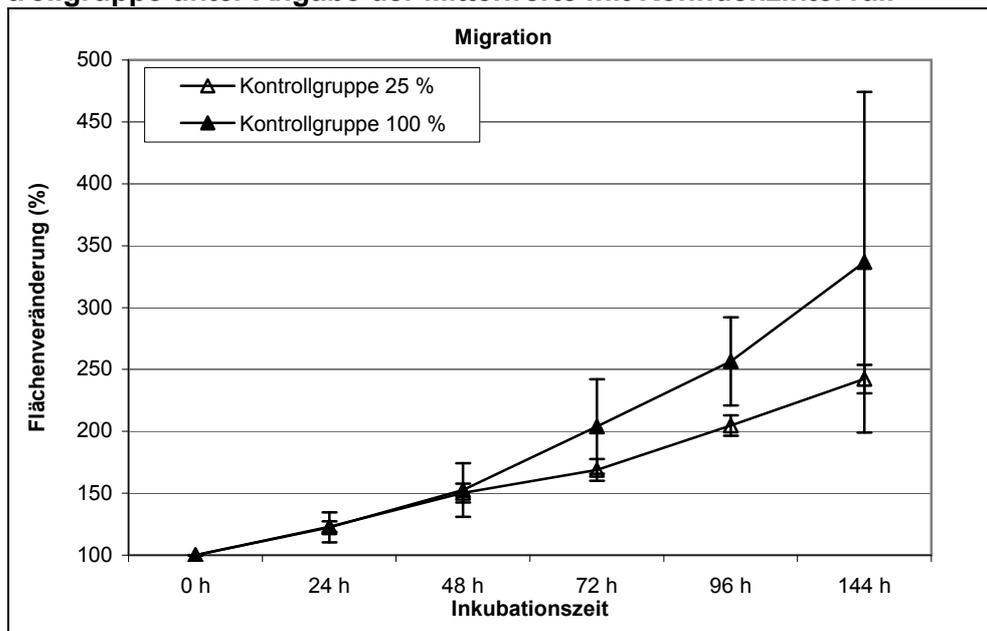


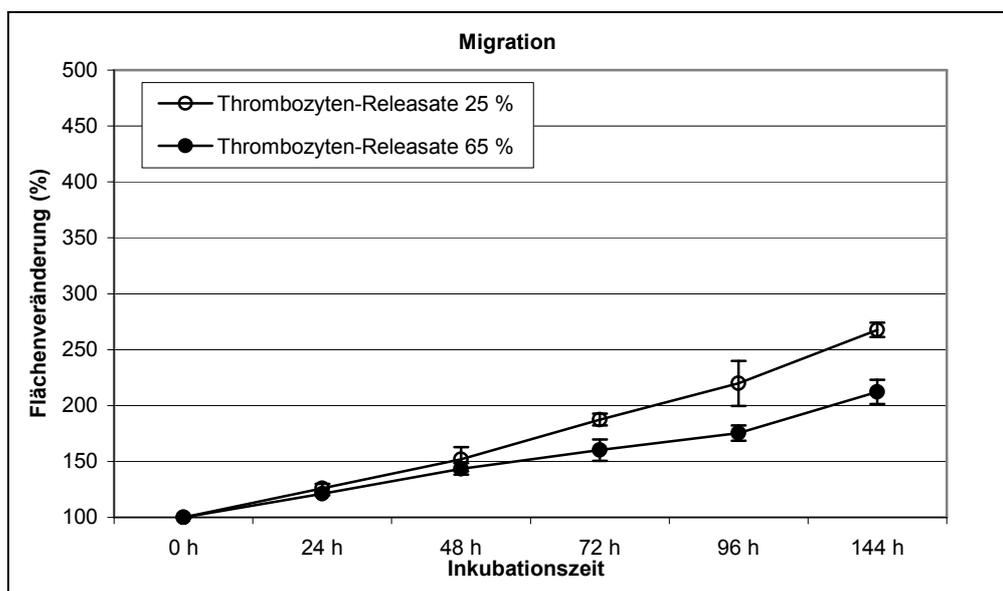
Abbildung 24: Zunahme der Zellhoffläche unter dem Einfluss von Serum der Kontrollgruppe unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Unverdünntes Thrombozyten-Releasate hat einen negativen Einfluss auf die Migration. Dies äußerte sich ab etwa 48 h durch eine progrediente Zellablösung vom Untergrund. Im Gegensatz zu den Serum-inkubierten Zellen nahm der Zellhof nicht an Fläche zu, sondern ganze Zellgruppen verloren die Haftung zum kollagenbeschichteten Boden und lösten sich spontan ab oder wurden durch den Waschvorgang abgespült. In Tab. 10 sind daher teilweise Werte unter 100 % ablesbar. Der Zeitpunkt einer mikroskopisch deutlich sichtbaren Ablösung der Zellgruppen wurde kenntlich gemacht („x“ in Tab. 10). Bei einer Verdünnung des Thrombozyten-Releasate mit 0,9 % NaCl auf 25 % kam es bereits innerhalb der ersten 24 h zu einem großflächigen Ablösen der Zellen vom Untergrund. Bei der höherkonzentrierten Lösung mit 65 % Thrombozyten-Releasate-Anteil kam es ebenfalls innerhalb der ersten 24-48 h zu einem Ablösen der Zellen, jedoch war der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt. Insgesamt hat also Thrombozyten-Releasate einen negativen Einfluss auf die Migration der Zellen, je höher jedoch der Anteil des Thrombozyten-Releasate an der Inkubationslösung ist, umso später lösen sich die Zellen ab.

Da bereits in den Zeit-Wirkungs-Experimenten auffiel, dass der Zellstoffwechsel bei Inkubation mit Thrombozyten-Releasate mit zunehmender Inkubationszeit leidet, was am ehesten an einem Substratmangel des Releasate liegen könnte, wurden für die Migrationsversuche die Thrombozyten-Releasate-Proben mit einem albuminhaltigen Minimalmedium (sMM) verdünnt, um so die im Releasate vorhandenen Mediatoren mit Nährstoffen für den Zellstoffwechsel anzureichern. Mit sMM verdünntes Thrombozyten-Releasate wirkt stimulierend auf die Zellmigration. Es kam zu keiner Zellablösung wie bei der unverdünnten Anwendung bzw. der Verdünnung mit NaCl (Abb. 25).

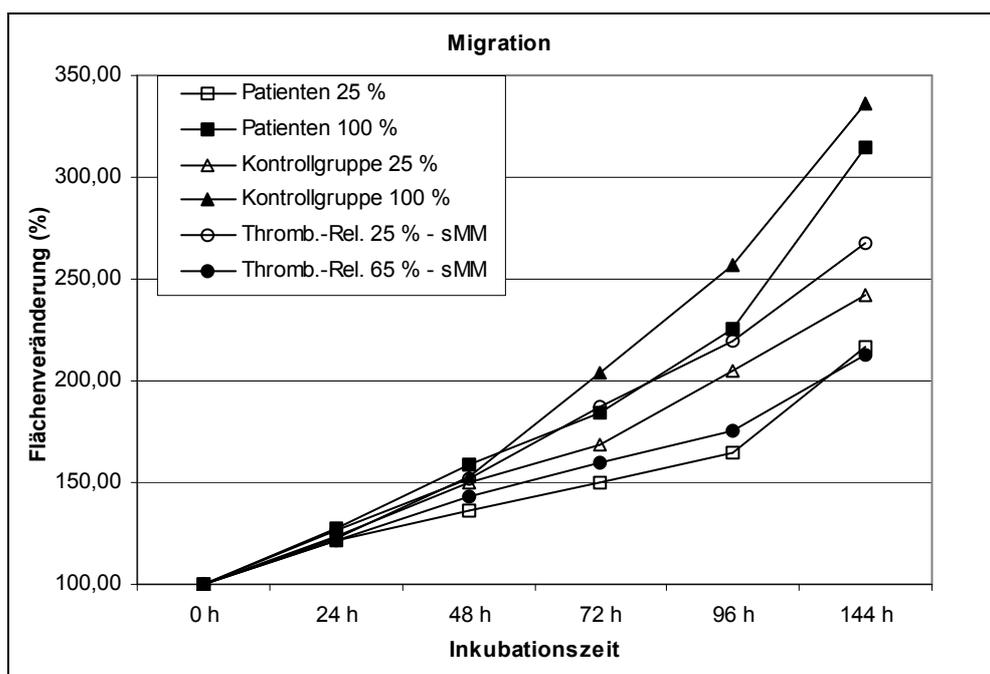
Abbildung 25: Zunahme der Zellhoffläche unter dem Einfluss von Thrombozyten-Releasate verdünnt mit sMM unter Angabe der Mittelwerte mit Konfidenzintervall



Zunehmende Inkubationszeit führte zu steigender Migrationsfläche. Dabei kommt es mit steigendem Anteil von sMM an der Thrombozyten-Releasate-Lösung zu größerem Anstieg der Migration der Zellen.

Im Vergleich der drei Gruppen (RA-Patienten, Kontrollgruppe und Thrombozyten-Releasate) zeigt sich, dass das Serum von RA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen die Migration generell positiv beeinflusst (Abb. 26). Dieser positive Einfluss findet sich bei verdünnter und unverdünnter Anwendung. Mit steigender Inkubationszeit wird die Migration der Zellkultur positiv unterstützt. Unverdünntes Serum wirkt bei beiden Serum-Gruppen stimulierender als eine verdünnte Lösung. Die zelluläre Migration wurde in den ersten 48 h am besten durch unverdünntes Patientenserum unterstützt. Bei einer längeren Inkubation bis zu 144 h wirkt unverdünntes Serum der Kontrollgruppe am stärksten migrationsstimulierend (336,65 %). Wurden die Zellen mit einer auf 25 % verdünnten Testsubstanz inkubiert (Verdünnung mit 0,9 % NaCl), findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen RA-Patienten und Kontrollgruppe. Auch beim unverdünnten Auftragen der Serumproben findet sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die migrationsunterstützende Wirkung innerhalb der beiden Serumgruppen. Im Gegensatz zur Proliferation, bei der eine Verdünnung von Serum optimale Bedingungen schafft, wirkt insgesamt eine 100%ige Testlösung signifikant migrationsstimulierender als eine 25%ige in beiden Serum-Gruppen (p jeweils 0,0500 (e)).

Abbildung 26: Zunahme der Zellhoffläche unter dem Einfluss von Serum der RA-Patienten und der Kontrollgruppe sowie Thrombozyten-Releasate unter Angabe der Mittelwerte

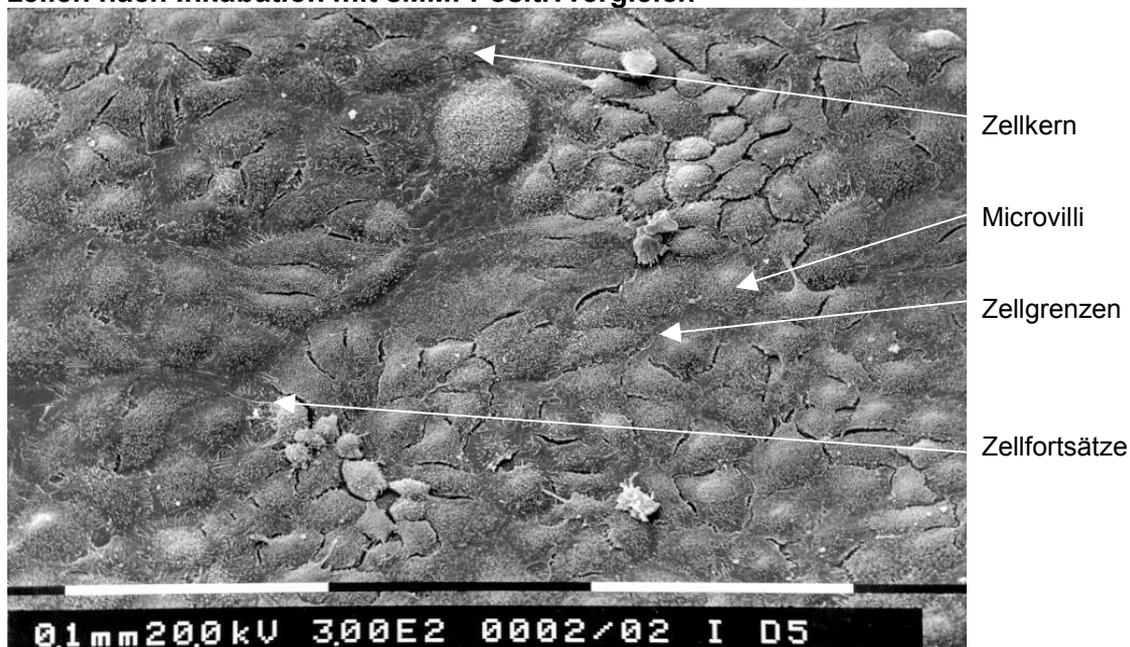


Thrombozyten-Releasate übertrifft bei einer 25%igen Verdünnung mit sMM die Ergebnisse der Patienten und Probanden (25%ige Verdünnung mit 0,9 % NaCl) signifikant nur an den Zeitpunkten 72 h ($p = 0,0500$ (e)) und 144 h ($p = 0,0500$ (e)). Es wurde ebenfalls ausgetestet, wie sich eine höher konzentrierte Thrombozyten-Releasate-Lösung auf die Migration der Zellkultur auswirkt. Hierbei wurde festgestellt, dass bei der Verwendung einer 65%igen Lösung (+ 35 % sMM) die Migrationsergebnisse schlechter ausfallen als bei der weniger stark konzentrierten Lösung. Diese Daten bestätigen die Annahme, dass Thrombozyten-Releasate selbst zwar in der Lage ist, die Migration von Hornhautepithelzellen zu stimulieren, sichtbar an der - wenn auch minimalen - Flächenzunahme bei der 100%igen Thrombozyten-Releasate-Anwendung, dafür aber den Zellen nutritive Faktoren zugesetzt werden müssen. Eine deutliche Größenzunahme der Zellhoffläche ist lediglich durch Zugabe von sMM zu erreichen.*

3.6 Differenzierung

Als letzter Teilschritt der zellulären Wundheilung wurde die Differenzierung im Zellkulturmodell untersucht. Hierfür wurden von den Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) angefertigt. Diese wurden mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle verglichen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit serumhaltigem Minimalmedium inkubiert waren (Abb. 27).

Abbildung 27: REM-Aufnahme (350fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit sMM: Positivvergleich



* Anmerkung zur statistischen Auswertung der Migrationsdaten: Eine Signifikanztestung innerhalb der Patientengruppe (25 % versus 100 %) bzw. Kontroll- und Thrombozyten-Releasate-Gruppe funktioniert nur, wenn mindestens fünf Messpaare (Voraussetzung für den Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest) vorliegen. Aufgrund der geringen Fallzahlen war eine statistische Auswertung nicht möglich. Für zukünftige Untersuchungen sollten daher größere Fallzahlen angestrebt werden.

Das vordere Hornhautepithel ist ein mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel. Da die Versuche jedoch an einem Zellkulturmodell und nicht an Teilen einer natürlichen Kornea vorgenommen wurden, entfällt die sonst histologisch typische Aufteilung in Basalzellen, Intermediärzellen und Superfizialzellen. Die Hornhautepithelzellen des Positivvergleiches imponieren durch ihre typische flache und polygonale Form, in deren Zentrum sich ein abgeplatteter runder Zellkern vorwölbt. Die Zellen liegen dicht an dicht, getrennt durch leistenartige Zellgrenzen. Es hat sich insgesamt ein konfluenter Zellrasen gebildet. Alle Zellen zeigen einen gleichmäßigen Besatz an Microvilli, der im Bereich der linsenförmigen Kerne vermehrt ist. Regelmäßig finden sich Zell-Zell-Kontakte, gebildet durch Verzahnungen von Zellfortsätzen. Wenige Zellen zeigen zum Teil auffällige Zellfortsatzformationen. Zum Negativvergleich wurden Zellen gewählt, die mit 0,9%iger NaCl-Lösung inkubiert waren (Abb. 28). Am auffälligsten ist der Verlust an Zellen im Vergleich zu Abb. 27. Nur noch vereinzelt sind gruppierte Epithelzellen sichtbar, die jedoch ihre polygonale Form verloren haben. Stattdessen sind sie abgekugelt und zeigen teilweise auffällig ausgeprägte Zellfortsätze.

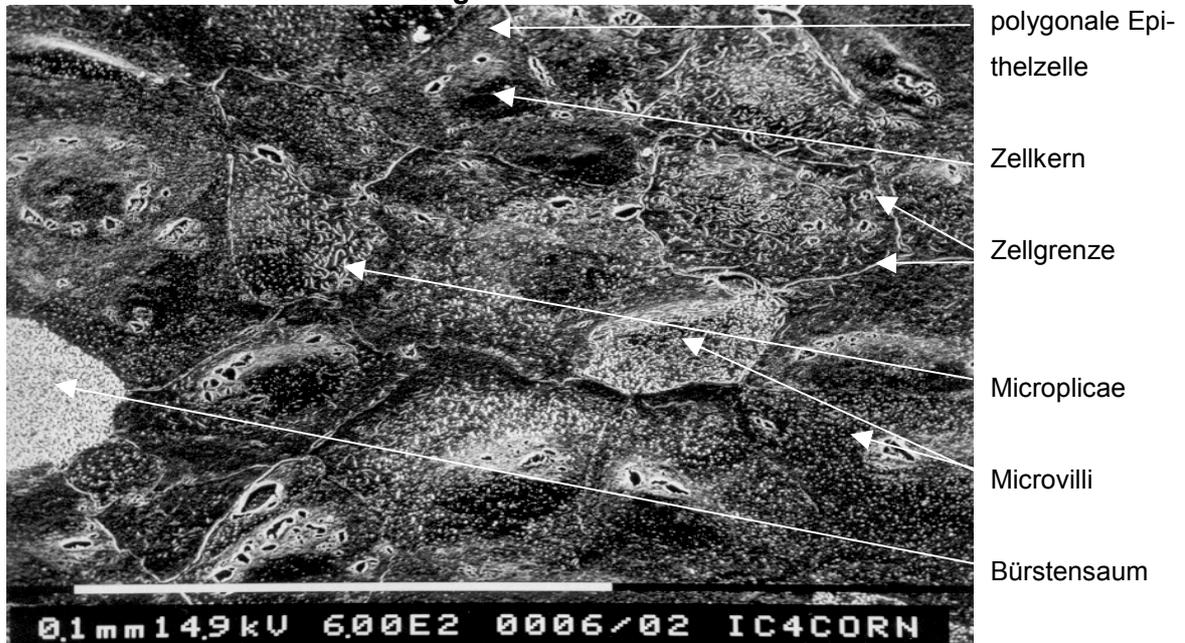
Abbildung 28: REM-Aufnahme (350fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit 0,9 % NaCl: Negativvergleich



Die Serum-Proben der RA-Patienten und der Kontrollgruppe wurden vor Inkubation mit den Zellen mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 20 % verdünnt. Bei den Zellen, die mit 20%igem Serum von RA-Patienten inkubiert waren, zeigte sich nach 48 Stunden ein konfluenter Zellrasen (Abb. 29). Die Zellen sind flach ausgebreitet, typisch polygonal geformt, bei insgesamt verstärkt ausgeprägtem Besatz an Microvilli. Als Maximalvariante ist am linken unteren Bildrand eine Zelle mit dichtem Bürstensaum angeschnitten, deren Oberfläche

fast weiß erscheint. Zusätzlich scheinen auch vermehrt Microplacae aufzutreten, die als weitere Möglichkeit der Zelloberflächenvergrößerung neben den Microvilli gewertet werden können. Ausgeprägt sind die engen Kontakte der Nachbarzellen untereinander.

Abbildung 29: REM-Aufnahme (700fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit 20%igem Patienten-Serum



Bei Inkubation mit Serum der Kontrollgruppe (Abb. 30) ist wieder ein konfluenter Zellrasen entstanden. Die Zellen liegen dicht an dicht, getrennt durch leistenförmige Zellgrenzen.

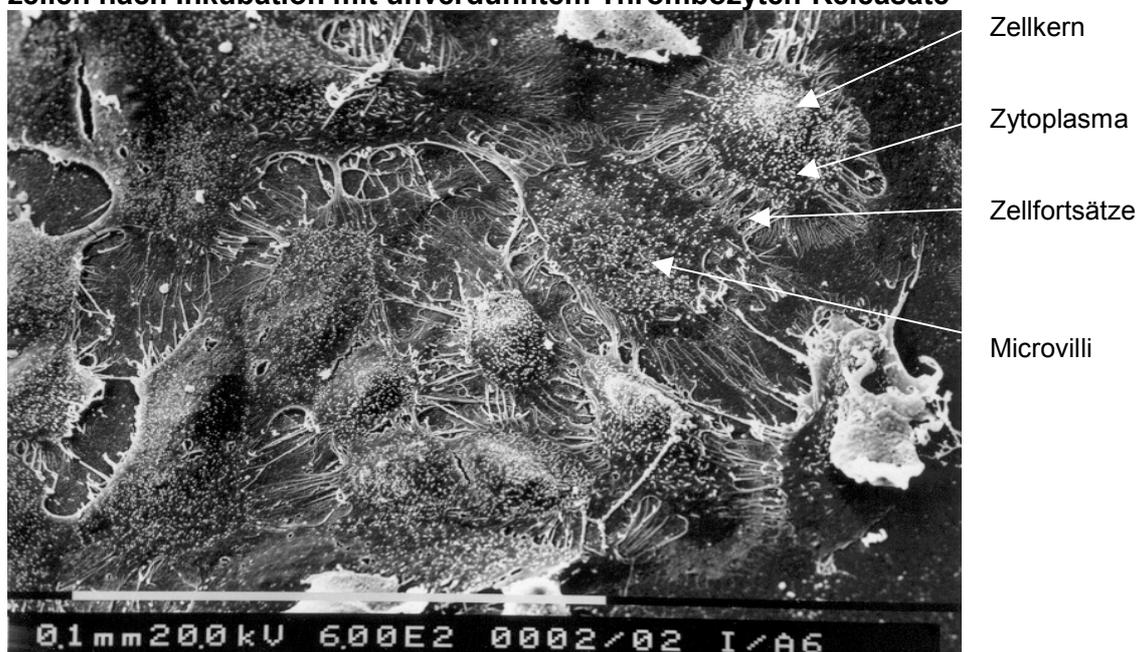
Abbildung 30: REM-Aufnahme (700fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit 20%igem Kontrollgruppen-Serum



Die Zellform ist normal, d. h. flach, polygonal, mit zentralem abgeplattetem Zellkern. Teilweise sind in der linken Bildhälfte Interdigitationen durch lange Zellfortsätze angeschnitten. Insgesamt erscheint der Besatz an Microvilli jedoch im Vergleich zu den mit Patienten-Serum inkubierten Zellen (Abb. 29) vermindert. Wie auch in der vorherigen Abbildung sind wieder Microplacae auf den Zelloberflächen sichtbar.

Anders als bei den mit Serum inkubierten Zellen finden sich bei den mit unverdünntem Thrombozyten-Releasate inkubierten Zellen vor allem Zellfortsätze als dominierendes Charakteristikum. Auf den ersten Blick scheint es sich nicht um ortsständige Epithelzellen, sondern eher um wandernde Zellen zu handeln (Abb. 31). Die Zellen sind nicht zur vollständigen Konfluenz angewachsen. Ihre Form lässt sich nur schwerlich als polygonal beschreiben. Die Zellform wird durch den prominenten Zellkern bestimmt, um den sich ein zum Teil schmaler Zytoplasmasaum schmiegt. Die Zelloberfläche ist mit Microvilli besetzt. Augenscheinlich sind die zahlreichen Interdigitationen von teilweise bizarrem Ausmaß. Jede Zelle bildet um sich einen Kranz aus Zellfortsätzen, um mit allen Nachbarzellen Kontakt aufzunehmen. Dies vermittelt insgesamt einen unruhigen Anblick, die Zellen machen einen hochaktiven Eindruck, der jedoch einem normalen Korneaepithel eher unähnlich ist.

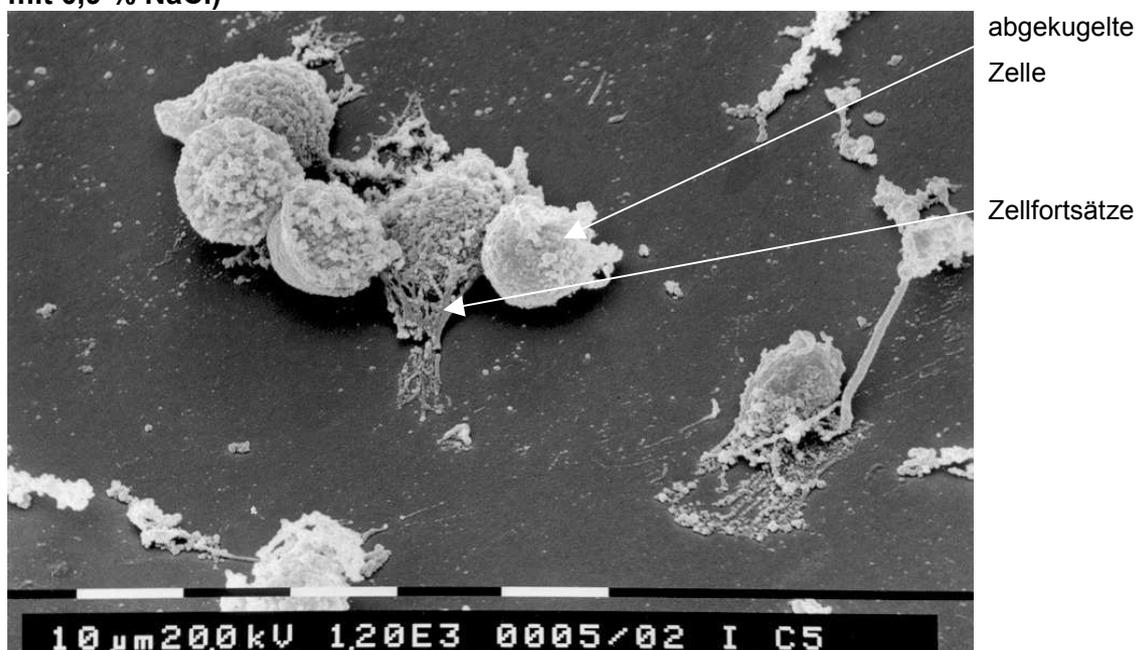
Abbildung 31: REM-Aufnahme (700fache Vergrößerung) humaner Hornhautepithelzellen nach Inkubation mit unverdünntem Thrombozyten-Releasate



Sowohl mit 0,9 % NaCl verdünntes Thrombozyten-Releasate (Abb. 32a) als auch das mit SMM auf 20 % verdünnte Thrombozyten-Releasate (Abb. 32b) haben Einfluss auf die Zellkultur. Die wenigen verbliebenen Zellen in Abb. 32a scheinen kurz vor dem Untergang zu stehen. Sie haben ihre ursprünglich flache, polygonale Form verloren und haben sich abgekugelt.

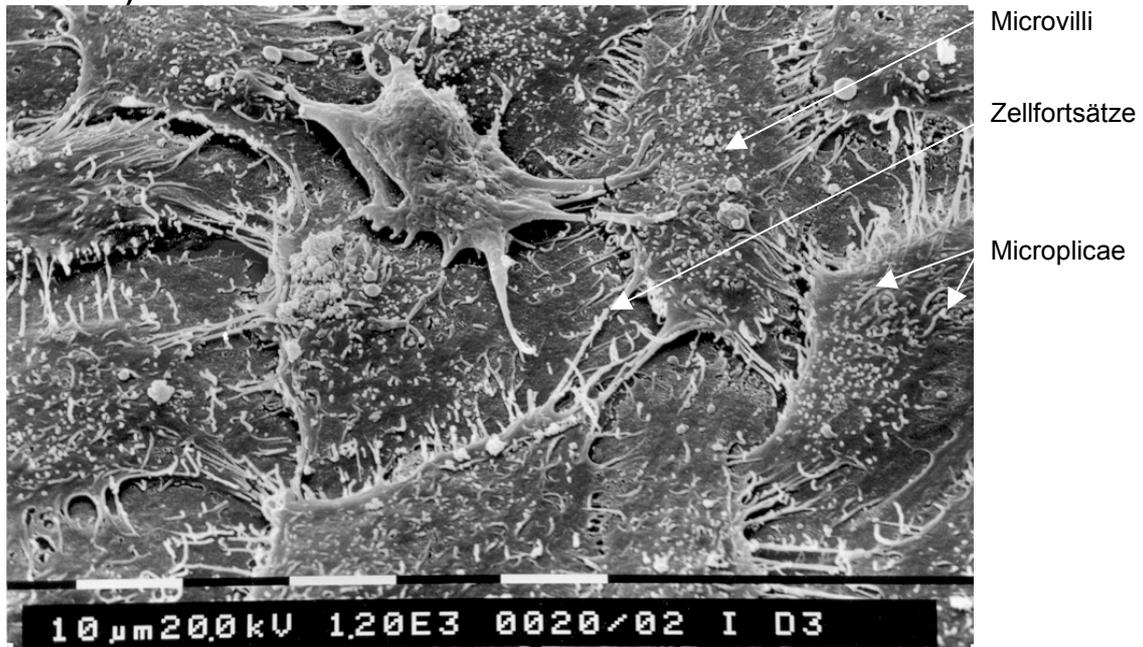
Mit wenigen verbliebenen Fortsätzen besteht noch eine Haftung zum Untergrund. Aktiv geformte Zellkontakte untereinander sind nicht mehr sichtbar. Offensichtlich ist die Ähnlichkeit mit der Negativkontrolle (Abb. 28), bei der die Zellen nur mit 0,9 % NaCl inkubiert wurden. Ein Zusatz von thrombozytären Wachstumsfaktoren zum NaCl hatte offensichtlich keinen Einfluss auf den Zellstoffwechsel nach 48-stündiger Inkubation. Es drängen sich hier Parallelen zur Zeit-Wirkungs-Beziehung auf, in deren Versuchen sich zeigte, dass Thrombozyten-Releasate zwar eine hochpotente Wirkung auf den Zellstoffwechsel ausübt, dies allerdings nur in einer Zeitspanne von 0 bis 24 h. Es ist also durchaus möglich, dass Thrombozyten-Releasate die Zelldifferenzierung positiv beeinflusst, die raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen jedoch einfach „zu spät“ angefertigt wurden.

Abbildung 32a: REM-Aufnahme humaner Hornhautepithelzellen (1.400fache Vergrößerung) nach Inkubation mit 20%igem Thrombozyten-Releasate (Verdünnung mit 0,9 % NaCl)



Im Unterschied zu den Zellen, die mit unverdünntem Thrombozyten-Releasate inkubiert waren (Abb. 31), zeigt sich unter Einfluss von mit serumhaltigem Minimalmedium auf 20 % verdünntes Thrombozyten-Releasate dagegen ein Zellbild mit einem vollständig kohärenten Zellrasen (Abb. 32b). Es macht sogar den Eindruck, als würden die Zellen teilweise in Schichten übereinander liegen. Die Zellform ist am ehesten als polygonal zu beschreiben. Die Zellen sind flach. Deutlich sind Microvilli und Microplicae zu erkennen. Insgesamt ist die Zelldifferenzierung weit fortgeschritten. Die Zellfortsätze sind zwar in ihrer Anzahl und Ausprägung im Vergleich zum unverdünnten Thrombozyten-Releasate (Abb. 31) deutlich vermindert, übertreffen das RA-Patienten-Serum (Abb. 29) und das Kontrollgruppen-Serum (Abb. 30) jedoch bei weitem.

Abbildung 32b: REM-Aufnahme humaner Hornhautepithelzellen (1.400fache Vergrößerung) nach Inkubation mit 20%igem Thrombozyten-Releasate (Verdünnung mit sMM)



4. DISKUSSION

4.1 Versuchsteilnehmer

Wie den demographischen Daten der Versuchsteilnehmer (Tab. 3) zu entnehmen ist, handelte es sich bei den RA-Patienten größtenteils um weibliche Individuen. Diese Verteilung war nicht beabsichtigt, sondern ergab sich durch den hohen weiblichen Patientenanteil während der Rekrutierungsphase der Versuchsteilnehmer. Die Geschlechterverteilung der Versuchsteilnehmer stimmt jedoch mit dem bekannten Geschlechterverhältnis bei rheumatoider Arthritis mit einem Frauen-Anteil von 75-85 % überein.

Gegenüber dem hohen Frauen-Anteil in der Gruppe der RA-Patienten steht die rein männliche Gruppe der Thrombozytenspender. Durch Gespräche mit den Angestellten des Blutspendedienstes der Universität zu Lübeck war zu erfahren, dass dies keine Momentaufnahme, sondern die Regel ist. Weibliche Thrombozytenspender seien hier die Ausnahme. Der Fakt, dass also keine Frauen in der Gruppe der Thrombozytenspender sind, ist somit nicht als Auswahl-Bias zu werten, sondern entspricht den in der Literatur publizierten Werten und stimmt mit den Erfahrungsdaten überein. Es war daher ein Patienten-Probanden-Matching, wie mit RA-Patienten und gesunder Kontrollgruppe, nicht möglich.

4.2 Ergebnisse der klinischen Laboruntersuchungen

Eine Gegenüberstellung der Laborwerte der klinischen Chemie bestätigte erwartungsgemäß die erhöhten Entzündungsparameter in der Gruppe der RA-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe und der Gruppe der ebenfalls gesunden Thrombozytenspender.

4.2.1 Vergleich von RA-Patienten mit der Kontrollgruppe

Die rheumatoide Arthritis als Systemerkrankung mit therapeutischer systemischer Immunsuppression durch Kortison und MTX hatte erwartungsgemäß einen Einfluss auf die klinischen Laborwerte. RA-Patienten zeigten erhöhte Entzündungsparameter; sie fielen durch signifikant erhöhte BSG, Leukozyten und tendenziell höheres CRP auf. Ebenso waren Thrombozytenzahl und PTT signifikant höher als bei der Kontrollgruppe der gesunden Probanden. Oberhalb der Referenzwerte lagen lediglich die BSG und CRP-Werte der RA-Patienten. Dies spiegelt sich auch in den DAS-28-Werten der RA-Patienten wider. Eine systemische Immunsuppression war bei diesen Patienten augenscheinlich nicht in der Lage, die systemische Entzündungsreaktion vollständig zu unterdrücken. Die Kontrollgruppe dagegen zeigte ausschließlich Normalwerte.

4.2.2 Vergleich der Thrombozytenkonzentratspender mit beiden Serumgruppen

Thrombozytenkonzentratspender imponierten durch signifikant geringere Werte bei BSG, CRP, Leukozytenzahlen und PTT als RA-Patienten. Die Unterschiede hinsichtlich der Entzündungsparameter BSG, CRP und Leukozytenzahl bei gesunden Thrombozytenkonzentratspendern und RA-Patienten war sogar noch deutlicher ausgeprägt als zwischen Kontrollgruppe und RA-Patienten. MCHC, INR und Erythrozytenzahl waren bei den Thrombozytenkonzentratspendern signifikant erhöht. Auch hier führt augenscheinlich die systemische Inflammation im Rahmen der RA bzw. die medikamentöse Immunsuppression zu deutlichen Unterschieden.

Im Vergleich der Werte der TK-Spender mit der Gruppe der gesunden Kontrollprobanden zeigten die Thrombozytenkonzentratspender signifikant geringere Werte für BSG, CRP und MCHC und signifikant höhere Werte für Hkt, Thrombozytenzahl und PTT. Bemerkenswert ist dies insofern, als dass beide Gruppen per definitionem als „gesund“ gelten. Trotz der teilweise signifikanten Unterschiede ist aber anzumerken, dass sämtliche ermittelten Laborparameter der Gruppe der Thrombozytenkonzentratspender und der Kontrollgruppe sich innerhalb der Referenzwerte bewegten.

Diese Unterschiede zwischen TK-Spendern und RA-Patienten sowie Kontrollgruppe könnten zusätzlich auch altersspezifisch begründet sein, da TK-Spender deutlich jünger sind (mittleres Lebensalter 29,6 Jahre (25-32)) als RA-Patienten (mittl. Lebensalter 49,3 Jahre (25-78)) und Kontrollgruppe (mittleres Lebensalter 49,5 Jahre (23-73)) und es sich somit nicht um matched pairs handelt.

4.3 Wachstumsfaktoren

4.3.1 Vergleich von RA-Patienten mit der Kontrollgruppe

Es ist bekannt, dass Glukokortikoide in physiologischen Konzentrationen stimulierend auf die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen wirken, in höheren, therapeutischen Dosen dagegen hemmend (7). Es kommt durch die immunsuppressive Therapie bei RA-Patienten jedoch nicht zu einer Normalisierung des Zytokinspiegels. In den vorliegenden Versuchen hatten RA-Patienten trotz Kortisonmedikation deutlich erhöhte Entzündungsparameter und erhöhte Zytokinspiegel proinflammatorischer Zytokine. Glukokortikoide drosseln insbesondere in der frühen Phase der Inflammation den Anstieg der proinflammatorischen Zytokine. Sie hemmen u. a. die TGF- β -Synthese (10). Sie steigern die Produktion von Fibronectin und hemmen die IL-1- und IL-6-Produktion. Anhand der durchgeführten Wachstumsfaktor-Quantifizierungen ließen sich diese Zustände nur teilweise bestätigen. RA-Patienten-Serum unterlag dem Kontrollgruppen-Serum deutlich im Gesamt-Proteingehalt sowie beim Gehalt an Fibronectin und TGF- β . Die proliferationsför-

dernden Wachstumsfaktoren wie HGF, PDGF, EGF und FGF waren in etwa gleichen Mengen bei RA-Patienten-Serum und Kontrollgruppen-Serum messbar.

EGF kommt in fast allen Körperflüssigkeiten vor. Die in der Literatur publizierten Daten geben für Serum Werte zwischen 130 pmol/l (11) und 1,0-1,8 ng/ml an (38). Die EGF-Werte von Kontrollgruppe und RA-Patienten stimmen in etwa mit Tsubotas Daten von 0,5 ng/ml überein (69). RA-Patienten und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht voneinander im EGF-Gehalt. RA-Patienten-Serum enthält gemittelt 0,82 ng/ml, während in der Kontrollgruppe 0,75 ng/ml gemessen wurden. Die Quantifizierung von EGF im Thrombozyten-Releasate erbrachte mit 1,46 ng/ml signifikant höhere Konzentrationen als in den beiden Serumgruppen. In klinischen Studien wird jedoch mit weit höheren Dosen therapiert. Topisch appliziertes rekombinantes EGF in Konzentrationen von 10-50 ng/ml bzw. 10 µg/ml erzielte gute Erfolgsraten bei Patienten mit Erosio, traumatischen Epitheldefekten bzw. Hornhautulzerationen (61, 66). Die Quantifizierung von EGF in Serum wie auch Thrombozyten-Releasate ergab Werte deutlich unterhalb dieser Konzentrationen. Trotzdem unterstützen Serum und Thrombozyten-Releasate die Proliferation, für die EGF bekanntermaßen ein wichtiger Mediator ist. Es fand sich bei der Korrelationsanalyse von EGF der RA-Patienten, der Kontrollgruppe sowie der Gruppe der Thrombozyten-Releasate mit sämtlichen klinischen Laborparametern sowie den Ergebnissen der Dosis-Wirkungs-Versuche und Zeit-Wirkungs-Versuche kein statistischer Zusammenhang (Anl. 7, Tab. 30). Die Migrationsversuche scheiden wegen zu kleiner Fallzahlen für eine statistische Korrelationsanalyse mit EGF und allen anderen folgenden Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen aus.

In der Literatur werden für PDGF-AB Werte um 14,5 ng/ml im Serum angegeben (31). Dies korrespondiert mit den eigenen Ergebnissen, bei denen RA-Patientenserum durchschnittlich 16,5 ng/ml enthält und die Kontrollgruppe 15,4 ng/ml. Auffällig ist, dass, obwohl RA-Patienten signifikant höhere Thrombozytenzahlen im Vollblut aufweisen als die Kontrollgruppe (357/nl vs. 216/nl), die PDGF-Konzentrationen beider Gruppen sich kaum unterscheiden (16511,30 pg/ml vs. 15447,85 pg/ml). Höhere Thrombozytenzahlen im Vollblut gehen also nicht zwangsläufig mit deutlich höheren PDGF-Mengen im Serum einher. Eine wichtige Aussage aus den quantitativen Wachstumsfaktorbestimmungen ist, dass eine rheumatoide Arthritis und immunsuppressive Medikation zwar nicht die Konzentration epitheliotropher Wachstumsfaktoren reduzieren, aber den Fibronektin- und TGF-β- sowie Gesamtprotein-Gehalt von Serum. Serum enthält zehnmal mehr Fibronektin als die Tränenflüssigkeit. Für Fibronektin werden von anderen Autoren Konzentrationen im Serum von 200 µg/ml (61) angegeben. Dies wurde von der gesunden Kontrollgruppe allerdings übertroffen mit 438,62 µg/ml. Ursächlich könnte der unterschiedliche Präparationsvorgang bei der Serumgewinnung zu Rieck und Pleyer (61) sein. RA-Patienten-Serum enthält sig-

nifikant weniger Fibronectin als die Kontrollgruppe, nämlich im Mittel 279,14 $\mu\text{g/ml}$. Fibronectin als wichtiger Faktor bei Differenzierung, Migration und Kollagensynthese ist ebenso essentiell für die Wundheilung und wird augenscheinlich durch eine RA als systemische Inflamationskrankheit in Kombination mit medikamentöser Immunsuppression durch MTX und Kortison reduziert.

Für TGF- β wurde sowohl eine dosis- und zelltypabhängige stimulierende, wie auch inhibierende Wirkung auf die Zellproliferation postuliert (42). Niedrige Konzentrationen von 0,02-0,1 ng/ml wirken eher stimulierend, während hohe Konzentrationen über 0,5 ng/ml inhibierend wirken. Bei Hornhautepithelzellen übt TGF- β unabhängig von der Konzentration nur hemmende Einflüsse aus. Die in der Literatur angegebenen TGF- β -Konzentrationen im Serum schwanken zwischen 6,03 ng/ml (32), 14,7 ng/ml (31) und 50 ng/ml (69). Gemäß den Untersuchungen von Liu et al. (44) führen hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten zu geringerer TGF- β -Konzentration im Serum als niedrigere. Tsubota (69), der eine eher niedrige Zentrifugationsgeschwindigkeit nutzte, erhielt daher auch minimal höhere, aber vergleichbare Werte, wie sie auch in den vorliegenden Untersuchungen dokumentiert wurden. Das gesunde Probanden-Kollektiv enthält durchschnittlich 46,1 (\pm 2,0) ng/ml TGF- β im Serum, RA-Patienten signifikant weniger, nämlich 41,77 (\pm 2,4) ng/ml.

TGF- β ist als Inhibitor der epithelialen Wundheilung bekannt, weshalb Tsubato eine Verdünnung des Serums auf 20 % vorschlug. Dies deckt sich in etwa mit den hier gemachten Beobachtungen. In den Dosis-Wirkungs-Versuchen zeigten sich optimale Proliferationsbedingungen bei einer Anwendung von 12,5%igem Serum. Durch diese Verdünnung wird jedoch auch die Konzentration von Substanzen, die die Wundheilung positiv beeinflussen, wie EGF, reduziert. Hier wäre ein möglicher Ansatzpunkt die schärfere Zentrifugation von Serum bei der Herstellung der Serum-AT, wie von Liu et al. (44) empfohlen, die Serumpräparationen mit unterschiedlichen Zentrifugationsstärken - nämlich 500 g sowie 3.000 g - untersuchten. Demnach reduziert eine stärkere Zentrifugation den Gehalt an TGF- β , aber erhöht den Gehalt an EGF und Vitamin A. Bei den Serum-Präparationen für die hier vorliegenden Untersuchungen wurde ebenfalls eine 3.000 g-Zentrifugation genutzt. Vorstellbar wäre, z. B. die Zentrifugation noch schärfer zu wählen unter der Vorstellung, dass sich die beschriebenen Effekte dadurch weiter verstärken. Dies müsste jedoch noch durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, TNF- α und IL-6, sind nicht nur in entzündeten Gelenken von RA-Patienten in erhöhter Konzentration vorhanden, sondern ihr Serumspiegel korreliert auch mit der Schwere der Erkrankung (7). Sie sind beteiligt an der Stimulation der Synthese von Akute-Phase-Proteinen wie CRP und der Leukozyteninfiltration. In den vorliegenden Daten fand sich eine positive Korrelation zwischen IL-6-Spiegel

und Leukozytenzahlen im Serum der RA-Patienten (Anl. 7, Tab. 30). Keine Korrelation bestand allerdings zwischen IL-6-Spiegel und BSG und CRP als weiteren Parametern für eine entzündliche Erkrankung. Es findet sich keine Korrelation zwischen IL-6-Spiegel der RA-Patienten und Ergebnissen der Dosis-Wirkungs-Versuche, Zeit-Wirkungs-Versuche oder Migrationsversuche. In der Kontrollgruppe korrelieren die IL-6-Spiegel lediglich mit den CRP-Werten. Alle anderen Ergebnisse der klinischen Laboruntersuchungen des Serums und der Proliferationsversuche korrelierten nicht mit den IL-6-Spiegeln.

Hinsichtlich des Vitamin-A-Gehalts gibt es in der Literatur weit höhere Angaben für Serumproben mit Konzentrationen von 55 µg/ml Vitamin A (69). Die hier durchgeführten Quantifizierungen ergaben für Serumproben der Kontrollgruppe 3,45 µmol/l, für RA-Patienten äquivalente Mengen von 3,57 µmol/l. RA-Patienten-Serum enthält u. a. mehr Vitamin E. Da die Wirkungen des Vitamin E sich v. a. auf die Zellalterung beziehen, ließen sich hierzu durch den verwendeten Versuchsaufbau keine weiteren Schlüsse ziehen.

4.3.2 Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum

Thrombozyten-Releasate und Serum unterschieden sich beachtlich voneinander hinsichtlich des Gehaltes an sämtlichen quantifizierten Wachstumsfaktoren und Zytokinen. PDGF, EGF, FGF und TGF-β sind in signifikant höheren Mengen im Thrombozyten-Releasate zu finden. Interessant ist hier nicht nur die Signifikanz, sondern auch die Menge an sich. Thrombozyten-Releasate weist etwa 6-mal soviel PDGF auf wie Serum, doppelt so viel EGF, mehr als doppelt so viel FGF, 6- bis 7-mal so viel TGF-β und weniger als ein Hundertstel des Gesamtproteingehalts von Serum.

TGF-β wird in großen Mengen in Thrombozyten gespeichert. Thrombozyten-Releasate übersteigt korrespondierend dazu die Serum-Werte in den vorliegenden Messungen deutlich mit 309,77 ng/ml. Das ist ebenfalls deutlich mehr als Chan et al. (15) in ihren Untersuchungen an Thrombozytenkonzentraten angeben. Sie dokumentierten Messwerte für den TGF-β-Gehalt von 112 ng/ml bis 157 ng/ml. Dabei ist anzumerken, dass Thrombozyten-Releasate aus Thrombozytenkonzentrat gewonnen wird und die Menge der Inhaltsstoffe somit justierbar ist. Ein durch Apherese hergestelltes Thrombozytenkonzentrat enthält durchschnittlich 2 bis 3 x 10¹¹ Thrombozyten in 200 ml Suspension gelöst. Das entspricht 1 bis 1,5 x 10⁹ Thrombozyten/ml. Durch den Waschvorgang zur Trennung von Thrombozyten und Suspension gehen Thrombozyten verloren. Pro Thrombozytenkonzentrat verblieben nach mehreren Waschungs- und Zentrifugationsschritten in den hier vorliegenden Versuchen durchschnittlich 223,7 x 10⁹ Thrombozyten (Minimum 165,4 x 10⁹, Maximum 275,7 x 10⁹, Standardabweichung 38,6 x 10⁹) für die weitere Verarbeitung zum Thrombozyten-Releasate. Bei der Präparation zum Thrombozyten-Releasate wurde die Lösung so konzentriert, dass sie einem Gehalt von 4 x 10⁹ Thrombozyten/ml entsprechen

würde. Die Unterschiede zu den publizierten Daten (15) könnten sich durch eine andere Ausgangskonzentration der Thrombozyten im Konzentrat bzw. durch die Präparationsmethode der Thrombozytenkonzentrate zu Thrombozyten-Releasate erklären. Für TGF- β fand sich keine Korrelation mit Ergebnissen der klinischen Chemie oder den Proliferationsversuchen (Anl. 7, Tab. 30).

In Thrombozytenkonzentraten findet sich PDGF-AA in einer Konzentration von 9,8 ng/ml bis 12,1 ng/ml (15). Davon ausgehend, dass PDGF-AA normalerweise 12 % des Gesamt-PDGF ausmacht und der PDGF-AB-Anteil bei 65 % liegt, ergibt sich rechnerisch eine PDGF-AB-Konzentration von 53,1 ng/ml bis 65,5 ng/ml. Dies stimmt mit den hier ermittelten Daten in etwa überein, bei denen der PDGF-AB-Gehalt der Thrombozyten-Releasate-Proben bei $95 \pm 18,2$ ng/ml liegt. Erwartungsgemäß übertrifft die Gruppe der Thrombozyten-Releasate den PDGF-AB-Gehalt von Serum signifikant, da PDGF typischerweise in den thrombozytären Granula in großen Mengen gespeichert wird. Wenn man davon ausgeht, dass bei der Präparation eines Thrombozyten-Releasate eine Konzentration von 4×10^9 Thrombozyten/ml ($= 4 \times 10^6$ / μ l, $= 4 \times 10^3$ /nl), also ca. 4.000 Thrombozyten/nl, eingestellt wurde, müsste im Thrombozyten-Releasate 10- bis 30-mal mehr PDGF als im Serum enthalten sein, denn Vollblut enthält bekanntlich nur zwischen 120 bis 400 Thrombozyten/nl. Thrombozyten-Releasate enthält in den Versuchen mit 95,1 ng/ml fast die 6fache Menge an PDGF-AB. Dies ist also weit weniger als man vermuten würde.

Das lässt zwei Schlüsse zu. Zum einen entstammt PDGF im Serum anscheinend nicht nur aus aggregierten Thrombozyten, sondern ein größerer PDGF-Anteil stammt auch aus anderen Zellen, wie z. B. Makrophagen/Monozyten. Zum anderen könnte es sein, dass bei der Herstellung des Thrombozyten-Releasate nicht alle Thrombozyten durch Thrombin zur Aggregation und somit Granulafreisetzung stimuliert wurden und somit ein Teil des PDGF verloren ging. Es ist bekannt, dass hohe alleinige PDGF-Dosen wundheilungsfördernd auf Beinulzera wirken (71). Es fand sich allerdings in den hier vorliegenden Ergebnissen kein Hinweis auf eine statistische Korrelation zwischen PDGF-Gehalt und Ergebnissen bei den Proliferationsversuchen (Anl. 7, Tab. 30).

Serum enthält signifikant (5- bis 6-mal) mehr HGF, Gesamtprotein, Vitamin A und E und Fibronectin. In Thrombozytenkonzentraten beträgt die Gesamtprotein-Konzentration 52,9 mg/ml bis 81,1 mg/ml (15). Die eigenen Messwerte liegen mit 3,69 mg/ml deutlich darunter. Die Ursache dafür ist unklar, denn anhand der ähnlichen PDGF-Werte von Chan et al. (15) wäre auch hier eine Ähnlichkeit zu erwarten gewesen. Im Serum der Kontrollgruppe ist das Gesamteiweiß etwa um den Faktor 150 höher als in Thrombozyten-Releasate, im Serum von RA-Patienten etwa 100fach höher konzentriert.

Der Vitamin-A-Spiegel in Thrombozyten-Releasate liegt signifikant unterhalb der Serum-Werte mit nur noch 0,06 $\mu\text{mol/l}$ und beträgt somit nur einen Bruchteil der Serum-Spiegel. Vitamin A ist kein typischerweise in Thrombozytengranula gespeichertes Biomolekül.

Thrombozyten-Releasate fällt durch einen zum Serum stark erniedrigten Fibronektin-Gehalt auf. Nur 6,38 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin - etwa 1/70stel des Serumgehalts - sind durchschnittlich enthalten. Dies entspricht den Erwartungen, da Fibronektin nicht zu den in den thrombozytären Speichergranula enthaltenen Mediatoren zählt.

Während bei manchen RA-Patienten und Kontrollprobanden IL-6 noch messbar war, lagen in der Gruppe der Thrombozyten-Releasate alle Werte der IL-6-Bestimmung unterhalb der Nachweisgrenze, was den Erwartungen entsprach, da IL-6 nicht von Thrombozyten synthetisiert wird.

4.4 Glukokortikoide und Proliferation

Steroide werden bei schweren Augenoberflächenerkrankungen topisch eingesetzt, um überschießende Entzündungsreaktionen mit Gefahr von Ulzeration und Infektion einzudämmen. Glukokortikoide haben bei in-vitro-Versuchen auf humane Fibroblasten und Epithelzellen antiproliferative Effekte, die mit zunehmender Kortisonkonzentration steigen (25). Auch im Tierversuch wurden u. a. negative Effekte von Kortikosteroiden auf die Wundheilung nachgewiesen, indem es bei Mäusen unter Kortisoneinfluss zu verminderter Granulation und Reepithelialisierung von Hautwunden kam (10). In den in-vitro-Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Gegensatz dazu kein negativer Effekt einer systemischen Kortisonmedikation auf das Proliferationsverhalten der Zellkultur, denn das Serum der RA-Patienten war in keinem Teilbereich der Untersuchungen, nämlich Proliferation, Migration und Differenzierung, dem der gesunden Kontrollgruppe unterlegen. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen von Sany et al. (63), die bei ihren Untersuchungen von Rheumatikern, die sich orthopädischen Operationen unterziehen mussten, keine gehäuften Raten von Wundheilungsstörungen unter einer medikamentösen Immunsuppression von Kortison und MTX fanden. Allerdings muss hierbei auch angemerkt werden, dass nicht bekannt ist, wie hoch die Serum-Spiegel von Kortison und MTX in der Patientengruppe waren, da diese nicht bestimmt wurden. Damit ist eine Vergleichbarkeit mit o. g. Studien u. U. nicht gegeben.

4.5 Einfluss von Serum und Thrombozyten-Releasate auf zelluläre Wachstumsprozesse

Nachdem nun festgestellt wurde, dass in den drei untersuchten Blutprodukten Unterschiede hinsichtlich des Gehalts an epitheliotropen Faktoren und Zytokinen bestehen, stellt sich nun die Frage, ob diese Unterschiede auch zu unterschiedlichen Ergebnissen

hinsichtlich der Unterstützung zellulärer Prozesse der Zellproliferation, -differenzierung und -migration führen. Hierzu wurden diese drei wesentlichen Teilschritte zellulärer Wachstumsprozesse einzeln betrachtet.

4.5.1 Proliferations-Experimente

4.5.1.1 Dosis-Wirkungs-Experimente

4.5.1.1.1 RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Serum ist in der Lage, die Proliferation von humanen Korneaepithelzellen positiv zu beeinflussen. Serum von RA-Patienten und Serum der Kontrollgruppe unterscheiden sich dabei in ihrer Wirkung kaum voneinander. In beiden Serum-Gruppen zeigte sich ein Trend zur Wachstumsunterstützung mit einer optimalen Verdünnung der Testlösung mit 0,9 % NaCl auf 12,5 %. Es lässt sich vermuten, dass dies der optimale Konzentrationsbereich verschiedener Wachstumsfaktoren ist, denn höhere oder niedrigere Konzentrationen führten jeweils zu einem verminderten Anstieg des ATP-Gehalts der Zellen. Die Proliferationskurven von beiden Serum-Gruppen verlaufen fast gleich. In diesen Versuchen, analog zu den von Tsubota et al. (69) publizierten Daten, wirkte also eine 8fache Serumverdünnung besser als die unverdünnte Anwendung. Dies könnte durch im Serum enthaltene inhibierende Faktoren begründet sein. Dafür werden vor allem die antiproliferativen Effekte von TGF- β verantwortlich gemacht, das im Serum in 5fach höherer Konzentration als im natürlichen Tränenfilm vorkommt, während EGF in Tränenflüssigkeit und Serum in annähernd gleichen Dosen enthalten ist. Daher wird eine 20 %-Verdünnung von Serum-AT empfohlen, um diese negativen Effekte antiproliferativer Zytokine nicht überwiegen zu lassen. Allerdings wird dadurch natürlich auch der Gehalt der proliferationsfördernden Zytokine, wie EGF, weiter verdünnt. Ferreira de Souza et al. (22) verzichteten auf eine Verdünnung und nutzten für ihre klinische Studie bei Hornhautepitheldefekten unverdünnte Serum-AT, um das Risiko der infektiösen Kontamination durch die Verdünnung zu umgehen. Es zeigten sich hierdurch keine Nachteile im Gegensatz zu der von Tsubota (69) postulierten Verdünnung.

Da Patientenserum ärmer an TGF- β war als das Serum der Kontrollgruppe, wäre zu erwarten gewesen, dass Patientenserum auch die Proliferation besser unterstützt. Dies lässt sich so jedoch nicht nachvollziehen. Ursächlich dafür könnten u. a. die Wirkungen von Kortison und MTX im Patientenserum sein.

4.5.1.1.2 Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum

Thrombozyten-Releasate unterstützt ebenfalls dosisabhängig die Proliferation der Hornhautepithelzellen und zwar wesentlich stärker als Serum. Anders als beim Serum gilt für Thrombozyten-Releasate, je höher die Konzentration der Lösung ist, desto stärker stimu-

liert sie die Proliferation der Zellen. Beste Ergebnisse erreichte die unverdünnte Anwendung. Diese Daten korrespondieren mit den in der Literatur publizierten in-vitro- und in-vivo-Versuchen (4, 13, 15, 17, 43, 47). Es fand sich kein Bericht, der eine Verdünnung von Thrombozyten-Releasate unterstützt hätte.

Obwohl in den Thrombozyten-Releasate sehr viel höhere Mengen an TGF- β gefunden wurden als sie im Serum vorkommen, nämlich 6- bis 7-mal soviel TGF- β , ließ sich hierdurch keine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum nachweisen. Die Proliferation von Korneaepithelzellen wird bekanntermaßen hauptsächlich stimuliert durch EGF, FGF, HGF und PDGF, während sie durch TGF- β gehemmt wird (45, 60, 61). Nun scheinen also v. a. PDGF und TGF- β im Thrombozyten-Releasate im Vergleich zu allen anderen Wachstumsfaktoren überrepräsentiert zu sein. Obwohl sich die Quellen der Wachstumsfaktoren bei Serum und Thrombozyten-Releasate unterscheiden, bleibt das Verhältnis dieser beiden wichtigen Mediatoren annähernd gleich, denn im Serum ist das Verhältnis PDGF zu TGF- β in etwa 1:3, während es im Thrombozyten-Releasate bei 1:3,3 liegt. TGF- β ist im Thrombozyten-Releasate also gering überwiegend. Trotzdem übersteigt die stimulierende Wirkung des Thrombozyten-Releasate auf die Proliferation die des Serums bei weitem. Dies kann man entweder als Widerspruch zu den Gedanken von Tsubota et al. (69) werten, die, wie oben angeführt, die bessere Wirksamkeit von verdünntem Serum durch den damit erniedrigten TGF- β -Gehalt erklären. Oder aber Tsubota et al. liegen mit ihrer Vermutung richtig und die eigentlich durch TGF- β verursachte Proliferationsinhibierung wird durch andere im Thrombozyten-Releasate enthaltene Faktoren mehr als aufgehoben, so dass im Ergebnis eine positive Proliferationsbilanz bleibt. Letztlich könnte man hierüber Klarheit erlangen, indem man Proliferationsversuche durchführt, bei denen man normales Thrombozyten-Releasate vergleicht mit einem Thrombozyten-Releasate, bei dem der TGF- β -Gehalt reduziert ist.

Insgesamt scheint die in der Literatur beschriebene inhibierende Wirkung von TGF- β auf die Zellproliferation sich in den Daten der vorliegenden Arbeit nicht widerzuspiegeln. Probandenserum enthielt signifikant mehr TGF- β als Serum der RA-Patienten. Das geht jedoch nicht mit einer verminderten Proliferation einher, sondern die Werte der Kontrollgruppe übertreffen die Ergebnisse der Patienten in den meisten Versuchen um ein geringes. Ebenso übertrifft Thrombozyten-Releasate, das deutlich mehr TGF- β enthält als Serum, die Proliferationsergebnisse der beiden Serum-Gruppen mehr als eindeutig. Der TGF- β -Gehalt korreliert nicht mit den Proliferationsergebnissen.

In einer in-vitro-Kultur von retinalem Pigmentepithel wurde bereits die proliferationssteigernde Wirkung von Thrombozytenkonzentrat, PDGF und Serum nachgewiesen (70). Bei kurzen Inkubationszeiten waren Thrombozytenkonzentrat und PDGF der Wirkung von Serum überlegen, mit zunehmender Inkubationszeit nahm die proliferationssteigernde

Wirkung ab und die Kurven näherten sich einander an. Dies deckt sich mit den hier dargestellten Daten, obwohl es sich um andere Zelltypen handelt. Diese Untersuchungen (70) dokumentierten aber auch bei der Migration eine Überlegenheit von Thrombozytenkonzentrat und PDGF gegenüber dem Serum. Serum wirkte überhaupt nicht migrationsfördernd. Dies widerspricht den hier dargestellten Daten, bei denen Serum die Migration von Korneaepithel deutlich besser stimulierte als Thrombozyten-Releasate. Thrombozyten-Releasate führte in den Beobachtungen der Migrationsversuche zu einem Ablösen der Zellen von ihrer Unterlage. Thrombozyten-Releasate und Serum scheinen demnach zelltypenspezifisch zu wirken.

Die vorliegenden Untersuchungen stehen ebenfalls im Gegensatz zu den Daten von Chan et al. (15). Diese untersuchten die Einflüsse von Thrombozyten-Releasate auf das Wachstum einer Fibroblastenzellkultur. In ihren Versuchen zeigten sich bei einer Konzentration des Thrombozyten-Releasate über 35 % zunehmend schädliche bzw. nachteilige Einflüsse auf das Fibroblastenwachstum. Die hier dargestellten Daten zeigen dagegen eine zunehmende Proliferation der Hornhautepithelzellen mit steigender Konzentration des Thrombozyten-Releasate. Auch könnte Zelltypenspezifität eine Ursache der Unterschiede sein.

4.5.1.2 Zeit-Wirkungs-Experimente

4.5.1.2.1 RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Serum stimuliert zwar die Proliferation, aber eine längere Inkubationszeit mit Serum bringt keine Vorteile gegenüber kurzen Inkubationszeiten. In den Zeit-Wirkungs-Experimenten über 2 h bis 96 h zeigte sich, dass eine zunehmende Inkubationszeit der Zellen mit Serum nicht zu steigender Proliferation führt. Optimale Proliferation findet sich nach 12- bzw. 48-stündiger Inkubation. Klar sagen lässt sich lediglich, dass eine sehr lange Inkubationszeit, wie 96 h, eher zu schlechteren Ergebnissen führt. Nach dieser Zeit kam es nur noch zu einem halb bis zu einem Drittel so hohen ATP-Anstieg der Zellen als Maß für die Proliferation. Dies bedeutet, dass innerhalb des Zeitraumes von 48 h bis 96 h ein nicht unerheblicher Prozentsatz der Zellen das Wachstum vollständig eingestellt hat bzw. zu Grunde gegangen ist. Die Wachstumskurven von RA-Patienten und Kontrollgruppe verhalten sich gleich, wobei das Serum der RA-Patienten im Schnitt etwas besser abschnitt als das Serum der Kontrollgruppe. Bei 12 h sowie langen Inkubationszeiten von 72 h und 96 h ist diese Überlegenheit sogar signifikant.

4.5.1.2.2 Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum

Im Zeit-Wirkungs-Experiment ist die proliferationsbeschleunigende Wirkung des Thrombozyten-Releasate der des Serums von RA-Patienten und Kontrollgruppe in den ersten

24 h deutlich überlegen. Im Versuchsaufbau über 2 h bis 96 h mit Thrombozyten-Releasate ließ sich aber auch eine deutliche Abnahme der eben beschriebenen Stimulierung der Proliferation mit zunehmender Inkubationszeit nachweisen. Bereits nach 2 h flacht die ATP-Kurve als Maß für die Proliferation deutlich ab. Wurden die Zellen statt 2 h für 12 h mit der Testlösung inkubiert, war nur noch etwa die Hälfte des ATP-Anstiegs messbar. Nach 96 h betrug der ATP-Zuwachs nur noch etwa ein Zehntel dessen, was nach 2-stündiger Inkubation erreicht werden kann. Es zeigt sich also, je kürzer die Inkubationszeit mit Thrombozyten-Releasate ist, desto höher fällt der ATP-Anstieg als Maß für die Proliferation aus. Mit zunehmender Inkubationszeit fällt der ATP-Anstieg jedoch immer geringer aus. Dies könnte an mehreren Faktoren liegen. Zum einen könnte dieser Kurvenabfall bedingt sein durch eine Verarmung an thrombozytären Mediatoren, die von den Hornhautepithelzellen verbraucht werden. Zum anderen ist auch denkbar, dass die Zellen durch die im Thrombozyten-Releasate enthaltenen Mediatoren so stark stimuliert werden, dass ihr Stoffwechsel mehr Nährstoffe benötigt, die im Thrombozyten-Releasate jedoch nicht enthalten sind. Es kommt quasi zu einem „Hungerzustand“ der Zellen. Die Zellen werden zwar weiter stimuliert zur Proliferation, es fehlen jedoch die für ein Zellwachstum benötigten Bausteine, um die weiter angebotenen Signale umzusetzen. Eine andere Möglichkeit, die eine Abnahme der Proliferation mit zunehmender Inkubationszeit verursachen könnte, wäre ein sich entwickelnder Überschuss an inhibitorischen thrombozytären Mediatoren nach Verbrauch der stimulierend wirkenden. Letztlich ist es auch vorstellbar, dass es zu einer Ansammlung toxischer Zellstoffwechselprodukte kommt, die sich negativ auf das Zellmilieu und die Wachstumspotenz auswirkt. Aufschluss über diese Fragen könnten Proliferationsversuche geben, in denen das Thrombozyten-Releasate innerhalb weniger Stunden mehrmals neu aufgetragen wird. Es bleibt ebenso noch weiter zu erforschen, wie sich das Wachstum der Zellkultur verhält, wenn man Thrombozyten-Releasate Nährstoffe zufügt, wie Aminosäuren, Vitamine, Elektrolyte etc.

Besonders interessant ist eine Verknüpfung von Dosis-Wirkungs-Versuch und Zeit-Wirkungs-Versuch. Beim Dosis-Wirkungs-Versuch wurden die Zellen 24 h lang mit den unterschiedlich verdünnten Testsubstanzen inkubiert. Thrombozyten-Releasate führt bei einer 25%igen Verdünnung zu einer Zunahme der ATP-Biolumineszenz von 15 %. Die Zeit-Wirkungs-Versuche wurden alle mit einer 20%igen Verdünnung durchgeführt. Der 24 h-Wert für die Thrombozyten-Releasate-Gruppe beträgt 22 %. Beide Versuche sind also vergleichbar, denn ähnliche Verdünnungen erbringen bei gleicher Inkubationszeit ähnliche ATP-Anstiege. Wenn nun jedoch die ATP-Werte des Zeit-Wirkungs-Versuches der Inkubationszeiträume von 2 h und 12 h betrachtet werden, fällt auf, dass der ATP-Anstieg sehr viel höher ausfällt. Bei der kürzesten Inkubationszeit von 2 h werden maximale ATP-Werte erreicht von 62,63 %, bei 12 h sind es immerhin noch 32,79 %.

Im Dosis-Wirkungs-Experiment hatte sich gezeigt, dass Thrombozyten-Releasate am besten wirkt, wenn es nicht verdünnt aufgetragen wird. Diese Werte werden jedoch bei weitem von den Ergebnissen im Zeit-Wirkungs-Versuch übertroffen, bei denen eine 20%ige Verdünnung des Thrombozyten-Releasate nach nur 2 h Inkubationszeit rund das Doppelte des ATP-Anstieges erreicht. Es ist daher durchaus denkbar, dass die Zellen bei einer Inkubation über 2 h mit unverdünntem Thrombozyten-Releasate noch sehr viel bessere Ergebnisse hinsichtlich ihrer Proliferationsrate erzielen könnten.

4.5.2 Migration

4.5.2.1 RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

In den Migrationsversuchen ließ sich eine positive Wirkung von Serum auf die zelluläre Migration der Korneaepithelzellen dokumentieren. Serum fördert die Migration. Je länger die Zellen mit Serum inkubiert werden, desto größer wird der Zellhof, der als Maß der Migration der vorab teilungsunfähig gemachten Zellen gilt. Innerhalb von 24 h vergrößerten sich die Zellhöfe um ca. ein Viertel, nach 144 h hatte sich die Fläche verdreifacht. Wieder waren die Ergebnisse der RA-Patienten denen der Kontrollgruppe in etwa gleich. Dies ist insofern erstaunlich, als dass das Serum der RA-Patienten signifikant weniger Fibronectin enthielt, verglichen mit dem Serum der Kontrollgruppe. Es ist allerdings auch bekannt, dass die Migration nicht nur durch Fibronectin, sondern auch durch HGF und EGF stimuliert wird. HGF und EGF sind beide, wenn schon nicht signifikant, so aber doch in höheren Konzentrationen im Patientenserum enthalten. Es wäre möglich, dass sich dadurch die eventuell nachteiligen Effekte des verminderten Fibronectingehalts ausgleichen.

Anders als bei der Proliferation, bei der verdünntes Serum deutlich besser wirkt als unverdünntes, wird die Migration am besten durch unverdünntes Serum stimuliert. Unverdünntes Probandenserum erzielte in den Migrationsversuchen von allen drei Gruppen die besten Ergebnisse, die Unterschiede zu unverdünntem Patientenserum waren aber nicht signifikant. Eine Verdünnung des Serums der RA-Patienten und Kontrollgruppe auf 25 % wirkte mit zunehmender Zeit deutlich schlechter, wenn es auch immer noch eine deutliche migrationsstimulierende Wirkung hat. Ursächlich hierfür ist am ehesten der durch die Verdünnung gesenkte Fibronectin-Gehalt.

4.5.2.2 Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum

Anhand der Migrationsergebnisse lässt sich feststellen, dass Thrombozyten-Releasate allein nicht in der Lage ist, die Migration der Korneaepithelzellen zu stimulieren. Es kommt je nach Inkubationszeit und Verdünnungsgrad zu einem mehr oder minder schnell einsetzenden Ablösen der Zellen von der Unterlage. Auch hierfür scheinen Mangelzustände ursächlich zu sein, denn anhand der Migrationsversuche mit Thrombozyten-Releasate,

das mit 0,9 % NaCl verdünnt wurde, lässt sich erkennen, dass Zellen, die mit stark verdünntem Thrombozyten-Releasate inkubiert wurden, sehr viel früher den Kontakt untereinander und zur kollagen-beschichteten Unterlage verloren als Zellen, die mit einer höher konzentrierten Lösung inkubiert waren. Durch eine Verdünnung des Releasate mit 0,9 % NaCl wurden diese negativen Effekte noch beschleunigt. Dies ist insofern interessant, als dass es nahe legt, dass die Migrationsinhibition nicht ein aktiver Prozess ist, der durch Stoffe im Thrombozyten-Releasate gefördert wird. Ansonsten hätten die höher konzentrierten Lösungen durch eine Anhäufung dieser Inhibitoren zu einem früheren Ablösen der Zellen führen müssen. Viel eher spricht es dafür, dass das an Wachstumsfaktoren sehr reiche Thrombozyten-Releasate zwar die der Zellmigration zugrunde liegenden zellulären Mechanismen stimuliert, es jedoch auf der Grundlage von nutritiven Mangelzuständen nicht zu einer Umsetzung der Signale kommt.

Passend hierzu konnte festgestellt werden, dass Thrombozyten-Releasate signifikant weniger Fibronektin enthält als das Serum von RA-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Dies korrespondiert mit den auffallend schlechten Ergebnissen der Thrombozyten-Releasate-Gruppe in den Migrationsversuchen. Es zeigte sich, dass Thrombozyten-Releasate allein nicht imstande ist, die Migration positiv zu beeinflussen. Dies konnte nur durch Zusatz eines albuminhaltigen Mediums erreicht werden.

Unterstützt wird dieser Gedanke durch die Untersuchungen des Einflusses von Thrombozyten-Releasate, das mit einem serumalbuminhaltigen Minimal-Medium versetzt war. Grundsätzlich lässt sich erkennen, sobald man dem Thrombozyten-Releasate Nährstoffe in Form eines Minimal-Mediums zufügt, wirkt es positiv auf die Migration. Es kommt nun nicht mehr zu einem Ablösen der Zellgruppen, sondern, wie auch beim originären Serum, zu einer Flächenzunahme der Zellhöfe. Es zeigt sich, dass eine Lösung, die zu $\frac{1}{4}$ aus Thrombozyten-Releasate und zu $\frac{3}{4}$ aus Minimal-Medium besteht, die Migration signifikant besser stimuliert als eine Lösung mit 65 % Thrombozyten-Releasate-Anteil. Das Verhältnis von stimulierenden Faktoren zu Nährsubstrat ist bei geringerem Thrombozyten-Releasate-Anteil besser. Die Ergebnisse bleiben aber immer hinter den Ergebnissen der reinen Serum-Anwendung zurück.

Diese Daten bestätigen die Annahme, dass Thrombozyten-Releasate selbst zwar in der Lage ist, die Migration von Hornhautepithelzellen zu stimulieren, wenn den Zellen zusätzlich nutritive Faktoren zugeführt werden, aber eine Größenzunahme der Zellhöfe ist lediglich durch Zugabe eines serumalbuminhaltigen Minimal-Mediums zu erreichen.

Im Zusammenhang hiermit steht am ehesten der niedrige Fibronektin Gehalt von Thrombozyten-Releasate-Serum von etwa 70-mal weniger Fibronektin. Dieser erniedrigte Fibronektin Gehalt kann nicht z. B. durch das in großen Mengen vorhandene PDGF aufgewogen werden, von dem ebenfalls eine migrationsfördernde Wirkung bekannt ist.

4.5.3 Differenzierung

Die Differenzierung in ein mehrschichtiges Plattenepithel wird durch TGF- β , HGF, Vitamin A und E reguliert. Die Inhaltsstoffe von Thrombozyten-Releasate und Serum beeinflussen die Zelldifferenzierung sehr unterschiedlich. Die Bewertung der rasterelektronenmikroskopischen Photographien unterliegt jedoch deutlich subjektiven Einflüssen.

4.5.3.1 RA-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Unter dem Einfluss beider Serumgruppen bildete sich ein konfluenter Zellrasen mit typischer polygonaler Zellkonfiguration, Zell-Zell-Kontakten und Mikrovilli. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der mit Serum inkubierten Hornhautepithelzellen dokumentierten bei RA-Patienten und Kontrollgruppe einen gleichwertig positiven Einfluss auf die Zelldifferenzierung.

4.5.3.2 Thrombozyten-Releasate im Vergleich mit Serum

Bei der Zelldifferenzierung entsteht unter dem Einfluss der hochkonzentrierten thrombozytären Wachstumsfaktoren und Zytokine im Thrombozyten-Releasate ein im Vergleich zu Serum sehr unruhiges, abnormes Zellbild, das wenig Ähnlichkeit mit einem gewöhnlichen Korneaepithel hat. Thrombozyten-Releasate übt deutlich negative - unerwünschte - Effekte auf die Zellstruktur aus. Es finden sich weniger einheitliche Zellformationen, die v. a. durch viele z. T. sehr ausgeprägte zytoplasmatische Zellausläufer imponieren. Die polygonale Konfiguration tritt eher in den Hintergrund. Dieser gesteigerte Aktivitätsgrad spiegelt sich auch in den erhöhten ATP-Mengen der Proliferationsversuche wider.

4.6 Fazit

Zur Kernfrage 1: „Hat eine immunologische Grunderkrankung wie die RA mit systemischer Immunsuppression Einfluss auf die Konzentration von epitheliotropen Faktoren/proinflammatorischen Zytokinen im Serum?“

Es ist bekannt, dass inflammatorische Systemerkrankungen wie die RA den Zytokinpiegel verändern. Ebenso wirken Glukokortikoide in physiologischen Konzentrationen stimulierend auf die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen, in höheren, therapeutischen Dosen dagegen hemmend (7). In den durchgeführten Untersuchungen zeigen die RA-Patienten erhöhte Entzündungsparameter, wie BSG, CRP und Leukozytenzahlen, gegenüber der Kontrollgruppe. Ebenso kommt es durch die immunsuppressive Therapie bei den RA-Patienten nicht zu einer Normalisierung des Zytokinpiegels im Vergleich zum Kontrollgruppenserum. Eine wichtige Aussage aus den quantitativen Wachstumsfaktorbestimmungen ist, dass eine rheumatoide Arthritis und immunsuppressive Medikation zwar nicht die Konzentration epitheliotropher Wachstumsfaktoren, wie HGF, PDGF, EGF und

FGF, reduzieren, aber den Fibronectin- und TGF- β - sowie Gesamtprotein-Gehalt von Serum. Fibronectin, als essentieller Faktor für die Wundheilung bei Differenzierung, Migration und Kollagensynthese, wird augenscheinlich durch eine RA als systemische Inflammationskrankheit in Kombination mit medikamentöser Immunsuppression durch MTX und Kortison reduziert.

Zur Kernfrage 2: „Wie verhalten sich die Konzentrationen der epitheliotropen Faktoren/proinflammatorischen Zytokine in Thrombozyten-Releasate, das aus Thrombozytenkonzentraten hergestellt wurde?“

Thrombozyten-Releasate und Serum unterscheiden sich beträchtlich voneinander hinsichtlich des Gehaltes an sämtlichen quantifizierten Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Vor allem Faktoren, die die Zellproliferation und Zelldifferenzierung beeinflussen, sind z. T. in hohem Maße überrepräsentiert im Vergleich zu Serum: PDGF (6,1fache Serummenge), EGF (2fach), FGF(2,6fach) und TGF- β (6,7fach). Dagegen sind migrationsstimulierende Faktoren nur in geringem Maße - z. T. nur spurenhaf - vorhanden: Fibronectin (1/69 der Serummenge), ebenso HGF(1/4,5), Gesamtprotein (1/146), Vitamin A (1/578) und E (1/76).

In der Zusammensetzung der einzelnen epitheliotropen Faktoren sind Thrombozyten-Releasate und Serum einander äußerst unähnlich.

Zur Kernfrage 3: „Bestehen Unterschiede in der epitheliotropen Kapazität zwischen den drei verschiedenen Blutprodukten (1. Serum gesunder Spender, 2. Serum RA-Erkrankter unter medikamentöser Immunsuppression, 3. Thrombozyten-Releasate)?“

Die epitheliotrope Kapazität der einzelnen Blutprodukte wurde anhand der drei Teilschritte der Wundheilung nämlich Proliferation, Migration und Differenzierung beurteilt.

Proliferation: Das Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe beeinflusst in vitro die Proliferation von humanen Korneaepithelzellen positiv. Beide Serumgruppen unterscheiden sich dabei in ihrer Wirkung kaum voneinander, ersichtlich an den fast gleich verlaufenden Proliferationskurven. Bei beiden wirkt eine 12,5%ige Verdünnung der Testlösung mit 0,9 % NaCl optimal auf die Zellkultur. Es lässt sich vermuten, dass dies der optimale Konzentrationsbereich verschiedener Wachstumsfaktoren ist, denn höhere oder niedrigere Konzentrationen führten jeweils zu einem verminderten Anstieg des ATP-Gehalts der Zellen. Ein Nebeneffekt der Verdünnung ist, dass sich so eine größere Menge AT aus einer Blutprobe herstellen lässt. In den Zeit-Wirkungs-Experimenten zeigte sich, dass eine zunehmende Inkubationszeit der Zellen mit Serum nicht zu steigender Proliferation führt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich für eine klinische Anwendung schlussfolgern, dass für die lokale Therapie mit Serum-AT eine mehrmals tägliche Applikation innerhalb weniger

Stunden bevorzugt werden sollte. Die wichtigste Aussage ist jedoch, dass insgesamt eine Kombination von rheumatoider Arthritis und systemischer Immunsupprimierung, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, keinen nachteiligen Einfluss auf die Proliferation von kornealen Epithelzellen in einem Zellkulturmodell hat. Es lässt sich also vermuten, dass bei RA-Patienten zur Behandlung von persistierenden Epithelzelldefekten ebenso autologes Serum eingesetzt werden kann wie bei Patienten ohne Systemerkrankung oder Immunsuppression.

Thrombozyten-Releasate unterstützt ebenfalls dosisabhängig die Proliferation der Hornhautepithelzellen. Hinsichtlich der proliferationsunterstützenden Wirkung ist es dem Serum sogar deutlich überlegen. Anders als beim Serum gilt für Thrombozyten-Releasate, je höher die Konzentration des Thrombozyten-Releasate ist, desto stärker wird die Zellproliferation stimuliert. Beste Ergebnisse erreichte die unverdünnte Anwendung. Im Zeit-Wirkungs-Experiment ist die proliferationsbeschleunigende Wirkung des Thrombozyten-Releasate der des Serums von RA-Patienten und Kontrollgruppe in den ersten 24 h deutlich überlegen. Je kürzer die Inkubationszeit mit Thrombozyten-Releasate ist, desto größer ist der stimulierende Effekt der Testlösung auf die Proliferation. Thrombozyten-Releasate in seiner originären Zusammensetzung wirkt auf die inkubierten Hornhautepithelzellen optimal, wenn es unverdünnt, mehrmals täglich neu aufgetragen wird, am besten in kurzfristigen Abständen von wenigen Stunden. Dies sollte für eine eventuelle Applikation am Auge berücksichtigt werden.

Migration: Serum stimuliert die zelluläre Migration. Anders als die Proliferation wird die Migration besser durch unverdünntes als durch verdünntes Serum unterstützt. Ursächlich hierfür ist am ehesten der durch die Verdünnung gesenkte Fibronectin-Gehalt. Insgesamt lässt sich erneut feststellen, dass auch auf die Migration eine Systemerkrankung wie die RA mit immunsuppressiver Medikation keine negativen Einflüsse hat, denn die Migrationsergebnisse von RA-Patienten- und Kontrollgruppenserum unterscheiden sich kaum voneinander. Bei Augenoberflächendefekten, bei denen v. a. die Migration defizitär ist, sollte eine unverdünnte Serumanwendung der verdünnten vorgezogen werden. So könnte z. B. bei persistierenden Epitheldefekten zuerst mit unverdünnter Serumanwendung der Defekt durch Migration geschlossen werden, bevor die Zellen, mit verdünntem Serum behandelt, mit Proliferation und Differenzierung beginnen (44).

Thrombozyten-Releasate dagegen wirkt negativ auf die Zellmigration. Hinsichtlich dieses Teilschrittes der zellulären Wundheilung ist es der Wirkung von Serum deutlichst unterlegen. Thrombozyten-Releasate allein ist nicht in der Lage, die Migration der Korneaepithelzellen zu stimulieren. Es kommt je nach Inkubationszeit und Verdünnungsgrad zu einem Ablösen der Zellen von der Unterlage. Ursächlich scheinen Mangelzustände an nutritiven Faktoren zu sein. Dies kann durch Nährstoffzusatz, z. B. in Form eines serum-

haltigen Minimalmediums, zwar aufgefangen, aber nicht ausgeglichen werden. Zur Stimulierung der Zellmigration im Rahmen der Wundheilung ist Thrombozyten-Releasate in seiner derzeitigen Form nicht geeignet.

Die Zelldifferenzierung wird durch RA-Patienten- und Kontrollgruppenserum gleich gut stimuliert. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen dokumentierten bei beiden Gruppen einen gleichwertig positiven Einfluss auf die Zelldifferenzierung, insbesondere auf die Ausbildung von Mikrovilli. Es fand sich kein Hinweis darauf, dass eine rheumatologische Grunderkrankung mit medikamentöser Immunsupprimierung schädliche Einflüsse auf das Differenzierungsverhalten der Hornhautepithelzellen hat.

Unter dem Einfluss der hochkonzentrierten thrombozytären Wachstumsfaktoren und Zytokine im Thrombozyten-Releasate entsteht jedoch ein im Vergleich zu Serum sehr unruhiges, abnormes Zellbild, das wenig Ähnlichkeit mit einem gewöhnlichen Korneaepithel hat. Thrombozyten-Releasate ist im Hinblick auf die Zelldifferenzierung dem Serum nicht nur unterlegen, sondern es übt sogar deutlich negative Einflüsse auf die zelluläre Differenzierung aus. Thrombozyten-Releasate eignet sich damit nicht zur topischen Behandlung bei defizitärer Zelldifferenzierung.

Zur Kernfrage 4: „Korreliert der Gehalt ausgewählter Wachstumsfaktoren mit spezifischen Zellfunktionen?“

In sämtlichen Korrelationsanalysen (Anl. 7, Tab. 30), die einen statistischen Zusammenhang zwischen epitheliotrophen Wachstumsfaktoren/Zytokinen und den Ergebnissen der Proliferation in Dosis- sowie Zeit-Wirkungs-Beziehung und der Migration prüften, fand sich kein Anhalt dafür, dass ein bestimmter Faktor herauszuheben ist. Eine statistische Auffälligkeit war nicht nachweisbar. Das untermauert den Gedanken, dass Serum bzw. Thrombozyten-Releasate eben nicht nur aus voneinander unabhängigen Einzelfaktoren bestehen, sondern dass ein komplexes Zusammenspiel der Einzelbestandteile letztlich ihre Wirksamkeit bedingt. Diese Komplexität lässt sich jedoch nur schwer anhand eines in-vitro-Modells beschreiben. Es spricht aber dafür, den „Mediatormix“ in Form von Serum bzw. Thrombozyten-Releasate einer Einzelanwendung von rekombinanten Wachstumsfaktoren/Zytokinen vorzuziehen.

Von Serum ist bekannt, dass es dem natürlichen Tränenfilm ähnliche biophysikalische und biochemische Eigenschaften hat. Serum und Thrombozyten-Releasate unterscheiden sich jedoch stark voneinander. Das Ausmaß der epitheliotrophen Effekte von autologen Blutprodukten wird v. a. bestimmt durch die Zusammensetzung der nutritiven Faktoren und Wachstumsfaktoren. Serum erzielt gute Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Migration von Hornhautepithelzellen. Da Serum aber nicht auf alle Zellprozesse

gleich stimulierend wirkt, ist es wichtig, vor der Anwendung am Auge herauszufinden, welcher Teilschritt der Wundheilung vor allem gestört ist, denn die Proliferation wird besser unterstützt durch verdünntes Serum, während die Migration vor allem von unverdünntem Serum profitiert. Das Serum immunsupprimierter RA-Patienten ist in seiner Wirkung dem von Gesunden gleichzustellen. Bei immunsupprimierten Patienten mit rheumatoider Arthritis, deren persistierender Epitheldefekt bei konventioneller Therapie nicht heilt, sollte daher die Verwendung von qualitätskontrolliertem autologem Serum erwogen werden. Es bleibt die Frage zu klären, die bereits Geerling et al. (29) beschäftigte, ob das Serum vor der Anwendung am Auge filtersterilisiert werden sollte. Dadurch könnten die nach der Zentrifugation im Serum verbliebenen korpuskulären Bestandteile aus dem Serum entfernt werden, die für lokale Irritationen am Auge ursächlich sein könnten. Nachteilig wäre allerdings, dass nicht nur die korpuskulären Blutbestandteile, sondern auch Extrazellulär-matrixproteine, die für die Wundheilung positive Effekte haben, entfernt würden.

Thrombozyten-Releasate erzielt auf die Proliferation von Hornhautepithelzellen weitaus größere Effekte als Serum, ist jedoch nicht in der Lage, die zelluläre Migration zu unterstützen und führt des Weiteren auch zu einer abnormen Differenzierung. Diese beiden letztgenannten Effekte sind als unerwünscht zu werten, es bleibt jedoch offen, ob bei der Anwendung am Auge die positiven Effekte auf die Proliferation die negativen überwiegen. Für eine Anwendung am Auge sollten Thrombozyten-Releasate-Produkte weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Es bieten sich vergleichende Experimente mit natürlicher Tränenflüssigkeit und Thrombozyten-Releasate an. Ist es z. B. vorteilhaft, Thrombozyten-Releasate in eine visköse Form zu überführen, um die Haftungszeit am Auge zu verlängern? Können Zusätze von nutritiven Faktoren zu den thrombozytären Wachstumsfaktoren die Wirksamkeit verbessern?

Beide Blutprodukte, Serum wie auch Thrombozyten-Releasate, haben für sich genommen Vor- und Nachteile. Weitere Untersuchungen könnten Fortschritte auf dem Weg zu einem optimalen Tränenersatzstoff geben. Eine vielversprechende Möglichkeit könnte die kombinierte Anwendung von Thrombozyten-Releasate und autologem Serum sein. Dadurch könnte in einer ersten Anwendung die Proliferation durch die thrombozytären Mediatoren stimuliert werden und in einer zeitlich versetzten zweiten Anwendung die Differenzierung und Migration durch Serum. Auch eine zeitgleiche Anwendung durch Mischung von Thrombozyten-Releasate mit autologem Serum ist denkbar. Es könnte hierdurch ein optimales, wundheilungsförderndes, autologes Blutprodukt designed werden. Dadurch könnten die Zellen auf einen Pool der unterschiedlichsten, die Wundheilung unterstützenden Faktoren zurückgreifen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Ziel dieser Arbeit war, vergleichende Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Blutkomponenten auf zelluläre Prozesse einer humanen Hornhautepithelzelllinie durchzuführen, um Erkenntnisse über eine mögliche therapeutische Nutzung bei schwer heilenden Augenoberflächenerkrankungen, wie sie gehäuft bei immunologischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, auftreten zu gewinnen.

Material und Methoden: Aus Vollblutproben von zehn gesunden Individuen und zehn Patienten mit RA unter Prednisolon- und MTX-Therapie wurde Serum gewonnen. Aus zehn Thrombozytenkonzentraten wurde Thrombozyten-Releasate hergestellt. In diesen Präparaten wurde der Gehalt an Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen mittels ELISA- bzw. HPLC-Technik gemessen. In einem Zellkulturmodell SV-40 immortalisierte humaner Hornhautepithelzellen wurden die Effekte der drei Blutprodukte auf die Proliferation, Migration und Differenzierung getestet. Die Proliferation der Zellkulturen wurde mit Hilfe eines lumineszenz-basierten ATP-Assay in Dosis- und Zeit-Wirkungs-Experimenten quantifiziert. Mittels eines Kolonie-Dispersions-Assays wurde der Einfluss auf die Migration und mittels Rasterelektronenmikroskopie die Oberflächendifferenzierung der Zellen untersucht.

Ergebnisse: Serum von RA-Patienten und Kontrollgruppe unterstützt alle drei wichtigen Teilschritte der Wundheilung, wie Proliferation, Migration und Differenzierung, gleich gut. Eine Systemerkrankung wie die RA mit systemischer Immunsuppression wirkt sich nicht negativ auf die epitheliotrophe Potenz des Serums aus. Thrombozyten-Releasate wirkt nur positiv auf die Zellproliferation. Hierin ist es der Serum-Anwendung sogar deutlich überlegen. In kürzerer Zeit kommt es zu signifikant mehr Wachstum. Die Effekte des Thrombozyten-Releasate auf andere Zellprozesse, wie Differenzierung und Migration, sind dagegen als weniger positiv zu bewerten. Bei der Differenzierung entsteht unter dem Einfluss dieser hochkonzentrierten thrombozytären Wachstumsfaktoren und Zytokine ein im Vergleich zu Serum eher unruhiges Zellbild, während die Migration der Epithelzellen durch Thrombozyten-Releasate-Einfluss gehemmt wird.

Schlussfolgerung: Es ist möglich, Augenoberflächendefekte von RA-Patienten, bei denen eine herkömmliche Therapie nur unzureichend wirkt, mit autologem Serum zu behandeln. Da Serum aber nicht auf alle Zellprozesse gleich stimulierend wirkt, ist es wichtig, vor der Anwendung am Auge herauszufinden, welcher Teilschritt der Wundheilung vor allem gestört ist, denn die Proliferation wird besser unterstützt durch verdünntes Serum, während die Migration besonders von unverdünntem Serum profitiert.

Thrombozyten-Präparationen könnten als weitere Therapiesäule eine Unterstützung in der Behandlung von Augenoberflächenerkrankungen sein, insbesondere in Fällen, in denen eine vermehrte Zellproliferation in den Vordergrund gerückt werden soll.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aharonov A, Pruss RM, Herschman HR: **Epidermal Growth Factor**. The Journal of Biological Chemistry 253: 3970-3977 (1978)
2. Alarcon GS, Schrohenloher RE, Bartolucci AA, Ward JR, Williams HJ, Koopman WJ: **Suppression of rheumatoid factor production by methotrexate in patients with rheumatoid arthritis**. Arthritis Rheum; 33: 1156-1161 (1990)
3. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ: **Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids**. Journal of Leukocyte Biology; 60: 563-572; (1996)
4. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: **Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration**. Thromb Haemost; 91: 4-15 (2004)
5. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT: **Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture**. Journal of Orthopaedic Research; 23: 281-286 (2005)
6. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H: **An SV40-Immortalized Human Corneal Epithelial Cell Line and Its Characterization**. Invest Ophthalmol Vis Sci; 36: 614-621 (1995)
7. Badolato R, Oppenheim JJ: **Role of Cytokines, Acute-Phase Proteins, and Chemokines in the Progression of Rheumatoid Arthritis**. Seminars in Arthritis and Rheumatism; 26: 526-538 (1996)
8. Barnard Z, Apel AJG, Harkin DG: **Phenotypic analyses of limbal epithelial cell cultures derived from donor corneoscleral rims**. Clinical and Experimental Ophthalmology; 29: 138-142 (2001)
9. Barton K, Nava A, Monroy DC, Pflugfelder SC: **Cytokines and tear function in ocular surface disease**. Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes; 2: 461-469 (1998)

10. Beer HD, Fässler R, Werner S: **Glucocorticoid-Regulated Gene Expression during Cutaneous Wound Repair.** Vitamines and Hormones; 59: 217-239 (2000)
11. Bennett NT, Schultz GS: **Growth Factors and Wound Healing: Biochemical Properties of Growth Factors and Their Receptors.** The American Journal of Surgery; 165: 728-737 (1993 a)
12. Bennett NT, Schultz GS: **Growth Factors and Wound Healing: Part II. Role in Normal and Chronic Wound Healing.** The American Journal of Surgery; 166: 74-81 (1993 b)
13. Borzini P, Mazzucco L: **Platelet gels and releasates.** Curr Opin Hematol; 12: 473-479 (2005)
14. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM: **Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth.** The Journal of Cell Biology; 119: 629-641 (1992)
15. Chan RK, Liu P, Lew DH, Ibrahim SI, Srey R, Valeri CR, Hechtman HB, Orgill DP: **Expired Liquid Preserved Platelet Releasates Retain Proliferative Activity.** Journal of Surgical Research; 126: 55-58 (2005)
16. Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J: **The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity.** Journal of Immunological Methods; 160: 81-88 (1993)
17. Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A: **Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds.** Transfusion and Apheresis Science; 30: 145-151 (2004)
18. Daniele S, Frati L, Fiore C, Santoni G: **The Effect of the Epidermal Growth Factor (EGF) on the Corneal Epithelium in Humans.** Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol; 210: 159-165 (1979)
19. Diegelmann RF, Evans MC: **Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing.** Frontiers in Bioscience; 9: 283-289 (2004)

20. Eberle J, Habermann J, Gürtler LG: **HIV-1 infection transmitted by serum drop-lets into the eye: a case report.** AIDS; 14: 206... (2000)
21. Ferrara N, Davis-Smyth T: **The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor.** Endocrine Reviews; 18: 4-25 (1997)
22. Ferreira de Souza R, Kruse FE, Seitz B: **Autologes Serum bei sonst therapiere-sistenten Hornhautepitheldefekten – Prospektive Studie an den ersten 70 Augen.** Klin Monatsbl Augenheilkd; 218: 720-726 (2001)
23. Flour M, Degreef H: **Pharmacological Treatment of Wounds.** Seminars in Cuta-neous Medicine and Surgery; 17: 260-265 (1998)
24. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE: **Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunc-tivitis sicca.** Arthritis and Rheumatism; 27: 459-461 (1984)
25. Frantz A, Becker J: **Etablierung humaner, konjunktivaler Fibroblastenkulturen als Testsystem zur Beurteilung von Ophthalmika.** Klin Monatsbl Augenheilkd; 208: 181-187 (1996)
26. Frati L, Daniele S, Delogu A, Covelli I: **Selective Binding of the Epidermal Growth Factor and its Specific Effects on the Epithelial Cells of the Cornea.** Exp Eye Res; 14: 135-141 (1972)
27. Geerling G, Daniels JT, Dart JKG, Cree IA, Khaw PT: **Toxicity of Natural Tear Substitutes in a Fully Defined Culture Model of Human Corneal Epithelial Cells.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 42: 948-956 (2001)
28. Geerling G, Liu SC, Collin JRO, Dart JKG: **Costs and gains of complex proce-dures to rehabilitate end stage ocular surface disease.** Br J Ophthalmol; 86: 1220-1221 (2002)
29. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D: **Autologous serum eye drops for ocular surface disorders.** Br J Ophthalmol; 88: 1467-1474 (2004)

30. Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G: **Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects?** Transfusion; 44: 1724-1731 (2004)
31. Hartwig D, Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L, Geerling G: **Topical treatment of ocular surface defects: comparison of the epitheliotropic capacity of fresh frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model.** Transfusion Medicine; 15: 107-113 (2005)
32. Herminghaus P, Geerling G, Hartwig D, Wedel T, Dibbelt L: **Epitheliotrophe Kapazität von Serum- und Plasmaaugentropfen.** Ophthalmologe; 101: 998-1005 (2004)
33. Hüsler J, Zimmermann H: **Statistische Prinzipien für medizinische Projekte.** 3. Aufl., 104-118, Verlag Hans Huber, Bern (2000)
34. Li Q, Weng J: **Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal glands, tears, and cornea.** Invest Ophthalmol Vis Sci; 37: 727-739 (1996)
35. Kanerud L, Engström GN, Tarkowski A: **Evidence for differential effects of sulfasalazine on systemic and mucosal immunity in rheumatoid arthritis.** Ann Rheumatic Dis; 54: 256-262 (1995)
36. Kaszli FA, Krieglstein GK: **Tear film deficiencies pharmacology of eye drops and toxicity.** Current Opinion in Ophthalmology; 7: 12-16 (1996)
37. Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, Manabe R: **The Mechanism of Accelerated Corneal Epithelial Healing by Human Epidermal Growth Factor.** Inv Ophthalmol Vis Sci; 31: 1773-1778 (1990)
38. Knorr M, Schüller S, Steuhl KP, Thiel HJ: **EGF in der Therapie von Hornhauterkrankungen.** Ophthalmologe; 89: 119-127 (1992)

39. Knorr M, Denk PO: Folgen okulärer Verletzungen. In Rohrbach JM, Steuhl KP, Knorr M, Kirchhof B: **Ophthalmologische Traumatologie**. 1. Aufl., 289-451, Schattauer, Stuttgart (2002)
40. Kobayashi T, Hamano K, Li TS, Nishida M, Ikenaga S, Hirata K, Zempo N, Esato K: **Angiogenesis Induced by the Injection of Peripheral Leukocytes and Platelets**. Journal of Surgical Research; 103: 279-286 (2002)
41. Kreienbrock L, Schach S: **Epidemiologische Methoden**. 1. Aufl., 182-184, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1995)
42. Kruse FE, Tseng SCG: **Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 und 2 hemmen die Proliferation von Limbus und Hornhautepithel**. Ophthalmologe; 91: 617-623 (1994)
43. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM: **The effect of platelet releasate on wound healing in animal models**. Journal of the American Academy of Dermatology; 22: 781-791 (1990)
44. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G: **An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops**. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol; 243: 706-714 (2005)
45. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN: **Growth Factors in Wound Healing**. J Clin Invest; 84: 640-646 (1989)
46. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K: **Autologous Serum Application in the Treatment of Neurotrophic Keratopathy**. Ophthalmology; 111: 1115-1120 (2004)
47. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, Libener R, Cattana E, Levis A, Betta PG, Borzini P: **The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study**. Transfusion; 44: 1013-1018 (2004)
48. McDonnell PJ, Schanzlin DJ, Rao NA: **Immunoglobulin Deposition in the Cornea After Application of Autologous Serum**. Arch Ophthalmol; 106: 1423-1425 (1988)

49. Meyer-Ingold W: **Wound therapy: growth factors as agents to promote healing.** TIBTECH; 11: 387-392 (1993)
50. Morgan GJ, Chow WS: **Clinical features, diagnosis, and prognosis in rheumatoid arthritis.** Current Opinion in Rheumatology; 5: 184-190 (1993)
51. Moulin V, Lawny F, Barritault D, Caruelle JP: **Platelet releasate treatment improves skin healing in diabetic rats through endogenous growth factor secretion.** Cell mol Biol; 44: 961-971 (1998)
52. Mukerji N, Sinha R, Vajpayee RB: **Role of autologous serum in persistent epithelial defects.** Br J Ophthalmol; 86: 832 (2002)
53. Nelson JD: **Much more than water.** Br J Ophthalmol; 44: 384-385 (1983)
54. Neurath MF, Hildner K, Becker C, Schlaak JF, Barbulescu K, Germann T, Schmitt E, Schirmacher P, Haralambous S, Pasparakis M, Meyer zum Büschenfelde KH, Kollias G, Märker-Hermann E: **Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexat-mediated immunosuppression.** Clin Exp Immunol; 115: 42-55 (1999)
55. Nishida T, Tanaka T: **Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing.** Current Opinion in Ophthalmology, 7: 2-11 (1996)
56. Pancholi S, Tullo A, Khaliq A, Foreman D, Boulton M: **The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes.** Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol; 236: 1-8 (1998)
57. Pastor JC, Calonge M: **Epidermal Growth factor and Corneal wound healing: A Multicenter Study.** Cornea; 11: 311-314 (1992)
58. Poon AC, Geerling G, Dart JKG, Fraenkel GE, Daniels JT: **Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies.** Br J Ophthalmol; 85: 1188-1197 (2001)

59. Prevoo MLL, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PLCM: **Modified Disease activity scores that include twenty-eight-joint counts.** Arthritis & Rheumatism; 38: 44-48 (1995)
60. Rieck PW, Sherif ZAR, Hartmann C, Pleyer U: **Wundheilung der Hornhaut: Teil I: Biologische Grundlagen und ihre klinische Relevanz.** Ophthalmologie; 100: 749-770 (2003a)
61. Rieck PW, Pleyer U: **Wundheilung der Hornhaut: Teil II: Therapie von Wundheilungsstörungen.** Ophthalmologie; 100: 1109-1130 (2003b)
62. Sabatini F, Silvestri M, Sale R, Serpero L, Guiliiani M, Scarso L, Favini P, Rossi GA: **Concentration-dependent effects of mometasone furoate and dexamethasone on foetal lung fibroblast functions involved in airway inflammation and remodeling.** Pulmonary Pharmacology & Therapeutics; 16: 287-297 (2003)
63. Sany J, Anaya JM, Canovas F, Combe B, Jorgensen C, Saker S, Thaury MN, Gavroy JP: **Influence of Methotrexate on the Frequency of Postoperative Infectious Complications in Patients with Rheumatoid Arthritis.** J Rheumatol 20: 1129-1132 (1993)
64. Sato M, Schneeweiss S, Scranton R, Katz JN, Weinblatt ME, Avorn J, Ting G, Shadick NA, Solomon DH: **The validity of a rheumatoid arthritis medical records-based index of severity compared with the DAS28.** Arthritis Research & Therapy; 8: R57 (2006)
65. Schultz G, Cipolla L, Whitehouse A, Eiferman R, Woost P, Jumblatt M: **Growth Factors and Corneal Endothelial Cell: III. Stimulation of Adult Human Corneal Endothelial Cell Mitosis in Vitro by Defined Mitogenic Agents.** Cornea; 11: 20-27 (1992)
66. Schultz G, Khaw PT, Oxford K, Macauley S, van Setten G, Chegini N: **Growth factors and ocular wound healing.** Eye; 8: 184-187 (1994)

67. Singh G, Foster CS: **Epidermal Growth Factor in Alkali-Burned Corneal Epithelial Wound Healing**. American Journal of Ophthalmology; 103: 802-807 (1987)
68. Su CY, Chiang CC, Lai WF, Lin KW, Burnouf T: **Platelet-derived growth factor-AB and transforming growth factor- β 1 in platelet gels activated by single-donor thrombin**. Transfusion; 44: 945 (2004)
69. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, Shimmura S: **Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögrens's syndrome**. Br J Ophthalmol; 83: 390-395 (1999)
70. Velhagen KH, Druegg A, Rieck P: **Proliferation und Wundheilung von RPE-Zellen in vitro - Einfluss von humanem Thrombozytenkonzentrat, Serum und PDGF**. Ophthalmologie; 96: 77-81 (1999)
71. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y: **Efficacy and Safety of a Topical Gel Formulation of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB (Becaplermin) in Patients With Chronic Neuropathic Diabetic Ulcers**. Diabetes Care; 21: 822-827 (1998)
72. www.reiter1.com, Statistik (Tag des Zugriffs: 18.03.2011)
73. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubiez M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R: **Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application**. Transfusion; 41: 1217-1224 (2001)

7. ANHANG

Anlage 1: Versuchsplanung und statistische Methodik der Versuchsauswertung

Versuchsplanung:

Um Zufallsfehler und Verzerrungen bei der Analyse von Fall-Kontroll-Studien kleiner Stichprobenumfänge schon in der Phase der Versuchsplanung zu verringern, wird die sogenannte Paarbildung, auch Matching genannt, angewandt. Hierbei werden potentielle Confounder (Störvariable), die nicht Gegenstand des Untersuchungsinteresses sind, ausgeschaltet. Beim Matching wird die Verteilung der Störvariablen so angelegt, dass sie in den zu vergleichenden Gruppen identisch ist. Potentielle Confounder sind etwa das Geschlecht und das Alter. Matching stellt ein künstliches Angleichen der Verteilungen von Störvariablen dar. Ein Unterschied, der auf den Confounder zurückgeht, nach dem gematcht wurde, ist daher im Rahmen der Studie nicht mehr zu entdecken (41).

Beim individuellen Matching wird einer Fallperson eine konkrete Kontrollperson zugeordnet, die in ihren Confoundern möglichst identisch sind. Man betrachtet hierbei gematchte Paare, auch Zwillinge genannt. Im vorliegenden Fall dieser Paarbildung sollten die Fallperson und die Kontrollperson das gleiche Geschlecht und das gleiche Alter aufweisen, da nach Geschlecht und Alter gematcht wird, d. h., durch das Matching wird ein möglicher Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Versuchsergebnisse soweit wie möglich ausgeschaltet.

Bei kategoriellen Matching-Variablen, wie dem Geschlecht, ist eine eindeutige Zuordnung zwingend. Bei quantitativen Variablen, wie beispielsweise dem Alter, kann man auf Grund der Probleme beim Auffinden geeigneter Kontrollpersonen entsprechende Schichtungen mit vorgegebenen geringen Schwankungsbreiten wählen.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde überwiegend das individuelle Matching mit diskordanter Paarbildung gewählt. Bei der diskordanten Paarbildung ist eine Person exponiert (Patient) und der Zwilling nichtexponiert (Vergleichsproband).

Für das Matching wurde zu jedem der zehn RA-Patienten ein nichtexponierter, d. h. gesunder Kontrollproband gleichen Geschlechts und ungefähr gleichen Alters (Abweichung max. ± 5 Jahre), zugeordnet (Tab. 2). Damit besteht ein großes, bestimmendes Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Gruppen: die rheumatoide Arthritis als inflammatorische Systemerkrankung mit medikamentöser Immunsuppression durch Kortison und MTX vs. gesund, keine Medikation.

Die zehn RA-Patienten, die zur Teilnahme an der vorliegenden Studie ihre Bereitschaft erklärten, waren überwiegend weiblich und zeigten eine Häufung in den mittleren Alters-

gruppen (Tab. 11). Ausgehend von dieser Struktur wurden die zehn Gesunden der Kontrollgruppe gesucht.

Tabelle 11: Übersicht über die Patienten nach Altersgruppen und Geschlecht

		Altersgruppen (in Jahren)					
		21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80
Patient.-Nr.	weibl.	7	2 und 3	9	6 und 10		1
	männlich			5	8	4	

Versuchsauswertung:

Bei der statistischen Auswertung der Versuchsreihen wurde beratende Unterstützung durch Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Harloff, Fachnaturwissenschaftler der Medizin für Biomathematik und medizinische Informatik, gewährt.

Ein mögliches statistisches Testverfahren für den Einstichprobenfall und/oder für gepaarte Daten bei kleineren Stichprobenumfängen ($n \geq 10$ bis 20) ist der *gepaarte t-Test (Student-t-Test)*. Er ist zwar für kleine Stichprobenumfänge anwendbar, setzt jedoch *Normalverteilung* der Daten voraus. Zur Verifikation der Normalitätsannahme kann der *Shapiro-Francia-Test* (33) verwendet werden. Einfacher ist es jedoch, *nichtparametrische Bedingungen* (das Vorhandensein der Normalverteilung der Daten wird hierbei nicht vorausgesetzt) anzunehmen, was erfahrungsgemäß bei Kleinststichprobenumfängen zwischen fünf und zehn in der Regel gegeben ist.

Für den Einstichprobenfall und/oder für gepaarte Daten bei kleineren Stichprobenumfängen ($n \geq 5$ bis 20) unter nichtparametrischen Bedingungen ist der *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest* (Wilcoxon signed rank test, paired) angezeigt (33). Als *Nullhypothese* wird formuliert, dass sich die Verteilungen der beobachteten Ergebnisse der Patienten und der nichtexponierten Probanden nicht unterscheiden.

Für die Auswertung der Messreihen zur Ermittlung möglicher Signifikanzen wurde auf das von Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Harloff auf Excel-Basis entwickelte Statistikprogramm zurückgegriffen, das den Ablauf des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentests als Routine ermöglicht.

Die p-Schwellenwerte der Gültigkeit der Alternativhypothese wurden Tabellenwerten entnommen (72).

Problem Thrombozytenspender:

Zwar war es möglich, zu jedem Patienten einen passenden nichtexponierten Zwilling aus der Kontrollgruppe zu finden, ein Matching zu den Thrombozytenspendern war jedoch

nicht möglich. Als Spenderpool konnte hier nur auf das Reservoir der Blutspender an der Universität zu Lübeck zurückgegriffen werden. Blutspender, von denen die Thrombozyten extrahiert werden, sind jedoch überwiegend männlich und generell nur bis 65 Jahre alt. Aus dem Reservoir der Blutspender wurde eine Stichprobe mit gleichem Umfang wie bei den Patienten gezogen.

Damit entsteht die Situation zweier unabhängiger Stichproben, bei denen allerdings die Wirkung der Confounder Alter und Geschlecht nicht ausgeschlossen werden kann.

Für den Fall des Vergleichs zweier Stichproben im ungepaarten Fall bei kleinen Stichprobenumfängen (3 bis 20) unter nichtparametrischen Bedingungen kann auf den *Wilcoxon-Rangsummentest* (Wilcoxon rank sum test, unpaired) zurückgegriffen werden (33). Der Wilcoxon-Rangsummentest entspricht hierbei dem Mann-Whitney-U-Test.

Auch hier wird als *Nullhypothese* formuliert, dass sich die Verteilungen der beobachteten Ergebnisse der Patienten und der nichtexponierten Probanden nicht unterscheiden. Allerdings sind die Folgerungen sehr vorsichtig zu formulieren, da die Vergleichspopulation der nichtexponierten Probanden nicht genau gegeben und auch die Stichprobe nicht unbedingt zufällig ist, zumal die Wirkung möglicher Confounder gegeben sein kann. Zur Bestimmung des Annahmebereiches und des Verwerfungsbereiches der Nullhypothese dürfen die Stichprobenumfänge nicht kleiner als drei sein, um einseitige Alternativhypothesen prüfen zu können (bei zweiseitiger Alternativhypothesenprüfung n_1 bzw. n_2 mindestens vier).

Die p-Schwellenwerte der Gültigkeit der Alternativhypothese wurden durch Approximation auf Basis des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (72).

Anlage 2: Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen

Tabelle 12: Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen - Patienten

Proben-Nr.	BSG mm/h	CRP mg/l	Leukozyten /nl	Erythr./pl /pl	Hb g/dl	Hkt Hkt	MCV fl	MCH pg	MCHC g/l	Thromb. /nl	Q %	INR	PTT sec	Na mmol/l	K mmol/l	Ca mmol/l
1	50	6	10,66	3,89	9,7	0,31	81	24,9	307	411	89	1,0	33,8	141	4,61	2,27
2	30	11	11,32	4,04	12,3	0,39	98	30,4	311	404	88	1,1	32,8	142	4,35	2,38
3	84	92	6,41	4,00	10,3	0,32	81	25,8	319	450	83	1,1	36,4	141	4,07	2,40
4	68	40	10,47	3,38	10,9	0,34	90	28,5	316	482	90	1,0	29,1	137	4,64	2,17
5	34	15	9,67	4,67	14,5	0,43	92	31,0	337	376	91	1,0	30,4	140	4,39	2,41
6	20	5	10,47	4,53	14,2	0,43	96	31,3	326	300	90	1,0	32,6	141	4,59	2,36
7	60	58	7,48	4,38	14,0	0,41	95	32,0	336	332	101	0,9	31	139	3,82	2,30
8	18	0,5	8,53	5,26	15,6	0,45	87	29,7	341	344	98	1,0	34,2	139	4,21	2,15
9	4	0,5	11,26	4,22	13,3	0,38	90	31,5	349	249	106	0,9	28,5	143	4,00	2,51
10	6	0,5	8,73	4,55	15,1	0,45	99	33,2	335	222	106	0,9	30,6	144	3,66	2,45
Mittelwert	37,40	22,85	9,50	4,29	12,99	0,39	90,90	29,83	327,70	357,00	94,20	0,99	31,94	140,70	4,23	2,34
Min	4,00	0,50	6,41	3,38	9,70	0,31	81,00	24,90	307,00	222,00	83,00	0,90	28,50	137,00	3,66	2,15
Max	84,00	92,00	11,32	5,26	15,60	0,45	99,00	33,20	349,00	482,00	106,00	1,10	36,40	144,00	4,64	2,51
SD	27,13	30,94	1,66	0,51	2,08	0,05	6,44	2,69	13,99	84,12	8,00	0,07	2,46	2,06	0,34	0,12
Konfidenz (95 %)	17,16	19,57	1,05	0,32	1,32	0,03	4,07	1,70	8,85	53,20	5,06	0,05	1,56	1,30	0,22	0,07

Tabelle 13: Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen - Kontrollgruppe

Proben-Nr.	BSG mm/h	CRP mg/l	Leukozyten /nl	Erythr./pl /pl	Hb g/dl	Hkt Hkt	MCV fl	MCH pg	MCHC g/l	Thromb. /nl	Q %	INR	PTT sec	Na mmol/l	K mmol/l	Ca mmol/l
1	2	1	5,04	5,30	14,3	0,39	74	27,1	366	156	111	0,9	21	139	4,26	2,36
2	9	2	4,98	4,15	11,0	0,31	75	26,5	354	245	102	1,0	23	140	5,82	2,27
3	2	1	3,50	4,07	12,5	0,35	86	30,7	355	267	102	1,0	26	139	4,00	2,43
4	53	7	8,90	3,83	11,7	0,33	86	30,5	354	306	96	1,1	26	137	3,82	2,32
5	20	0	6,80	4,16	13,3	0,37	91	32,0	351	217	94	2,0	25	139	3,53	2,51
6	7	0	6,30	4,47	14,2	0,39	88	31,8	360	64	92	1,1	21	137	3,88	2,53
7	10	0	7,70	8,52	17,6	0,49	84	30,3	360	92	106	1,0	23	140	4,18	2,48
8	12	17	8,40	4,16	13,1	0,38	91	31,3	343	408	108	0,9	20	139	4,62	2,29
9	19	4	8,90	5,10	15,1	0,42	83	29,6	357	208	102	1,0	26	141	4,94	2,40
10	20	9	7,60	4,40	13,5	0,37	86	30,6	356	205	95	1,1	25	142	3,42	2,27
Mittelwert	15,40	4,10	6,81	4,82	13,63	0,38	84,48	30,04	355,60	216,80	100,80	1,11	23,60	139,30	4,25	2,39
Min	2,00	0,00	3,50	3,83	11,00	0,31	73,90	26,50	343,00	64,00	92,00	0,92	20,00	137,00	3,42	2,27
Max	53,00	17,00	8,90	8,52	17,60	0,49	91,30	32,00	366,00	408,00	111,00	1,99	26,00	142,00	5,82	2,53
SD	14,83	5,51	1,84	1,38	1,86	0,05	5,94	1,85	6,10	100,37	6,39	0,32	2,32	1,57	0,72	0,10
Konfidenz (95 %)	9,38	3,48	1,16	0,87	1,17	0,03	3,76	1,17	3,86	63,48	4,04	0,20	1,47	0,99	0,46	0,06

Tabelle 14: Ergebnisse der orientierenden klinischen Laboruntersuchungen - Thrombozytenspender

Proben-Nr.	BSG mm/h	CRP mg/l	Leukozyten /nl	Erythr./pl /pl	Hb g/dl	Hkt Hkt	MCV fl	MCH pg	MCHC g/l	Thromb. /nl	Q %	INR	PTT sec	Na mmol/l	K mmol/l	Ca mmol/l
1	3	1	9,61	4,64	14,3	0,41	88	30,7	349	247	92	1,1	30	141	4,25	2,28
2	2	0	7,34	4,78	13,8	0,42	89	28,9	326	289	97	1,1	28	142	3,79	2,30
3	0	0	5,61	5,10	13,7	0,40	79	26,8	341	268	82	1,2	29	139	4,30	2,24
4	5	0	5,78	4,71	13,6	0,39	84	29,0	346	349	98	1,1	29	143	3,88	2,39
5	14	0	9,70	4,74	13,8	0,41	86	29,2	338	326	111	0,9	28	140	3,72	2,41
6	5	0	4,99	5,01	15,4	0,45	89	30,7	345	263	99	1,0	29	139	3,78	2,37
7	5	0	6,70	4,82	14,7	0,43	89	30,6	344	418	103	1,0	26	141	4,04	2,40
8	4	0	6,61	3,99	14,0	0,40	100	35,1	349	300	103	1,0	27	139	4,29	2,33
9	2	6	13,14	5,18	15,1	0,43	83	29,2	351	299	103	1,0	26	141	3,74	2,32
10	3	2	9,61	4,90	15,6	0,44	90	31,8	354	345	109	0,9	26	139	4,36	2,47
Mittelwert	4,30	0,90	7,91	4,79	14,40	0,42	87,63	30,20	344,30	310,40	99,70	1,03	27,80	140,40	4,02	2,35
Min	0,00	0,00	4,99	3,99	13,60	0,39	78,60	26,80	326,00	247,00	82,00	0,91	26,00	139,00	3,72	2,24
Max	14,00	6,00	13,14	5,18	15,60	0,45	100,30	35,10	354,00	418,00	111,00	1,22	30,00	143,00	4,36	2,47
SD	3,77	1,91	2,54	0,33	0,75	0,02	5,68	2,21	7,97	50,85	8,37	0,09	1,48	1,43	0,26	0,07
Konfidenz (95 %)	2,39	1,21	1,61	0,21	0,47	0,01	3,59	1,40	5,04	32,16	5,29	0,06	0,93	0,90	0,17	0,04

Graphische Darstellungen der Ergebnisse der orientierenden Laboruntersuchungen

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Gruppe mit Angabe des 95%igen Konfidenzintervalls bei RA-Patienten, Kontrollgruppe und Thrombozytenspendern.

□ signifik. Unterschied (p - zweiseitige Fragestellung)

Abbildung 33: Ergebnisse der Erythrozytenzahl-Bestimmung

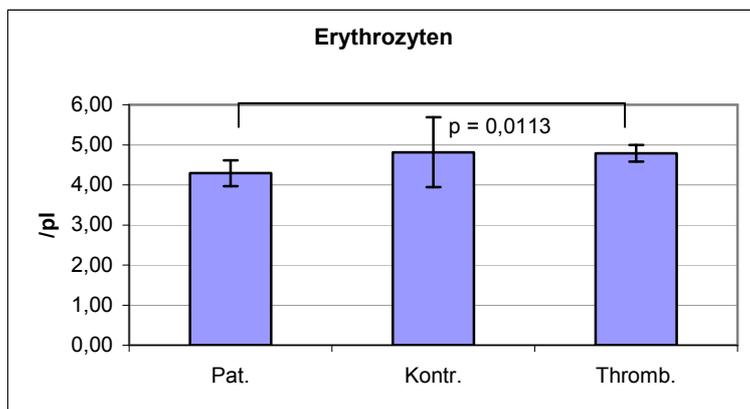


Abbildung 34: Ergebnisse der Hämatokrit-Bestimmung

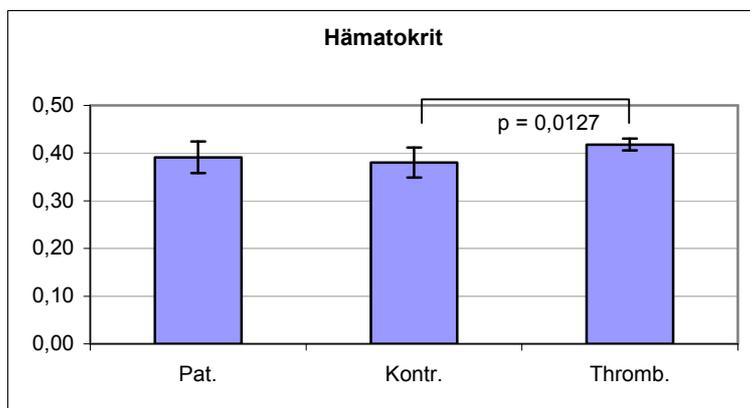


Abbildung 35: Ergebnisse der MCV-Bestimmung

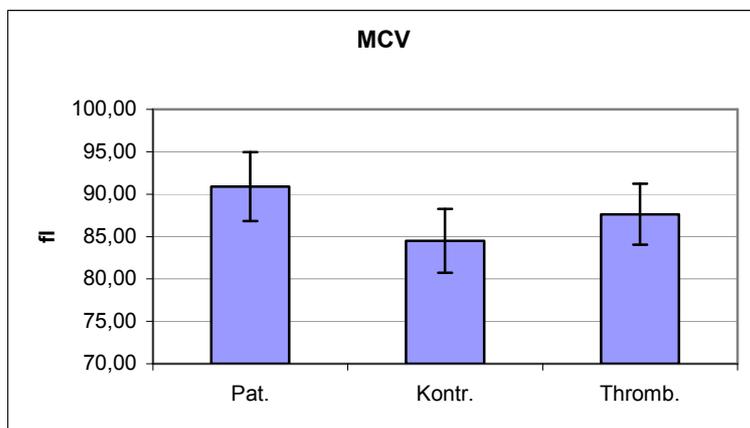


Abbildung 36: Ergebnisse der MCH-Bestimmung

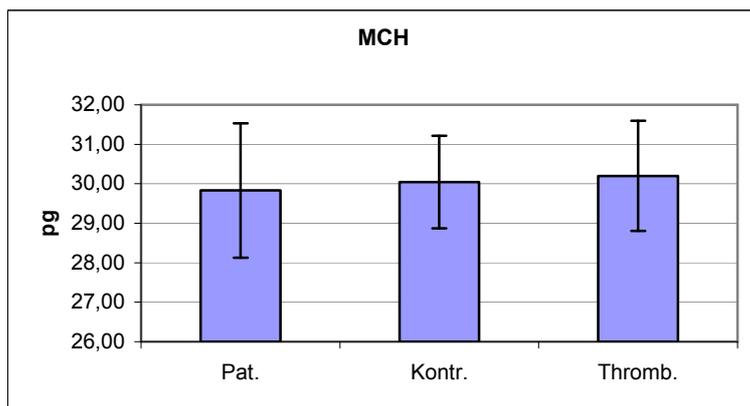


Abbildung 37: Ergebnisse der MCHC-Bestimmung

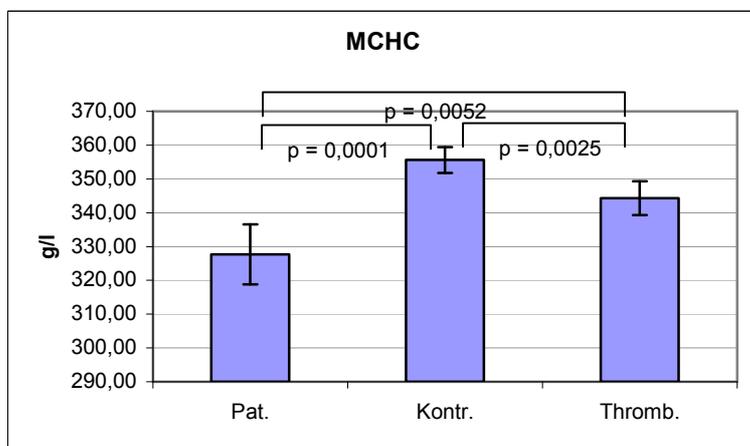


Abbildung 38: Ergebnisse der INR-Bestimmung

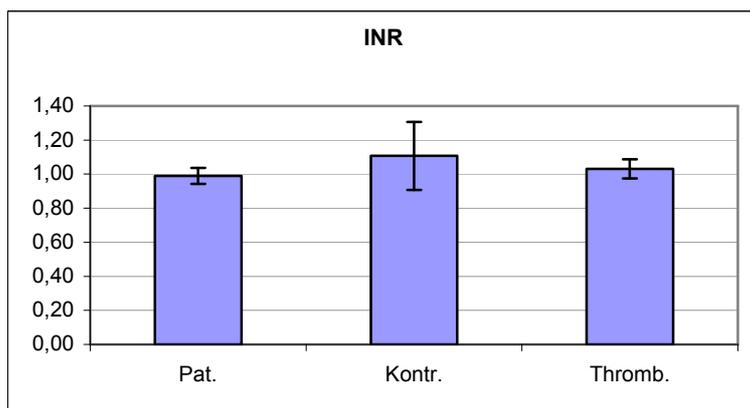


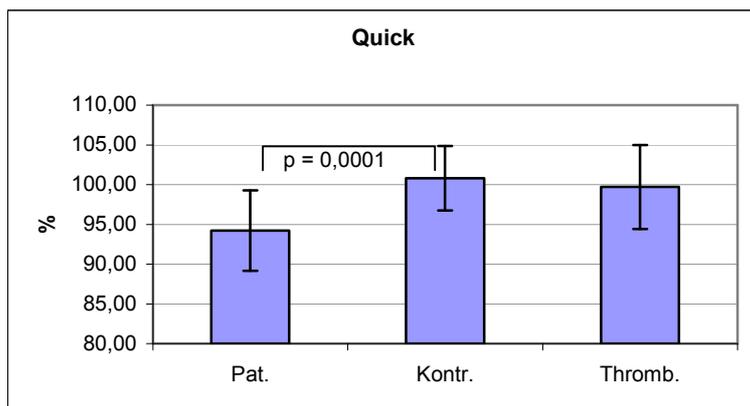
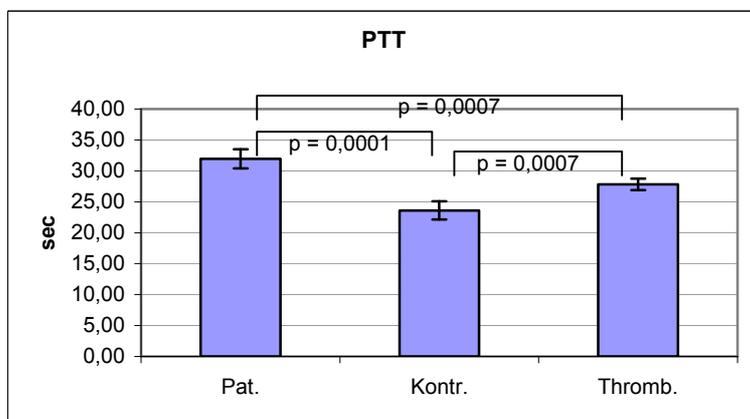
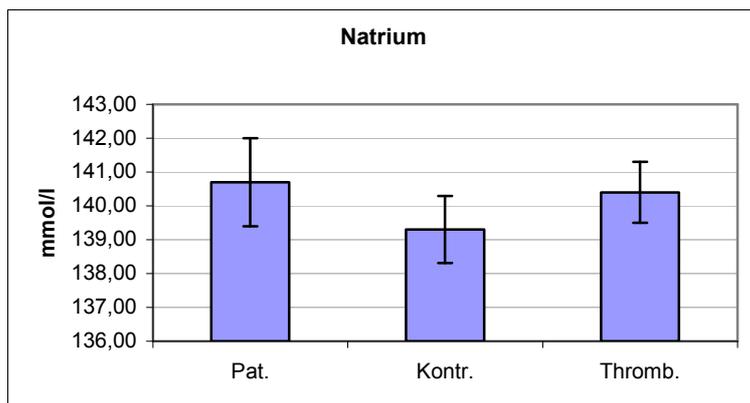
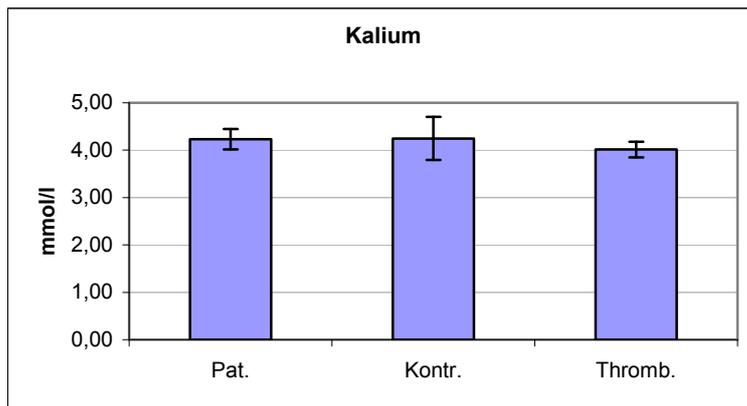
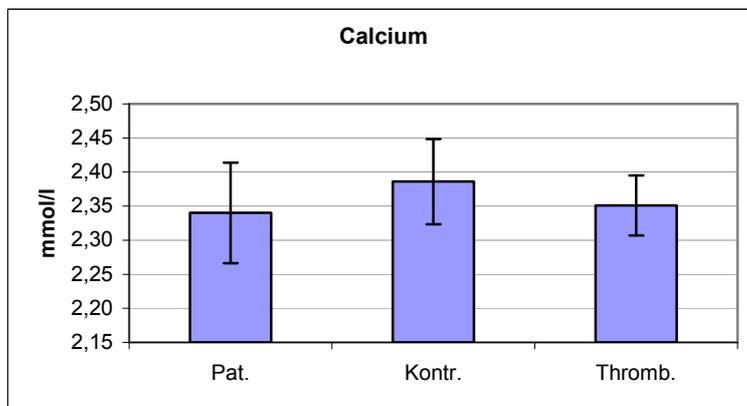
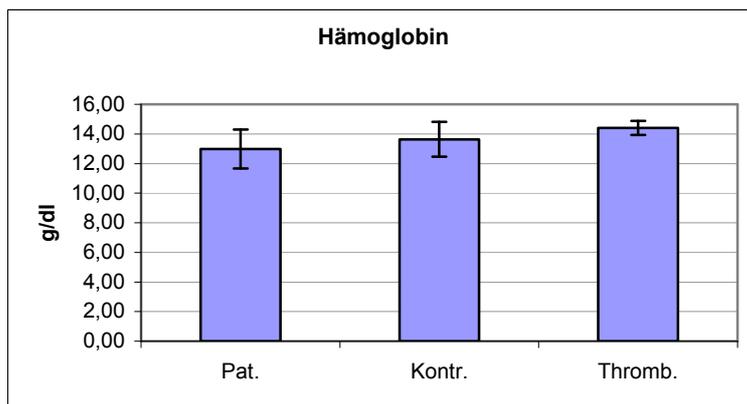
Abbildung 39: Ergebnisse der Quickwert-Bestimmung**Abbildung 40: Ergebnisse der PTT-Bestimmung****Abbildung 41: Ergebnisse der Natrium-Bestimmung**

Abbildung 42: Ergebnisse der Kalium-Bestimmung**Abbildung 43: Ergebnisse der Calcium-Bestimmung****Abbildung 44: Ergebnisse der Hämoglobin-Bestimmung**

Anlage 3: Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren

Tabelle 15: Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren - RA-Patienten*

Proben-Nr.	HGF pg/ml	PDGF-AB pg/ml	Proteingehalt mg/ml	Vitamin A μmol/l	Vitamin E μmol/l	EGF pg/ml	FGF pg/ml	Fibronectin ng/ml	TGF-β1 pg/ml	IL-6 pg/ml
1	3.323,23	18.136,00	348,32	4,92	29,50	731,90	10,73	269.826,50	39.017,23	5,28
2	524,92	18.854,50	346,64	2,14	31,80	819,12	13,88	268.942,21	45.097,48	10,05
3	147,51	3.739,00	288,28	2,95	35,20	76,58	9,17	346.966,20	39.640,37	15,04
4	909,38	14.684,00	243,72	3,65	33,20	1.354,34	33,99	292.903,88	42.623,27	9,82
5	990,27	15.811,50	251,80	5,01	44,60	1.523,30	17,90	302.678,33	38.402,56	
6	861,60	14.876,50	138,28	3,99	86,70	888,60	23,92	308.091,48	49.606,45	2,66
7	695,89	14.898,50	277,88	1,77	24,30	208,48	14,13	303.275,06	45.917,04	1,86
8	1.102,38	12.695,00	366,16	4,11	22,90	723,00	24,74	205.474,55	40.506,56	0,98
9	296,45	20.683,00	479,68	3,07	30,60	1.149,34	10,05	238.966,27	38.962,12	
10	470,36	30.735,00	311,16	4,10	43,30	718,18	6,11	254.345,12	37.915,07	1,15
Mittelwert	932,20	16.511,30	305,19	3,57	38,21	819,28	16,46	279.146,96	41.768,82	5,85
Minimum	147,51	3.739,00	138,28	1,77	22,90	76,58	6,11	205.474,55	37.915,07	0,98
Maximum	3.323,23	30.735,00	479,68	5,01	86,70	1.523,30	33,99	346.966,20	49.606,45	15,04
SD	895,04	6.787,61	90,25	1,08	18,42	453,07	8,69	40.291,48	3.918,64	5,21
Konfidenz 95%	566,07	4.292,86	57,08	0,69	11,65	286,55	5,50	25.482,57	2.478,37	3,68

* Werte unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze erscheinen in der Tabelle als Freifeld.

Tabelle 16: Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren - Kontrollgruppe*

Proben-Nr.	HGF pg/ml	PDGF-AB pg/ml	Proteingehalt mg/ml	Vitamin A µmol/l	Vitamin E µmol/l	EGF pg/ml	FGF pg/ml	Fibronektin ng/ml	TGF-β1 pg/ml	IL-6 pg/ml
1	850,02	14.139,00	436,80	2,75	35,00	435,24	10,27	337.308,14	48.009,73	0,10
2	450,42	12.712,50	498,12	3,64	43,10	473,04	14,49	430.053,80	40.215,48	1,32
3	930,46	19.044,00	639,88	3,30	21,40	635,90	13,93	378.624,48	49.811,34	1,29
4	1.078,99	10.775,00	655,16	3,02	29,20	236,60	5,12	366.878,89	44.512,49	0,50
5	332,12	8.085,00	528,92	2,90	30,50	170,74		509.430,38	45.874,65	2,07
6	457,04	13.167,00	605,72	3,04	27,00	963,26	23,81	384.132,83	45.060,75	
7	810,25	18.357,00	408,16	5,31	51,30	650,96	19,00	512.785,91	50.859,81	
8	1.025,94	27.018,50	486,88	4,89	33,10	1.057,54	22,07	464.694,41	43.531,85	2,44
9	807,12	20.022,50	552,24	2,82	36,60	1.428,86	23,87	503.445,66	45.024,01	
10	659,27	11.158,00	591,28	2,83	28,00	1.405,28	30,40	498.839,53	48.104,41	
Mittelwert	740,16	15.447,85	540,32	3,45	33,52	745,74	18,11	438.619,40	46.100,45	1,29
Minimum	332,12	8.085,00	408,16	2,75	21,40	170,74	5,12	337.308,14	40.215,48	0,10
Maximum	1.078,99	27.018,50	655,16	5,31	51,30	1.428,86	30,40	512.785,91	50.859,81	2,44
SD	256,32	5.627,81	83,71	0,91	8,61	450,66	7,86	67.557,30	3.164,50	0,89
Konfidenz 95%	162,11	3.559,34	52,94	0,58	5,45	285,02	4,97	42.726,99	2.001,40	0,73

* Werte unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze erscheinen in der Tabelle als Freifeld.

Tabelle 17: Konzentration relevanter Wundheilungsmediatoren - Thrombozyten-Releasate-Gruppe*

Proben-Nr.	HGF pg/ml	PDGF-AB pg/ml	Proteingehalt mg/ml	Vitamin A µmol/l	Vitamin E µmol/l	EGF pg/ml	FGF pg/ml	Fibronektin ng/ml	TGF-β1 pg/ml	IL-6 pg/ml
1	25,10	99.180,00	3,35	0,06	0,40	1.759,84	48,06	8.997,90	328.790,41	
2	91,44	85.140,00	2,17	0,15	0,50	1.918,46	11,51	5.402,56	216.836,29	
3	567,72	112.500,00	3,69	0,02	0,40	986,58	25,14	5.765,37	360.385,69	
4	239,53	149.720,00	4,31	0,07	0,30	1.207,26	32,96	7.403,88	436.477,19	
5	130,93	42.990,00	3,11	0,05	0,20	1.487,62	23,33	3.394,15	194.482,21	
6	244,97	72.090,00	2,75	0,03	0,40	1.620,74	61,04	7.071,32	437.000,01	
7	54,35	116.460,00	2,19	0,06	0,80	1.677,56	34,26	4.355,91	256.386,91	
8	38,51	80.490,00	1,05	0,06	0,60	1.143,04	44,94	6.595,95	348.092,36	
9	80,65	85.950,00	6,68	0,05	0,40	1.061,04	72,79	7.467,34	61.191,38	
10	171,89	106.030,00	7,54	0,03	0,40	1.710,28	80,91	7.297,71	458.039,98	
Mittelwert	164,51	95.055,00	3,69	0,06	0,44	1.457,24	43,49	6.375,21	309.768,24	
Minimum	25,10	42.990,00	1,05	0,02	0,20	986,58	11,51	3.394,15	61.191,38	
Maximum	567,72	149.720,00	7,54	0,15	0,80	1.918,46	80,91	8.997,90	458.039,98	
SD	161,82	28.905,47	2,03	0,04	0,16	330,69	22,49	1.659,85	127.011,61	
Konfidenz 95%	102,35	18.281,42	1,28	0,02	0,10	209,15	14,22	1.049,78	80.329,19	

* Werte unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze erscheinen in der Tabelle als Freifeld.

Anlage 4: Dosis-Wirkungs-Experimente

Für die Dosis-Wirkungs-Experimente wurde jede Probe in Triplikaten den Zellen zugesetzt und der ATP-Zuwachs bzw. -Abfall über die Messung der Biolumineszenz errechnet. Der sich aus den Triplikaten ergebende Mittelwert ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 18: Dosis-Wirkungs-Ergebnisse der Patienten-Gruppe

		Zuwachs an ATP in %					
Verdünnung der Testsubstanz		3 %	6 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
Patient							
1		-0,01	0,21	7,95	19,47	17,35	10,39
2		1,45	0,23	1,51	2,29	0,74	2,63
3		0,02	0,14	7,26	3,16	0,71	3,07
4		0,05	0,45	10,02	3,86	1,52	2,91
5		0,05	0,30	6,60	5,87	3,85	4,28
6		-0,11	0,17	12,43	2,54	0,98	3,39
7		-0,04	0,12	12,93	13,74	8,04	2,84
8		0,04	1,27	22,70	19,67	14,42	6,39
9		0,06	0,51	20,94	18,66	11,98	6,05
10		0,01	0,61	20,46	11,90	6,58	6,73
Mittelwert		0,15	0,40	12,28	10,12	6,62	4,87
Min		-0,11	0,12	1,51	2,29	0,71	2,63
Max		1,45	1,27	22,70	19,67	17,35	10,39
SD		0,46	0,35	7,06	7,40	6,16	2,50
Konfid. (95 %)		0,29	0,22	4,46	4,68	3,90	1,58

Tabelle 19: Dosis-Wirkungs-Ergebnisse der Kontroll-Gruppe

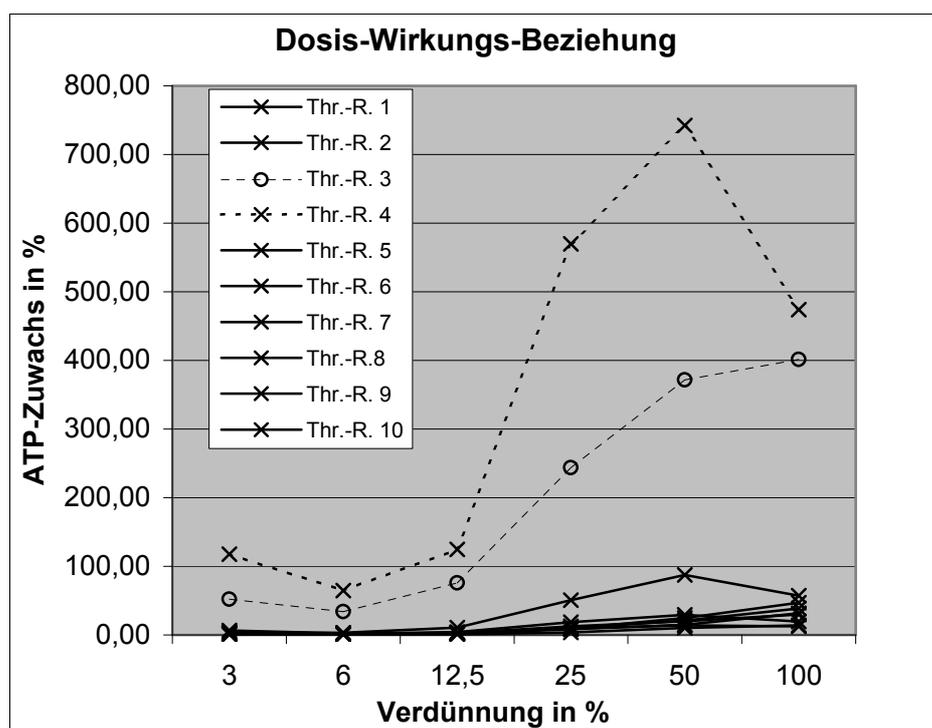
		Zuwachs an ATP in %					
Verdünnung der Testsubstanz		3 %	6 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
Kontrollproband							
1		0,04	0,67	14,77	15,47	10,24	7,71
2		0,51	0,56	13,01	4,77	1,07	1,13
3		0,05	0,50	11,11	4,20	0,79	4,38
4		0,01	0,49	9,60	7,17	1,72	6,47
5		0,03	0,29	10,78	7,88	1,21	7,34
6		-0,09	0,73	10,30	9,81	2,66	3,09
7		0,01	0,98	11,80	2,63	1,58	1,06
8		0,04	1,03	18,19	9,75	4,58	3,40
9		0,16	1,63	31,63	16,36	5,51	5,99
10		0,04	1,14	33,42	18,63	7,81	5,46
Mittelwert		0,08	0,80	16,46	9,67	3,72	4,60
Min		-0,09	0,29	9,60	2,63	0,79	1,06
Max		0,51	1,63	33,42	18,63	10,24	7,71
SD		0,16	0,40	8,84	5,49	3,25	2,40
Konfid. (95 %)		0,10	0,25	5,59	3,47	2,05	1,52

Tabelle 20: Dosis-Wirkungs-Ergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe

Verdünnung der Testsubstanz	Zuwachs an ATP in %					
	3 %	6 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
Thromb.-Rel.						
1	0,55	0,78	2,33	9,50	24,45	47,10
2	3,46	1,38	3,42	9,97	20,96	38,45
5	6,38	2,24	1,95	8,16	14,84	31,49
6	1,92	1,38	2,87	12,42	19,92	29,83
7	4,46	2,01	4,08	18,42	29,19	19,52
8	2,85	3,10	10,58	50,93	87,49	57,07
9	1,93	0,55	1,11	3,89	10,11	14,14
10	2,14	1,01	2,28	9,19	13,92	12,38
Mittelwert	2,96	1,56	3,58	15,31	27,61	31,25
SD	1,81	0,85	2,97	14,97	24,95	15,85
Min	0,55	0,55	1,11	3,89	10,11	12,38
Max	6,38	3,10	10,58	50,93	87,49	57,07
Konfid. (95 %)	1,28	0,60	2,10	10,58	17,64	11,21

Die Proben-Nr. 3 und 4 der Thrombozyten-Releasate wurden aus der statistischen Bearbeitung herausgenommen, da die Ergebnisse derartig aus dem Rahmen herausstachen (mit z. T. 7fach erhöhten Werten gegenüber den anderen Gruppenteilnehmern), dass eine Verzerrung der Ergebnisse wahrscheinlich gewesen wäre. Dargestellt in Abb. 45 sind die Dosis-Wirkungs-Ergebnisse aller zehn Thrombozyten-Releasate. Die Proben 3 und 4 sind gestrichelt dargestellt.

Abbildung 45: Dosis-Wirkungs-Ergebnisse aller zehn Thrombozyten-Releasate



Anlage 5: Zeit-Wirkungs-Experimente

Für die Zeit-Wirkungs-Experimente wurde ebenfalls jede Probe in Triplikaten den Zellen zugesetzt und der ATP-Zuwachs/-Abfall über die Messung der Biolumineszenz errechnet. Der sich aus den Triplikaten ergebende Mittelwert ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 21: Zeit-Wirkungs-Ergebnisse der Patienten-Gruppe

		Zuwachs an ATP in %					
Inkubationszeit		2 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient							
1		19,06	20,60	18,60	24,91	12,48	14,43
2		16,11	18,87	18,31	14,33	17,00	7,34
3		8,13	8,76	4,79	8,51	4,79	3,03
4		10,00	16,51	14,09	13,27	14,96	11,10
5		11,19	16,65	10,88	17,10	11,22	5,78
6		10,25	14,08	9,09	7,93	8,17	5,87
7		15,46	15,50	14,56	17,19	12,79	9,84
8		12,61	10,37	11,03	12,04	13,41	9,75
9		4,69	8,87	6,59	14,79	7,28	5,40
10		4,49	9,47	4,84	9,34	4,45	4,44
Mittelwert		11,20	13,97	11,28	13,94	10,66	7,70
Min		4,49	8,76	4,79	7,93	4,45	3,03
Max		19,06	20,60	18,60	24,91	17,00	14,43
SD		4,77	4,35	5,08	5,08	4,28	3,50
Konfid. 95 %		3,02	2,75	3,21	3,22	2,71	2,22

Tabelle 22: Zeit-Wirkungs-Ergebnisse der Kontroll-Gruppe

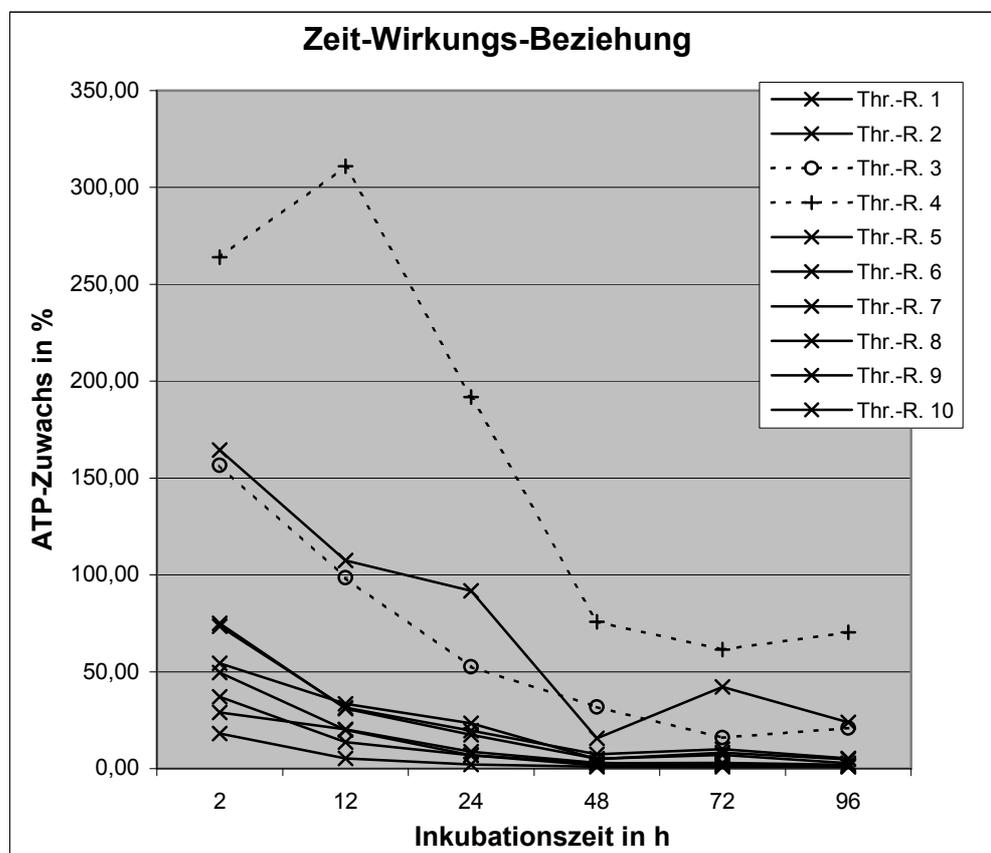
		Zuwachs an ATP in %					
Inkubationszeit		2 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Kontrollproband							
1		14,29	8,98	12,06	14,91	6,27	6,18
2		7,18	7,99	7,91	11,31	10,62	6,28
3		4,51	8,28	3,96	7,23	7,49	2,77
4		8,14	13,12	5,70	5,95	10,95	2,76
5		16,78	19,03	10,45	10,45	6,29	10,36
6		16,84	7,92	7,11	20,78	6,29	6,20
7		8,90	9,83	7,41	16,72	4,90	2,77
8		5,86	8,04	5,39	10,35	5,82	1,34
9		2,48	5,76	7,48	6,60	5,76	2,64
10		3,58	9,88	10,21	11,51	9,10	7,35
Mittelwert		8,86	9,88	7,77	11,58	7,35	4,87
SD		5,33	3,73	2,51	4,72	2,13	2,84
Min		2,48	5,76	3,96	5,95	4,90	1,34
Max		16,84	19,03	12,06	20,78	10,95	10,36
Konfid. (95 %)		3,37	2,36	1,59	2,98	1,35	1,79

Tabelle 23: Zeit-Wirkungs-Ergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe

Thrombozyten-Releasate wurde für diese Versuche mit 0,9 % NaCl verdünnt.

		Zuwachs an ATP in %					
Inkubationszeit	Thromb.-Rel.	2 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
	1	18,08	5,33	2,21	1,07	1,06	1,09
	2	29,04	20,28	8,75	2,95	2,14	1,53
	5	49,55	20,01	6,93	2,79	2,96	1,92
	6	75,03	30,95	17,45	5,06	7,06	2,78
	7	73,49	31,40	19,62	7,38	9,98	5,21
	8	164,48	107,40	91,72	15,63	42,24	23,89
	9	37,02	13,60	6,91	1,68	1,91	1,02
	10	54,37	33,38	23,46	4,96	8,17	4,72
	Mittelwert	62,63	32,79	22,13	5,19	9,44	5,27
	Min	18,08	5,33	2,21	1,07	1,06	1,02
	Max	164,48	107,40	91,72	15,63	42,24	23,89
	SD	45,75	31,66	29,06	4,69	13,66	7,69
	Konfid. (95 %)	32,35	22,38	20,55	3,32	9,66	5,44

Die Proben 3 und 4 der Thrombozyten-Releasate wurden wie bei den Dosis-Wirkungs-Versuchen aus der statistischen Bearbeitung herausgenommen, da eine Verzerrung der Ergebnisse wahrscheinlich gewesen wäre (Abb. 46).

Abbildung 46: Zeit-Wirkungs-Ergebnisse aller zehn Thrombozyten-Releasate

Anlage 6: Ergebnisse der Migrationsversuche

Für die Migrationsexperimente wurde ebenfalls jede Probe in Triplikaten den Zellen zugesetzt und die Migrationstendenz über die Messung der Zunahme/Abnahme der Zellhofgröße errechnet. Der sich aus den Triplikaten ergebende Mittelwert ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 24: Migrationsergebnisse der Patientengruppe bei verdünnter Anwendung (mit 0,9 % NaCl auf 25 % verdünnt)

Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Patient 4	100	110,1	115,42	132,39	121,42	221,43
Patient 7	100	124,53	141,59	152,08	166,12	189,53
Patient 9	100	129,04	152,04	164,66	206,25	238,48
Mean	100,00	126,79	146,82	158,37	186,19	214,01
Min	100	124,53	141,59	152,08	166,12	189,53
Max	100	129,04	152,04	164,66	206,25	238,48
SD	0,00	3,19	7,39	8,90	28,38	34,61
Konfidenz (95 %)	0,00	3,68	8,53	10,27	32,77	39,97

Tabelle 25: Migrationsergebnisse der Patientengruppe bei unverdünnter Anwendung

Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Patient 4	100	129,37	148,69	225,14	295,51	425,45
Patient 7	100	126,62	154,19	172,22	188,54	228,43
Patient 9	100	126,84	175,02	156,15	193,31	288,9
Mittelwert	100,00	126,73	164,61	164,19	190,93	258,67
Min	100	126,62	154,19	156,15	188,54	228,43
Max	100	126,84	175,02	172,22	193,31	288,9
SD	0,00	0,16	14,73	11,36	3,37	42,76
Konfidenz (95 %)	0,00	0,18	17,01	13,12	3,89	49,37

Tabelle 26: Migrationsergebnisse der Kontrollgruppe bei verdünnter Anwendung (mit 0,9 % NaCl auf 25 % verdünnt)

Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Kontrollproband 1	100	126,83	156,11	176,43	210,36	253,27
Kontrollproband 3	100	119,69	143,14	161,06	196,72	234,32
Kontrollproband 6	100	122,71	151,39	169,03	207,28	239,12
Mittelwert	100	123,08	150,21	168,84	204,79	242,24
Min	100	119,69	143,14	161,06	196,72	234,32
Max	100	126,83	156,11	176,43	210,36	253,27
SD	0,00	3,58	6,56	7,69	7,15	9,85
Konfidenz (95 %)	0,00	4,14	7,58	8,88	8,26	11,38

Tabelle 27: Migrationsergebnisse der Kontrollgruppe bei unverdünnter Anwendung

Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Kontrollproband 1	100	133,82	173,52	216,5	257,39	351,9
Kontrollproband 3	100	112,87	137,45	166,57	225,37	210,56
Kontrollproband 6	100	120,66	146,66	229,02	286,9	447,5
Mittelwert	100,00	122,45	152,54	204,03	256,55	336,65
Min	100	112,87	137,45	166,57	225,37	210,56
Max	100	133,82	173,52	229,02	286,9	447,5
SD	0,00	10,59	18,74	33,04	30,77	119,20
Konfidenz (95 %)	0,00	12,23	21,64	38,15	35,53	137,64

Tabelle 28: Migrationsergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe bei verdünnter Anwendung (mit sMM auf 25 % verdünnt)

Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Thromb.-Rel. 5	100	129,81	162,18	192,66	238,19	266,41
Thromb.-Rel. 7	100	125,06	150,34	185,73	217,89	273,75
Thromb.-Rel. 9	100	123,46	143,60	183,89	203,40	262,93
Mittelwert	100	124,26	146,97	184,81	210,65	268,34
Min	100	123,46	143,6	183,89	203,4	262,93
Max	100	125,06	150,34	185,73	217,89	273,75
SD	0,00	1,13	4,77	1,30	10,25	7,65
Konfidenz (95 %)	0,00	1,31	5,50	1,50	11,83	8,83

Tabelle 29: Migrationsergebnisse der Thrombozyten-Releasate-Gruppe bei verdünnter Anwendung (mit sMM auf 65 % verdünnt)

Inkubationszeit	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Thromb.-Rel. 5	100	120,77	147,25	165,95	171,01	208,94
Thromb.-Rel. 7	100	122,67	144,55	163,88	182,04	205,05
Thromb.-Rel. 9	100	120,25	138,37	150,61	172,76	222,93
Mittelwert	100	121,46	141,46	157,25	177,40	213,99
Min	100	120,25	138,37	150,61	172,76	205,05
Max	100	122,67	144,55	163,88	182,04	222,93
SD	0,00	1,71	4,37	9,38	6,56	12,64
Konfidenz (95 %)	0,00	1,98	5,05	10,83	7,58	14,60

Anlage 7: Korrelationsanalyse

Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest (Ein-Stichproben-Fall) bei kleinen Stichproben ($n \geq 5$), ohne Prüfung auf Normalverteilung.

j = ja (signifikante Unterschiede), n = nein (keine signifikanten Unterschiede).

Tabelle 30: Ergebnisse der Korrelationsanalyse

Korrelationen		sign. Untersch.	sign. Untersch.	sign. Untersch.
zwischen	und	Pbn.	Pat.	Thromb.
BSG mm/h	Fibronektin	j	j	j
BSG mm/h	PDGF	j	j	j
BSG mm/h	EGF	j	j	j
BSG mm/h	Vit.E	j	n	j
BSG mm/h	IL-6	j	j	-
BSG mm/h	TGF-b	j	j	j
BSG mm/h	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
BSG mm/h	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
BSG mm/h	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
BSG mm/h	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
BSG mm/h	DWA 12,5 %	n	j	n
BSG mm/h	DWA 100 %	j	j	j
CRP mg/l	Fibronektin	j	j	j
CRP mg/l	PDGF	j	j	j
CRP mg/l	EGF	j	j	j
CRP mg/l	Vit.E	j	n	n
CRP mg/l	IL-6	n	j	-
CRP mg/l	TGF-b	j	j	j
CRP mg/l	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
CRP mg/l	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
CRP mg/l	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
CRP mg/l	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
CRP mg/l	DWA 12,5 %	j	n	j
CRP mg/l	DWA 100 %	n	n	j
Leukozyt./nl	Fibronektin	j	j	j
Leukozyt./nl	PDGF	j	j	j
Leukozyt./nl	EGF	j	j	j
Leukozyt./nl	Vit.E	j	j	j
Leukozyt./nl	IL-6	j	n	-
Leukozyt./nl	TGF-b	j	j	j
Leukozyt./nl	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Leukozyt./nl	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Leukozyt./nl	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Leukozyt./nl	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Leukozyt./nl	DWA 12,5 %	j	n	j
Leukozyt./nl	DWA 100 %	j	j	j
Thrombozyt./nl	Fibronektin	j	j	j
Thrombozyt./nl	PDGF	j	j	j
Thrombozyt./nl	EGF	j	j	j
Thrombozyt./nl	Vit.E	j	j	j
Thrombozyt./nl	IL-6	j	j	-
Thrombozyt./nl	TGF-b	j	j	j
Thrombozyt./nl	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Thrombozyt./nl	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Thrombozyt./nl	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Thrombozyt./nl	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Thrombozyt./nl	DWA 12,5 %	j	j	j
Thrombozyt./nl	DWA 100 %	j	j	j

Korrelationen		sign. Untersch.	sign. Untersch.	sign. Untersch.
zwischen	und	Pbn.	Pat.	Thromb.
Fibronektin	DWA 100 %	j	j	j
Fibronektin	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Fibronektin	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Fibronektin	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Fibronektin	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
TGF-b	DWA 12,5 %	j	j	j
TGF-b	DWA 100 %	j	j	j
TGF-b	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
TGF-b	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
TGF-b	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
TGF-b	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
IL-6	DWA 12,5 %	j	n	-
IL-6	DWA 100 %	n;j	n zweiseitig; einseitig	-
IL-6	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
IL-6	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
IL-6	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
IL-6	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
EGF	DWA 12,5 %	j	j	j
EGF	DWA 100 %	j	j	j
EGF	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
EGF	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
EGF	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
EGF	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Vit. E	DWA 12,5 %	j	j	j
Vit. E	DWA 100 %	j	j	j
Vit. E	Migration 25 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Vit. E	Migration 25 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Vit. E	Migration 100 % bei 72 h	-	- nur 3 Messwerte	-
Vit. E	Migration 100 % bei 144 h	-	- nur 3 Messwerte	-
DWA 12,5 %	Fibronektin	j	j	j
DWA 12,5 %	HGF	j	j	j
DWA 12,5 %	FGF	n	n	j
DWA 12,5 %	Vit. A	j	j	j
DWA 12,5 %	PDGF	j	j	j
DWA 12,5 %	Gesamtprotein	j	j	n
DWA 100 %	HGF	j	j	j
DWA 100 %	FGF	j	j	n
DWA 100 %	Vit. A	n	n	j
DWA 100 %	PDGF	j	j	j
DWA 100 %	Gesamtprotein	j	j	j

8. DANKSAGUNG

Für die Erteilung des Themas und die erwiesene Unterstützung, die ein Anfertigen der vorliegenden Arbeit erst ermöglichte, möchte ich mich recht herzlich bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Gerd Geerling, bedanken.

Mein Dank gilt der Klinik für Augenheilkunde der Universität zu Lübeck, insbesondere dem Institut für experimentelle Ophthalmologie, sowie seinen Mitarbeitern für Anregungen und Hilfestellungen bei der Nutzung der analytischen Verfahren.

Große Unterstützung erhielt ich außerdem von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig durch die Bereitstellung von Thrombozytenkonzentraten und durch seine Hinweise zur Verarbeitung des Probenmaterials.

Darüber hinaus gilt mein Dank dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck für die Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und dem Institut für Klinische Chemie der Universität zu Lübeck für die Quantifizierung der Vitamine.

Besonderen Dank schulde ich den Patienten und Probanden für ihre Bereitschaft zur Blutentnahme, um so überhaupt erst das Ausgangsmaterial für diese Forschungsarbeit gewinnen zu können.

Ich danke meinen Eltern, Frau Dipl.-Ing. oec. Sabine Harloff für Hinweise zur Gestaltung der Arbeit und für Korrekturen und Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Harloff für seine Beratung bei der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse.

Und natürlich danke ich meinem Ehemann, Herrn Dipl.-Verww. (FH) Sebastian Wichmann für Hilfe bei PC-Problemen, Motivation und viel Geduld.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name: Susanne Wichmann-Harloff
 Geburtsdatum/-ort: 14.09.1978 in Grevesmühlen
 Wohnort: 23869 Elmenhorst
 Bargkoppel 32
 Familienstand: verheiratet
 Staatsangehörigkeit: BRD



Schulbildung

1985 - 1987 Grundschole in Schwerin
 1987 - 1997 Sprachgymnasium in Schwerin (Abitur)

Beruflicher Werdegang

Aug. – Dez. 1997 Klinikum Crivitz, Praktikantin
 Jan. 1998 Einstellung als Zeitsoldat in die Bundeswehr für 17 Jahre
 Okt. 1998 - Dez. 2004 Universität zu Lübeck
 Studium der Humanmedizin
 Dez. 2004 Approbation als Ärztin
 Dez. 2004 - Feb. 2007 Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Assistenzärztin in den
 Fächern Chirurgie, Innere und Anästhesie
 März - Dez. 2007 Truppenärztin in Faßberg (Niedersachsen), Allgemeinmedi-
 zinische Assistenzärztin
 seit Jan. 2008 Truppenärztin in Boostedt (Schleswig-Holstein), Allgemein-
 medizinische Assistenzärztin
 2007/2008 Mehrmonatige Auslandsvorbereitung und Auslandseinsatz in
 Bosnien-Herzegowina (EUFOR) als Truppenarzt und Notarzt
 2009/2010 Mehrmonatige Auslandsvorbereitung und Auslandseinsatz in
 Afghanistan (ISAF) als Notarzt

Fort- und Weiterbildungen u. a. in den Gebieten Notfallmedizin, Tropenmedi-
 zin/Reisemedizin, Psychosoziale Unterstützung, Qualitätsmanagement, Sport und Adipo-
 sitas, Flugmedizin.

10. ORIGINALARBEITEN

1. Vorliegende Arbeit in Teilen als Vortrag gehalten auf der 101. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin
2. Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G: **Epitheliotrophic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects?** Transfusion.; 44: 1724-1731 (2004 Dec)
3. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G: **An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops.** Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.; 243: 706-714 (2005 July)
4. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, Geerling G: **Corneal epitheliotrophic capacity of three different blood-derived preparations.** Invest Ophthalmol Vis Sci.; 47: 2438-2444 (2006 June)
5. Harloff S, Hartwig D, Kasper K, Wedel T, Müller M, Geerling G: **Epitheliotrophic capacity of serum eye drops from healthy donors versus serum from immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis.** Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde; 225: 200-206 (2008 Mar)

