

Fakultät für Medizin
Technische Universität München

**In vitro-Untersuchung des Einflusses der Herstellungsparameter auf
parakrine Eigenschaften von Hypoxie präkonditioniertem Plasma (HPP)**

Anja Teresa Hummel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arndt F. Schilling
2. Prof. Dr. Peter Biberthaler

Die Dissertation wurde am 14.10.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Grundlagen	1
1.1.1	Hypoxie	1
1.1.2	HIF-Signalweg	1
1.1.3	Angiogenese	2
1.1.4	Physiologie der Angiogenese	2
1.1.5	Therapeutische Nutzung der Angiogenese	3
1.1.6	VEGF	3
1.1.7	Weitere Wirkungen von VEGF	4
1.1.8	TSP1	5
1.1.9	PF45	
1.1.10	Fibrinbildung	6
1.2	Spezielle Grundlagen	6
1.2.1	Verwendung von PBCs	6
1.2.2	Temperatur	7
1.2.3	Hypoxie in vitro	7
1.2.4	Herstellung von HPP	8
1.2.5	Zusammensetzung HPP	10
1.3	Ziel der Studie	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Verwendete Reagenzien	12
2.2	Verwendetes Material	12
2.3	Verwendete Geräte	13
2.4	Versuchsaufbau	13
2.4.1	HPP-Gewinnung und Inkubationszeit	14
2.4.2	Herstellung der Fibrinmatrix und Retentionszeit	16
2.4.3	Gewinnung von PBS und Releasezeit	17
2.4.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	18
2.4.5	Das Nachweisprinzip eines ELISA	18
2.5	Beschreibung der verschiedenen Ansätze	19
2.5.1	Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration	19

2.5.2	Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrinigel-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe.....	20
2.5.3	Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP	20
2.5.4	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten	22
2.5.5	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Fibrinigel-Gewicht.....	23
2.5.6	Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität	23
2.6	Statistische Methoden	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration	26
3.2	Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrinigel-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe	28
3.3	Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP	29
3.4	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei versch. Retentionszeiten	35
3.5	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf das Fibrinigel-Gewicht	40
3.6	Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität	42
4	Diskussion	46
4.1	Interpretation der Ergebnisse	46
4.1.1	Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration.....	46
4.1.2	Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrinigel-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe.....	47
4.1.3	Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP	48
4.1.4	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten	50
4.1.5	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Fibrinigel-Gewicht.....	52
4.1.6	Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität	52
4.2	Evaluierung der Versuchsbedingungen.....	53
4.3	Anwendung.....	54

4.3.1	Weiterführende Ansätze für Biologie.....	54
4.3.1.1	Hämostase und Angiogenese im Wundheilungsprozess	54
4.3.1.2	Die Fibrinmatrix in der Hämostase	55
4.3.1.3	Hämostase-Modell in vitro	55
4.3.1.4	Fibrinmatrix als Depot für Signaltransduktionsfaktoren	56
4.3.1.5	Zeitliche Abläufe bei der Wundheilung	56
4.3.1.6	Der Einfluss der Fibrinmasse	57
4.3.1.7	Der Einfluss der Matrixdichte.....	58
4.3.1.8	Hypoxie als Stimulator der Angiogenese.....	59
4.3.2	Anwendungen in der Medizin.....	60
4.3.2.1	HPP als injizierbares Biomaterial	61
4.3.2.2	HPP in der epidermalen Anwendung	63
4.3.2.3	HPP als zellfreies Material.....	64
4.3.2.4	HPP als autologe Therapieform	65
4.3.2.5	Vergleich von HPP mit Verfahren beruhend auf Thrombozytenkonzentraten.....	66
4.4	Ausblick	67
5	Zusammenfassung.....	69
6	Literaturverzeichnis	72
7	Anhang	78
7.1	Verzeichnis der Abkürzungen.....	78
7.2	Verzeichnis der Abbildungen	80
7.3	Verzeichnis der Tabellen	81
7.4	Daten und statistische Ergebnisse	82
7.4.1	Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration.....	82
7.4.2	Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrigel-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe.....	84
7.4.3	Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP.....	84
7.4.4	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktoren- konzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten	95
7.4.5	Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Fibringel- Gewicht.....	105

7.4.6	Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität	106
7.5	Dank	116

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen

1.1.1 Hypoxie

Der Begriff Hypoxie kommt aus dem Griechischen von $hypó$ = „unter“ und $oxýs$ = „Sauerstoff enthaltend“ und bezeichnet eine Unterversorgung eines Gewebes bzw. des Körpers mit Sauerstoff. Der Sauerstoffpartialdruck ist dabei vermindert. Die mangelhafte Sauerstoffversorgung kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden [88]. Je nach Dauer führt die Hypoxie zu einer Zellschädigung, da die Energiegewinnung der Zellen gestört und somit verschiedene Stoffwechselfvorgänge nicht richtig ablaufen können (s.u.). Durch Hypoxie können jedoch auch wichtige regenerative Vorgänge in Gang gesetzt werden, wie z.B. die Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren [39]. Die entsprechende Signaltransduktion läuft vor allem über den HIF-Signalweg [37].

1.1.2 HIF-Signalweg

HIF = Hypoxie-induzierter Faktor ist ein Transkriptionsfaktor. Er reguliert Sauerstoffbedarf und -versorgung der Zelle und besteht aus einer α - und β -Untereinheit [37].

Bei ausreichender Sauerstoffversorgung ist diese α -Untereinheit an zwei Resten hydroxyliert, was zum Abbau von HIF α führt. Tritt eine Hypoxie ein, wird die Hydroxylierung gehemmt, da das Enzym Hydroxylase Sauerstoff als Co-Substrat benötigt. HIF ist nun aktiv und wandert in den Zellkern, um die Expression von verschiedenen Genen und Wachstumsfaktoren zu aktivieren [37]. Neben Erythropoetin und anderen Wachstumsfaktoren wird auch die Expression von VEGF stimuliert. Die aktivierten Signalwege spielen für die Anpassung an die mangelnde Sauerstoffversorgung eine Rolle [82].

Erythropoetin stimuliert die Synthese von sauerstofftransportierenden Erythrozyten [85], VEGF stimuliert die Angiogenese. Außerdem werden Enzyme für die anaerobe Glykolyse und für die ATP-Synthese unter hypoxischen Bedingungen induziert. Auch

die Migration von Keratinozyten für die Bildung von neuem Epithel in Wunden wird stimuliert [78].

Bei einer chronischen Entzündung oder auch in Tumoren werden Transkriptionsfaktoren und Zytokine exprimiert. Letztlich führt dies zu einer verstärkten HIF-Expression und damit über VEGF vermittelt zu Angiogenese [46].

Deshalb ist eine Blockade von HIF eine denkbare Therapiemöglichkeit bei chronischen Entzündungen und Krebserkrankungen [57, 93].

1.1.3 Angiogenese

Der Begriff *Angiogenese* kommt aus dem Griechischen und wird zusammengesetzt aus *angeion* = „Gefäß“ und *genesis* = „Entstehung“. Angiogenese beschreibt das Wachstum von Gefäßen ausgehend von Endothelzellen durch Spaltungs- und Sprossungsvorgänge [88]. Hiervon abzugrenzen ist der Begriff *Vaskulogenese*, der die Neubildung von Blutgefäßen aus Stammzellen beschreibt, die sich de novo zu Endothelzellen ausbilden. Dies ist vor allem in der embryonalen Entwicklung von Bedeutung [46].

Beide Formen der Neubildung von Gefäßen im erwachsenen Organismus kann man mit dem Begriff *Neovaskularisation* zusammenfassen [88].

Bei der Angiogenese werden Gefäßstrukturen mit vorhandener Endothelzell-Auskleidung ausgebildet, die z.T. auch Muskelzellen und Perizyten aufweisen [20]. Angiogenese erfüllt die Funktion eines Reparaturprozesses und spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung [46, 102]. Des Weiteren ist die Angiogenese Bestandteil von weiteren physiologischen Prozessen wie z.B. in der Uterusschleimhaut im Rahmen der monatlichen endometrialen Veränderungen [35]. Auch bei pathologischen Vorgängen wie z.B. bei einer diabetischen Retinopathie [92] oder bei Tumorwachstum ist die Angiogenese entscheidend [103].

1.1.4 Physiologie der Angiogenese

Bei der Gefäßneubildung werden die betreffenden Zellen (Endothel-, Muskelzellen, Perizyten) durch verschiedenen angiogenetische Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) oder fibroblast growth factor (FGF) aktiviert [110].

Es erfolgt eine Zellmigration kleiner Zellausläufer in das die „Ursprungskapillare“ umgebende Bindegewebe. Neue Kapillären entstehen durch Endothelzellproliferation und -migration.

So können Arteriolen und Arterien, Venolen und Venen entstehen, je nachdem welche Gene aktiviert wurden. Die Wandausbildung als Abschluss des durch Wachstumsfaktoren getriggerten Prozesses wird ebenfalls durch die Wachstumsfaktoren FGF, platelet derived growth factor (PDGF) und Angiopoietin-1 reguliert [20].

Die Angiogenese hemmende Substanzen sind u.a. Thrombospondin, Endostatin und Angiostatin. Sie begrenzen den Prozess und verhindern eine überschießende unkontrollierte Neovaskularisation [54].

1.1.5 Therapeutische Nutzung der Angiogenese

Die Angiogenese kann therapeutisch auf zwei Arten genutzt werden: zum einen als anti-angiogenetische und als pro-angiogenetische Therapie.

Die anti-angiogenetische Anwendungsform ist besonders für die Hemmung des Wachstums und der Metastasierung bei malignen Tumorerkrankungen wichtig und bietet in vielerlei Hinsicht neue Behandlungsmöglichkeiten [106]. Wachsende Tumoren sind auf ein mitwachsendes Gefäßnetz, das den Tumor adäquat mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen versorgt, angewiesen. Wird in diesem Fall die Angiogenese unterdrückt, unterbleibt eine entsprechende Versorgung bzw. Durchblutung des Tumors und Gewebe geht zugrunde. Diesen Ansatz nutzen VEGF-neutralisierende monoklonale Antikörper wie Bevacizumab z.B. bei der Therapie von Brustkrebs [68], Darmkrebs [52], Lungenkrebs [91] oder auch dem Nierenkarzinom [30].

1.1.6 VEGF

VEGF oder auch vascular endothelial growth factor ist ein Zytokin. Zytokine sind Proteine, die verschiedene Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder auch Zellfunktionen als Signalmoleküle regulieren. Es kommt in vielen Geweben vor.

VEGF gehört dabei zu den Wachstumsfaktoren. Es reguliert unter anderem die Wachstumsrichtung von Kapillaren, was dem Konzentrationsgradienten folgend

geschieht. In Richtung der VEGF-Quelle kommt es zu einem Aussprossen der Kapillaren und einer Proliferation von Endothelzellen [20].

VEGF spielt eine Rolle in der embryonalen de novo-Synthese von Gefäßen als auch in der Angiogenese [110]. Daneben stimuliert das Zytokin auch andere Zellen wie Monozyten oder Makrophagen zur Proliferation. Von VEGF sind mehrere verschiedene Formen bekannt, wobei die Unterarten weitere Isoformen aufweisen: VEGF A-F sowie PlGF = placental growth factor [110].

Um seine Wirkung zu entfalten, bindet VEGF an den VEGF-Rezeptor (VEGFR), der zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehört. Damit hat der intrazelluläre Teil dieses Transmembranrezeptors eine Tyrosinkinaseaktivität. Durch die Bindung des Liganden kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung und die Tyrosinkinaseaktivität wird aktiviert. Tyrosinreste werden phosphoryliert und die Kinaseaktivität wird gesteigert. Weitere Signaltransduktionsmoleküle docken an die Phosphotyrosinreste an und über Effektormoleküle wird der Signalweg aktiviert [108].

Die Produktion von VEGF wird durch Hypoxie stimuliert [73]. In diesem Fall werden Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF) gebildet. Das sind Transkriptionsfaktoren, die die Versorgung einer Zelle mit Sauerstoff sicherstellen. HIF führen letztendlich zur Bildung und Hochregulation von VEGF und somit zur wichtigen Angiogenese wie z.B. bei der Wundheilung [94].

1.1.7 Weitere Wirkungen von VEGF

VEGF hat auch eine direkte Wirkung auf die Gefäßwand: Durch Stickstoffmonoxid (NO) wird eine Vasodilatation vermittelt, die letztendlich zu einer Blutdrucksenkung führt [45].

Des Weiteren spielt das Zytokin für die Entwicklung der Niere und die Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere eine Rolle, indem die Integrität der fenestrierten kapillären Endothelzellen aufrechterhalten wird [53].

Unter anderem ist der Wachstumsfaktor VEGF auch im weiteren Verlauf eines Diabetes mellitus von Bedeutung. Durch kapilläre Gefäßverschlüsse kommt es zu einer Ischämie in der Retina. Der Sauerstoffmangel hat eine erhöhte Expression von VEGF zur Folge, die letztlich zur unkontrollierten Neovaskularisation und damit zum Visusverlust führt [19].

In verschiedenen Tumoren ist die Expression von VEGF-A erhöht. Der wachsende Tumor stellt durch die hochregulierte Angiogenese eine ausreichende Blutversorgung sicher [33]. Hieraus leiten sich auch Therapieansätze ab: Antikörper und Angiogeneseinhibitoren kommen bei verschiedenen Krebsarten (s.o.) zum Einsatz [34].

1.1.8 TSP1

Das Protein TSP1 = Thrombospondin 1 gehört zu den Thrombospondinen und wird u.a. von Thrombozyten, Stroma-, Immun- und Endothelzellen exprimiert.

Durch die Stimulation von Thrombozyten mit Thrombin wird das Glykoprotein TSP1 aus den Alphagranula ausgeschüttet [1]. Es ist ein Protein der Extrazellulärmatrix und entfaltet seine Wirkung somit als Zelladhäsionsmolekül [1].

Verschiedene Vorgänge, die die Integrität eines Gewebes und die Struktur der Extrazellulärmatrix bestimmen, werden durch TSP1 organisiert. Als Rezeptormoleküle kommen Oberflächenproteine wie CD36 und CD47 oder auch Integrine in Frage, wodurch TSP1 Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert [24]. Auf die Angiogenese hat es eine hemmende Wirkung [51].

Daneben spielt TSP1 eine Rolle bei der Apoptose (aktivierend), Proliferation (antiproliferativ), Immunregulation (hemmend) und bei der Aktivierung des Wachstumsfaktors TGF β . Des Weiteren hemmt es die Migration von Endothelzellen. Auf die Kollagensynthese hat TSP1 über TGF β eine aktivierende Wirkung [64].

Als antiproliferatives, apoptoseförderndes und angiogenesehemmendes Protein ist TSP1 ein Tumorsuppressor. Tumore, bei denen die Expression von TSP1 hochreguliert ist, weisen meist ein langsames Wachstum auf [63].

1.1.9 PF4

Plättchenfaktor 4 = PF4 (englisch: platelet factor 4) ist ebenfalls ein Zytokin und gehört aufgrund seiner Struktur nomenklatorisch zur Familie der CXC-Chemokine. Eine weitere Bezeichnung für PF4 ist CXCL4 (C-X-C motif ligand 4) [29]. Es wird ähnlich wie TSP1 aus den Alphagranula der Thrombozyten ausgeschüttet, wenn diese während der Plättchenaggregation aktiviert werden. Es unterstützt die Blutgerinnung, indem es mit hoher Affinität an Heparin und heparin-like molecules an

der Endotheloberfläche und im Plasma bindet und damit die gerinnungshemmende Aktivität von Antithrombin III verhindert [101]. Außerdem wirkt es chemotaktisch auf andere Zelltypen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten [28] und spielt deshalb eine große Rolle bei Entzündungs- und immunologischen Prozessen. Zudem wirkt es inhibitorisch auf Endothelzellen [36] und Angiogeneseprozesse [10, 61, 71].

1.1.10 Fibrinbildung

Fibrin kommt aus dem Lateinischen fibra = „Faser“ und ist der Faktor Ia der Blutgerinnungskaskade. Es stellt das Endprodukt der plasmatischen Blutgerinnung (sekundäre Hämostase) dar und ist ein Protein, das aus der Vorstufe Fibrinogen (Faktor I) durch Abspaltung von Fibrinopeptid A und B entsteht [88]. Diese Abspaltungsprozesse werden durch das Enzym Thrombin (Faktor IIa) vermittelt. Die Fibrinmoleküle aggregieren und es entsteht ein Netz aus Fibrinfasern, das anschließend durch eine Quervernetzung stabilisiert wird [27]. Diese Quervernetzung wird durch Faktor XIIIa (Fibrinstabilisierender Faktor = FSF) katalysiert, der ebenfalls durch Thrombin aktiviert wird [6]. Ein Blutgerinnsel aus netzförmig angeordneten Fibrinfäden entsteht, das auch als „weißer Thrombus“ bezeichnet wird.

Calcium (Faktor IV) bzw. ist ein wichtiger Cofaktor dieser Prozesse. Erst durch Zuführen von Ca^{2+} -Ionen zum antikoaguliertem Blut (s. Material und Methoden), kann sich die Fibrinmatrix formieren [6].

Fibrinogen und Thrombin werden jeweils in der Leber gebildet, kontinuierlich an das Blut abgegeben und sind im Blutplasma vorhanden [88].

1.2 Spezielle Grundlagen

1.2.1 Verwendung von PBCs

Verschiedene Zellarten wurden in früheren Studien in vitro Hypoxie ausgesetzt: Periphere Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten; englisch = peripheral blood cells, kurz PBCs) haben sich als vorteilhaft erwiesen, da sie ubiquitär verfügbar und nach einer einfachen Blutabnahme leicht zu erhalten und zu kultivieren sind [44]. Demnach ist ein langwieriger Prozess von der invasiven

Entnahme durch eine Biopsie über Zellpopulation und zugehörigen Expansionszyklen bei der Verwendung von humanen Haut-Fibroblasten redundant [38]. Des Weiteren muss bei der Kultur von PBCs kein Nährmedium oder andere Stoffe zugegeben werden, da durch Blutplasma physiologisch genügend Nährstoffe, Glucose und Elektrolyte bereitgestellt werden [44].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Lymphozyten und Monozyten (PBMCs = peripheral blood mononuclear cells) auf Stresssituationen wie Hypoxie, Ischämie, Entzündung oder Bestrahlung mit einer erhöhten Produktion von VEGF [18, 96], bEGF [80], IL 8 [48, 58] oder MMP 9 [48] reagieren und die Angiogenese stimulieren [11, 59, 76]. Die Transplantation von autologen Monozyten aus dem Blut oder Knochenmark konnte eine Verbesserung der Durchblutung einer kritischen Extremitätenischämie [3, 79] zeigen, die Heilung von chronischen Ulcera beschleunigen [49] oder die kardiale Funktion nach einem akuten Myokardinfarkt verbessern [48]. Um bestimmte Faktoren unter Hypoxie zu produzieren, werden in den hier vorgestellten Experimenten aus diesen Gründen PBCs herangezogen.

1.2.2 Temperatur

Die metabolische Aktivität einer Zelle wird durch die Proteinsynthese bestimmt [17]. Auch die Temperatur spielt für den Stoffwechsel eine entscheidende Rolle, weshalb die Expression von angiogenen Faktoren von der Umgebungstemperatur abhängt. Zum Beispiel wird VEGF von PBCs bei einer physiologischen Temperatur von 37° C mehr exprimiert als bei Raumtemperatur (20° C) [38]. Eine höhere Temperatur führt also zu einer höheren Proteinsynthese-Aktivität und Stoffwechselrate. Um letztendlich eine entsprechende Konzentration von angiogenen Faktoren im HPP zu erhalten, wird dieses in den hier vorgestellten Versuchen demnach bei 37° C inkubiert.

1.2.3 Hypoxie in vitro

Hypoxie ist ein wichtiger Stimulator, um eine vermehrte Expression angiogener Faktoren zu erreichen (s.o.). In mehreren Studien wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, ein hypoxisches Setting herzustellen [22, 41, 44].

In den hier beschriebenen Experimenten wird das Prinzip der lokalen Zell-induzierten Hypoxie angewandt. Wie schon in früheren Studien gezeigt, wird ein Klima erzeugt, in dem der Sauerstoffgehalt vom Verbrauch der Zellen selbst reguliert und somit lokal definiert wird [44]. Dadurch könnten auch die Verhältnisse in einer chronischen Wund-Situation besser nachgebildet werden [38, 44]. Ein weiterer Vorteil der lokalen Methode ist, dass die durch die Hypoxie bedingte Genexpression angiogener Faktoren einer physiologischen Antwort auf einen hypoxischen Stimulus sehr nahe kommt [38].

In einem 3D-in vitro-Modell konnte diese lokale Zell-induzierte Hypoxie erreicht werden, indem die Anzahl und die Verteilung der Zellen im Depot angepasst wurde [22, 23]. Es wurden hauptsächlich humane dermale Fibroblasten oder glatte Muskelzellen aus Gefäßwänden verwendet. Eine VEGF-Expression wurde vor allem durch Zellen in einer Umgebung mit einem Sauerstoffgehalt von 3% hervorgerufen [22].

In einem Tierversuch wurden Hasen subkutan Depots von hypoxischen Zellen implantiert. Diese waren durch die aktive Produktion von angiogenen Faktoren in der Lage, eine Infiltration von Endothelzellen in die Matrix zu ermöglichen [41].

In anderer Weise konnte dieser Effekt auch bei ischämischen Extremitäten von Mäusen gezeigt werden: Die Implantation von mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, die zuvor in vitro durch Hypoxie stimuliert wurden, konnte die parakrine Signalaktivität und das Überleben der Zellen verbessern [9]. Vergleichbare Zellen ohne vorhergegangene Stimulation konnten diese Wirkung nicht erzielen.

Dementsprechend wird in den hier beschriebenen Experimenten das Konzept einer lokalen, Zell-vermittelten Hypoxie in vitro verwendet.

1.2.4 Herstellung von HPP

HPP = Hypoxie präkonditioniertes Plasma bildet die Grundlage für die vorgestellten Ergebnisse. HPP (hypoxia preconditioned plasma) wird aus patienteneigenem Blut hergestellt [44]. Das antikoagulierte Blut wird in einem schmalen Gefäß in einem Inkubator bei 37 ° C und normalem Sauerstoffgehalt inkubiert.

Durch Sedimentation trennt sich das Blut in seine Bestandteile auf: Zwischen Erythrozyten (unten) und Blutplasma (oben) verläuft die zellreiche Grenzschicht mit enthaltenen Leuko- und Thrombozyten (englisch: buffy coat) [88].

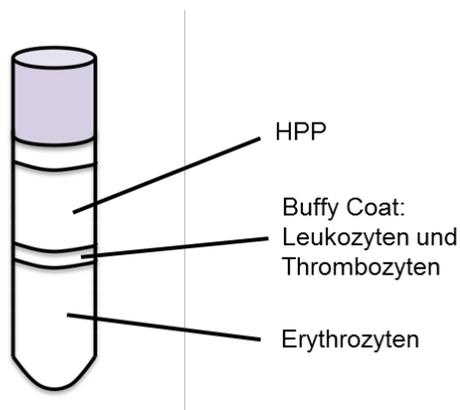


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sedimentation.

Das HPP fungiert als Überstand des Zellkultursystems (aus Zellen des buffy coat). Es enthält die angiogenen Faktoren, die unter hypoxischem Stress als Stimulus durch die PBCs produziert wurden.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass der Sauerstoffdruck im Gefäß durch den Sauerstoffverbrauch und durch die Anzahl bzw. Lebensfähigkeit der Zellen bestimmt wird [44]. Angrenzend an die Schicht von Thrombo- und Leukozyten entsteht allmählich über die Zeit ein hypoxischer Bereich [38]. Wenn der Sauerstoffgehalt zu niedrig ist ($< 1\%$), kommt es zur Beeinträchtigung der zellulären Stoffwechselfvorgänge [39]. Mit sinkendem Sauerstoffgehalt reduzieren die meisten Zellen ihren Sauerstoffverbrauch und reagieren mit einer Umstellung zum anaeroben Stoffwechsel [12, 95]. Ein kleiner Teil der Zellen bleibt jedoch metabolisch aktiv und betreibt weiterhin einen aeroben Stoffwechsel [38] und es werden bei einem erniedrigten Sauerstoffgehalt von ungefähr 1-10 % verschiedene regenerative Mechanismen in Gang gesetzt [39, 44].

Es wird vermutet, dass im hypoxischen Bereich über dem buffy coat der Sauerstoffdruck durch die Anzahl der noch aerob aktiven Zellen festgelegt wird, was individuell jedoch unterschiedlich ist. Die Dichte des Blutes im Gefäß von 10 ml Volumen Blut auf 1 cm^2 ist ausreichend, um einen perizellulären Sauerstoffgehalt von weniger als 1 % zu erhalten [38].

Der buffy coat stellt demnach ein Zellkultursystem von PBCs dar. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen selbst generiert ein hypoxisches Mikromilieu (s.o.). Die Zellen reagieren auf diesen hypoxischen Stress mit der Produktion von

angiogenen Faktoren wie VEGF. Das Plasma fungiert demnach als ein Überstand des Zellkultursystems, in dem die produzierten Proteine enthalten sind. Es stellt damit ein speziell konditioniertes Medium dar (Hypoxie-präkonditioniertes Plasma).

1.2.5 Zusammensetzung HPP

Je nachdem, wie lange man PBCs hypoxischen Bedingungen aussetzt, variiert die Expression von angiogenen Faktoren [38]. Die Inkubationszeit als solche ist also für die Zusammensetzung des HPP - Konzentrationen und Verhältnisse der verschiedenen Faktoren betreffend - ein ausschlaggebendes Kriterium.

Die Expression von VEGF als Angiogenese-fördernder Faktor wird in Hypoxie-inkubierten PBCs hochreguliert [38]. Im Unterschied dazu wird eine initiale Hochregulation des anti-angiogenen Faktors TSP1 durch eine Herunterregulation unter andauernder Hypoxie ersetzt [38].

Hypoxie hat auf den anti-angiogenen Signalweg via TSP1 eine hemmende Wirkung. Vor allem langfristig werden so Angiogenese fördernde Transduktionswege in ihrer Wirkung unterstützt [38, 51, 100].

Durch den Sauerstoffabschluss wird die Produktion von Wachstumsfaktoren angeregt und somit enthält HPP diese in höherer Konzentration als zum Zeitpunkt der Blutabnahme und als es physiologisch der Fall wäre [22, 39, 77]. Verschiedene antiregenerative Faktoren und Proteine, die die Angiogenese hemmen (z.B. TSP1), sind unter längeren Hypoxieperioden in kleineren Konzentrationen vorhanden [38, 44].

1.3 Ziel der Studie

Bei der HPP-Herstellung spielen verschiedene Punkte eine Rolle: die Inkubationszeit des Blutes, die Masse der Fibrinmatrix und die verschiedenen Zeitspannen in der weiteren experimentellen Verfahrensweise, um letztendlich die vom HPP gelösten Proteinfaktoren auf deren Konzentration zu untersuchen. Eine Variation der Herstellungsparameter des HPP hat letztendlich Einfluss auf die Zusammensetzung und die Konzentration der Faktoren. Dabei müssen neben den angiogenen auch die hemmenden Proteinfaktoren berücksichtigt werden. Die Ergebnisse können einen Beitrag dazu leisten, Hypoxie präkonditioniertes Plasma als Medium

weiterzuentwickeln. In der Zukunft könnte HPP dazu dienen, verschiedene molekularbiologische Mechanismen zu untersuchen und für pathophysiologische Prozesse wie z.B. die Wundheilung neue Erkenntnisse liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Reagenzien

Die für die Versuchsansätze benötigten Reagenzien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Reagenz	Verwendungszweck	Firma
Blutplasma	Reagenz	-
Fibrinogenlösung (Tissucol Duo S 1 ml Immuno)	Bildung des Fibringels	Baxter
Thrombinlösung (Tissucol Duo S 1 ml Immuno)	Bildung des Fibringels	Baxter
PBS Dulbecco (= Phosphate buffered saline)	Pufferlösung, isotonische Salzlösung	Biochrom GmbH
Quantikine ELISA: Human CXCL4/PF4 Human VEGF Human Thrombospondin-1	ELISA Set	R&D Systems

Tab. 1: Verwendete Reagenzien

2.2 Verwendetes Material

Das in den Experimenten verwendete Material ist in Tabelle 2 dargestellt.

Material	Verwendungszweck	Firma
BD Vacutainer Safety- Lok	Blutabnahmeset mit Flügelkanüle	Becton, Dickinson and Company
BD Vacutainer K2E (EDTA) 18,0 mg	Blutentnahmeröhrchen mit EDTA	Becton, Dickinson and Company
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle 0,9 x 40 mm 20 G x 11/2	Entlüften des Vakuums	B Braun Melsungen
Parafilm M Laboratory Film	luftdichtes Verschließen der Vacutainer-Röhrchen	Bemis Packaging
Cellstar 24 Well Cell Culture Plate	Pipettierplatte	Greiner bio-one
Cellstar Tubes 15 ml	Reagenzgefäß	Greiner bio-one
Eppendorf Research 1000 µl Pipette	Pipette	Eppendorf
Pipette tips	Pipettenspitzen	Greiner bio-one
ELISA-Set (s.o.)	(s.o.)	(s.o.)

Tab. 2: Verwendetes Material

2.3 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte zeigt Tabelle 3.

Geräte	Verwendungszweck	Firma
Hera Cell 150 Incubator	Inkubator bei 37 Grad	Thermo Scientific
Rotanta 460R Kühlzentrifuge	Zentrifugation	Hettich Zentrifugen
Wasserbad mit IKA EH4 basic Thermostat	Erwärmung der Reagenzien	IKA
IKA KS 260 basic Laborschüttler	Mischen und Schütteln der Reagenzien	IKA
KERN ABJ Analysenwaage	Wiegen der Fibrinmatrix	Kern & Sohn
BDK Werkbank	Reinluftwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik

Tab. 3: Verwendete Geräte

2.4 Versuchsaufbau

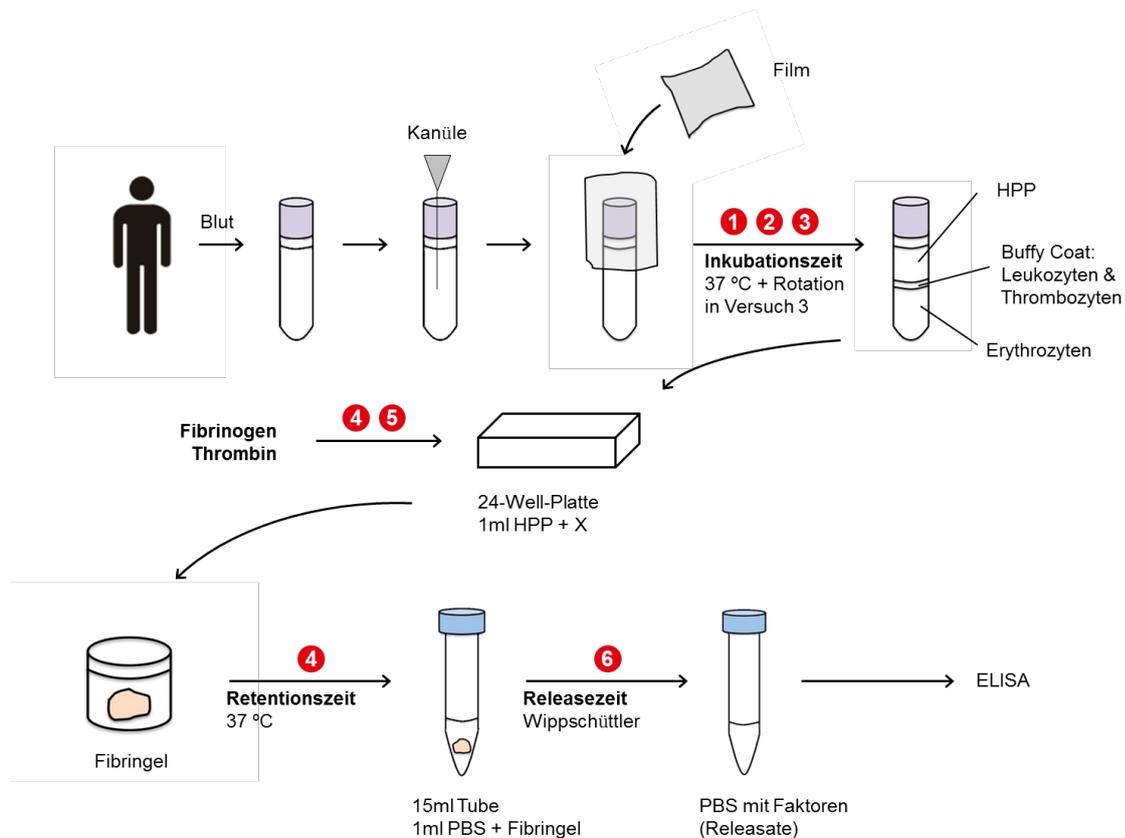


Abb. 2: Zusammenfassender Versuchsaufbau

Einzelheiten siehe Text.

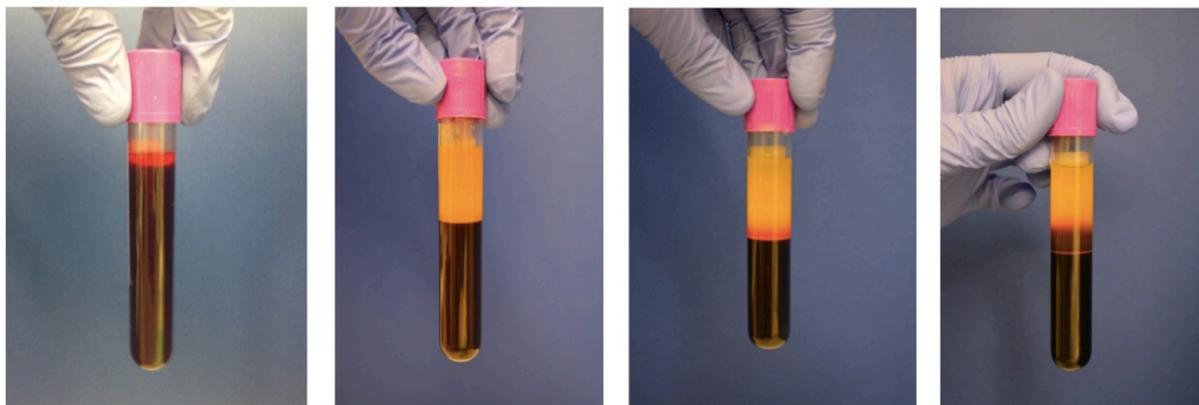
Eine umfassende Übersicht über den allgemeinen Versuchsaufbau zeigt das Schaubild 2. Die Einzelheiten werden in den folgenden Punkten erläutert.

2.4.1 HPP-Gewinnung und Inkubationszeit

Bei einem Probanden (weiblich, 24 Jahre, BMI = 20 kg/m²) wurden insgesamt ca. 310 ml Blut abgenommen, je nach Experiment jeweils 40 ml, 50 ml oder 60 ml. Verwendet wurden dabei Vacutainer-Röhrchen, die auch den Blutgerinnungshemmer EDTA enthalten (s. Tab.). Ethylendiamintetraessigsäure ist ein Komplexbildner, der die für die Blutgerinnung essenziellen Calcium-Ionen im Blut abpuffert. Somit wurde eine Antikoagulation erreicht.

Die Tubes wurden für fünf Minuten unter der Bench belüftet. Eine sterile Injektionskanüle entlüftete dabei das Vakuum. Anschließend wurden die Röhrchen mit Folie unter Sauerstoffabschluss abgedeckt und bei 37° C unter normalen Bedingungen (Sauerstoff 21 %, CO₂ 5 %) im Brutschrank je nach Inkubationszeit inkubiert.

Das Blut trennte sich durch Sedimentation in seine Bestandteile auf: Zelluläre Bestandteile (Erythrozyten und der buffy coat bestehend aus Leuko- und Thrombozyten) setzten sich unter dem Plasma ab. Das Plasma hatte pro Tube ein Volumen von ca. 4 ml.



A

B

C

D

Abb. 3: Sedimentation der Erythrozyten über eine Zeitperiode von insgesamt acht Tagen

A Frischblut. B Zustand nach wenigen Stunden. C Zustand nach wenigen Tagen. D Zustand nach insgesamt acht Tagen. Die zellreiche Schicht = buffy coat ist deutlich zu erkennen.

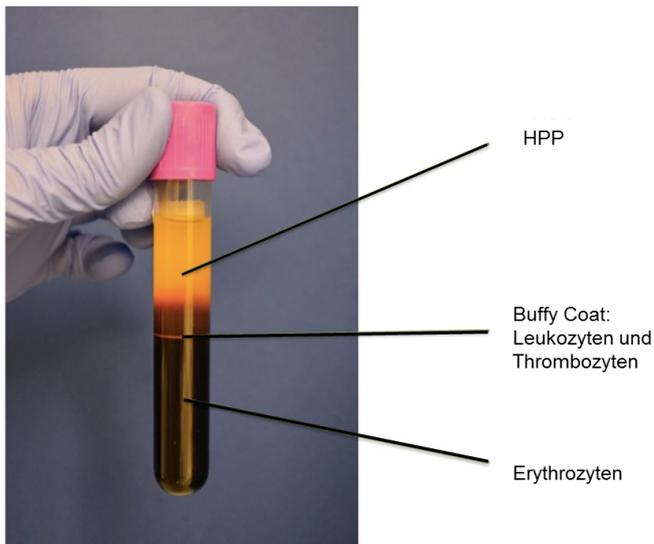


Abb. 4: Blutbestandteile nach Sedimentation

Erythrozyten (unten), buffy coat mit enthaltenen PBCs (Leukozyten und Thrombozyten; mittig), das Plasma als zelloser Überstand (HPP; oben).

Nach Abwarten der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Gefäß am sterilen Arbeitsplatz geöffnet. Pro Probe wurden 3 ml Plasma abpipettiert und in eine 24-Well-Platte gegeben. Der Inhalt eines Tubes wurde für eine Kondition verwendet. Pro Kondition bzw. Versuchsansatz wurden drei Samples getestet (Samples A, B, C; $n = 3$), für ein Sample wurde jeweils 1 ml HPP verwendet.

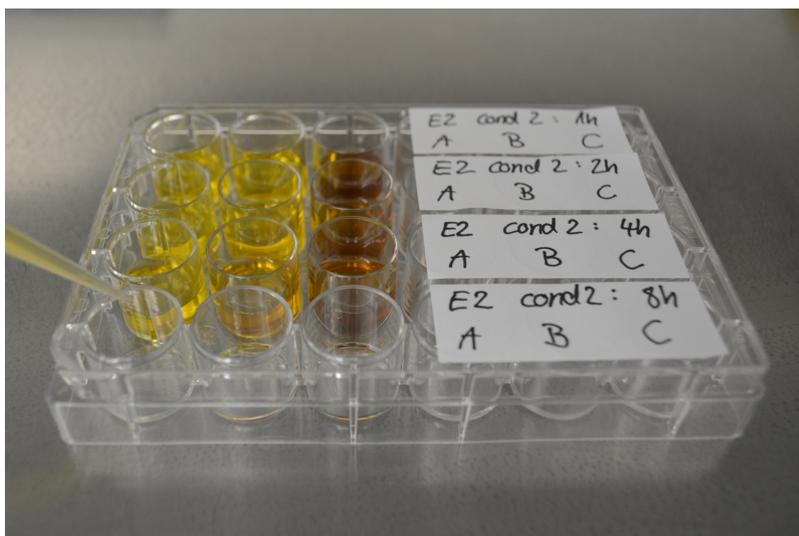


Abb. 5: 24-Well-Platte

Eine Zeile mit drei Samples ($n = 3$; A, B, C) wurde jeweils für einen Versuchsansatz verwendet. Ein Well enthielt jeweils 1 ml HPP.

2.4.2 Herstellung der Fibrinmatrix und Retentionszeit

Das sich nun in den Plates befindende HPP wurde weiterverarbeitet.

Um das Plasma gerinnen zu lassen, wurden Fibrinogen, Thrombin und Calcium-Ionen zugegeben (Volumen je nach Versuchsansatz s. Tab.). Verwendet wurde *Tissucol Duo S 1 ml Immuno*.

Tissucol Duo S 1 ml Immuno enthält jeweils 1 ml Fibrinogenlösung mit Plasmaproteinen, Fibrinogen, Blutgerinnungsfaktor XIII (Fibrinstabilisierender Faktor FSF), Plasmafibrinectin und bovinem Aprotinin und 1 ml Thrombinlösung mit Thrombin und Kalziumchlorid.

Zuerst wurde die gewünschte Menge Fibrinogen zugegeben, danach die Thrombinlösung.

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde das Sample solange gemischt, bis sich ein Gel bildete. Dabei lief die plasmatische Gerinnungskaskade ab, die letztendlich über Thrombin vermittelt wird. Da die Proben nur das Plasma enthielten, konnte die zelluläre Hämostase, die durch Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation gekennzeichnet ist, nicht ablaufen.

Thrombin spaltet von Fibrinogen Einheiten ab, wodurch ein netzartiges Fibrinaggregat entsteht, das durch Faktor XIII quervernetzt und somit stabilisiert wird (s.o.) [27]. Das Fibringel entstand nach ein bis zwei Minuten.



Abb. 6: Beispielsweiser Aufbau eines Versuchsansatzes

Nach Zugabe von Fibrinogen und Thrombin zum HPP entstand eine gelähnliche Fibrinmatrix.

Ab diesem Zeitpunkt lief die sog. Retentionszeit. In dieser Zeitperiode wurden die Faktoren, die im HPP enthalten waren, durch Diffusion an die Fibrinmatrix gebunden. Die Platte mit der Fibrinmatrix im Plasma wurde dazu im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

2.4.3 Gewinnung von PBS und Releasezeit

Nach abgelaufener Retentionszeit wurde die Platte aus dem Brutschrank genommen und das darin befindliche Gel weiterverarbeitet.

Pro Sample wurde jeweils in einen 15 ml Tube 1 ml PBS-Lösung pipettiert. Mit einer Pinzette wurde die Fibrinmatrix aus der Platte entfernt und zur PBS-Lösung in den Tube gegeben.

PBS oder auch Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS = Phosphate buffered saline) enthält Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Phosphat und dient als isotonische Lösung.

Die Lösung wurde für 20 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. In dieser Zeit diffundierten die im Fibringel enthaltenen Faktoren in die PBS-Lösung, was deshalb auch als Releasetime oder -zeit bezeichnet wird. In Experiment 6 wurde die Releasezeit als einflussnehmender Faktor variiert. In diesem Fall wurden die Proben nicht zentrifugiert, sondern auf einem Wippschüttler fixiert. Die jeweilige Releasezeit wurde abgewartet.

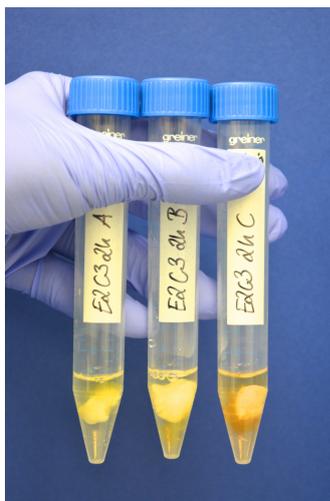


Abb. 7: 15 ml -Tube (mit jeweils 1 ml enthaltener PBS-Lösung und dem extrahierten Fibringel)



Abb. 8: Extrahierte Fibringel-Matrix

Nach Ablauf der Releasezeit wurde das Fibringel mit einer Pinzette entfernt, anschließend fotografiert und mit einer Analysenwaage gewogen und verworfen. Das zurückbleibende PBS mit den enthaltenen Faktoren = Überstand wird als Releasate bezeichnet und für die spätere Verwendung bei -20 Grad eingefroren.

2.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das PBS-Releasate wurde jeweils aufgetaut und auf eine ELISA-Mikrotiter-Platte aufgetragen. Eine ELISA-Platte wurde für den Nachweis von VEGF, jeweils eine andere für den Nachweis von TSP1 und PF4 verwendet. Die verschiedenen Samples wurden auf die Platte aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils 14 Wells einer Platte mit Standard-Samples sowie drei Wells mit reiner PBS-Lösung als Negativkontrolle belegt. Den Herstellerangaben entsprechend wurde nun der jeweilige ELISA-Test durchgeführt.

2.4.5 Das Nachweisprinzip eines ELISA

Die zu bestimmenden Substanzen, hier also die verschiedenen Releasates, wurden jeweils an der Oberfläche immobilisiert. Im nächsten Schritt wurden diese mit einem speziellen Antikörper inkubiert, der als primärer Antikörper bezeichnet wird. Anschließend fand eine Inkubation mit einem sekundären Antikörper statt, der gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichtet ist. Dieser war zusätzlich mit einem Indikatorenzym gekoppelt. Nach abgeschlossener Reaktionszeit war die Menge des gebundenen Indikatorenzyms der Menge der Proteinprobenmenge proportional. In einem letzten Schritt fand eine Inkubation mit dem Enzym-Substrat statt, bei der anschließend die Produktbildung gemessen werden konnte. Dabei handelte es sich um die gebildete Menge eines Farbstoffs oder Chemielumineszenz [65]. Somit konnte die genaue Konzentration von verschiedenen Stoffen in den Zellüberständen gemessen werden.

2.5 Beschreibung der verschiedenen Ansätze

Für jeden Versuchsansatz wurden verschiedene einflussnehmende Faktoren im Versuchsaufbau variiert, die im dargestellten Schema durch Ziffern gekennzeichnet sind. Entsprechend farblich gekennzeichnet ist diese Variable in der dazugehörigen Tabelle mit den Reagenzien der Ansätze.

2.5.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration

In Versuch 1 wurde der Einfluss der Inkubationszeit $t = 0, 2, 4$ oder 8 Tage auf die Faktorenkonzentration im PBS-Releasate bei gleichbleibender Retentionszeit von 24 h untersucht (s. Schritt 1 in Abb. 2, rot dargestellt in Tabelle).

Benötigt wurden 40 ml Blut eines Probanden, das nach oben dargestellten Maßnahmen verarbeitet wurde. In den verschiedenen Konditionen 1-4 wurde nach der Inkubationszeit zu jeweils 1 ml Plasma $0,2$ ml Fibrinogen und $0,2$ ml Thrombin/Calcium-Lösung gegeben. Nach der Inkubationszeit wartete man die 24 h Retentionszeit ab, bevor das PBS gewonnen wurde. Als Releasezeit galten 20 min Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C.

	Kondition 1	Kondition 2	Kondition 3	Kondition 4
Inkubationszeit	0 Tage = 3-4 h	2 Tage	4 Tage	8 Tage
Fibrinogen	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Thrombin/Ca²⁺	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Retentionszeit	24 h	24 h	24 h	24 h
Releasezeit	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 1

Sonderfall Inkubationszeit $t = 0$ Tage

In Experiment 1 Kondition 1 und in Experiment 2 Kondition 1 ist die Inkubationszeit mit null Tagen angegeben. Dabei wurde das Blut zwei bis vier Stunden nach oben genannten Maßnahmen inkubiert, da sonst eine komplette Trennung der

Komponenten in der kurzen Zeit durch Sedimentation nicht zu erwarten war. In diesem Fall kann man auch noch nicht von HPP sprechen.

2.5.2 Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrinogen-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe

In Versuch 2 wurde der Einfluss der Inkubationszeit $t = 0, 2, 4, 8$ Tage auf das Gewicht des sich bildenden Fibringels untersucht.

Das HPP wurde in Kondition 1 null Tage inkubiert, in Kondition 2 zwei Tage, in Kondition 3 vier Tage und in Kondition 4 acht Tage (s. Schritt 2 in Abb. 2 bzw. rot dargestellt in Tab. 5).

In jeder Kondition wurde zu 1 ml HPP 0,2 ml Thrombin/Calcium-Lösung gegeben. Eine weitere Fibrinogen-Zugabe entfiel in diesem Fall. Die Retentionszeit wurde auf fünf Minuten verkürzt, da sie als einflussnehmender Faktor in diesem Ansatz, in dem lediglich das Gewicht des entstehenden Fibringels untersucht werden sollte, nicht von Interesse ist. Mit der Zentrifugation wurde jedoch ebenso verfahren, um vergleichbare reproduktive Ergebnisse zu erhalten. Anschließend wurde die extrahierte Fibrinogen-Matrix fotografiert und gewogen.

	Kondition 1	Kondition 2	Kondition 3	Kondition 4
Inkubationszeit	0 Tage = 3-4 h	2 Tage	4 Tage	8 Tage
Fibrinogen	-	-	-	-
Thrombin/Ca²⁺	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Retentionszeit	5 min	5 min	5 min	5 min
Releasezeit	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 2

2.5.3 Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP

Für Versuch 3 wurden sechs Röhrchen mit jeweils ca. 10 ml Blut abgenommen.

Es wurde der Einfluss von Rotation auf die entstehende Faktor-Konzentration zum einen im HPP direkt und zum anderen im PBS-Releasate untersucht (s. Schritt 3 in Abb. 2, rot dargestellt in Tab. 6).

In diesem Versuchsaufbau wurden die Samples in Kondition 1 sofort nach Blutabnahme für fünf Minuten bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Somit zeigten sich sofort die drei Schichten, die sonst durch Sedimentation längere Zeit zur Ausbildung benötigt hätten. Danach wurde das Vakuum entlüftet, die Tubes luftdicht verschlossen und die Samples für vier Tage bei 37 °C inkubiert.

Bei den Samples in Kondition 2 wurde das Vakuum sofort entlüftet und danach luftdicht verschlossen. Die Tubes wurden auf einem Rotator schräg fixiert und bei 37 °C im Inkubator bei gleichmäßiger vertikaler und horizontaler Bewegung für vier Tage inkubiert. Die verschiedenen Schichten bildeten sich somit nicht aus, da das Blut ständig bewegt wurde. Nach vier Tagen wurden die Samples ebenfalls zentrifugiert (2000 rpm, 4 °C, 5 min). Danach wurde mit beiden Konditionen gleich verfahren.

Von jedem Sample aus Kondition 1 und 2 wurden 2 ml Plasma abpipettiert und eingefroren, die weiteren Schritte (Zugabe von Fibrinogen und Thrombin, Retentionszeit und Releasezeit) demnach ausgelassen. Aus diesen aus HPP bestehenden Samples wurde abschließend ebenfalls die Faktorenkonzentration durch einen ELISA bestimmt. Mit dem verbliebenen HPP wurde ein Releasate hergestellt. Dazu wurde in eine 24-Well-Plate jeweils 1 ml HPP abpipettiert und 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin/Ca²⁺ hinzugegeben.

Der Versuchsaufbau entsprach dann im weiteren Verlauf dem von Experiment 1 (Retentionszeit 24 h, Releasezeit: Zentrifugation 20 min).

	Kondition 1 (3 Tubes)	Kondition 2 (3 Tubes)
Inkubationszeit 37 °C	4 Tage	4 Tage
Bewegung im Rotator	-	ja
Zentrifugation	sofort nach Abnahme 2000 RPM 5 min 4°C	nach Inkubationszeit 2000 RPM 5 min 4°C
Abnahme des Plasma und sofortiges Einfrieren	aus jedem Tube 2 ml	aus jedem Tube 2 ml
Fibrinogen	0,2 ml	0,2 ml
Thrombin/Ca²⁺	0,2 ml	0,2 ml
Retentionszeit	24 h	24 h
Releasezeit	Zentrifugation	Zentrifugation

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 3

2.5.4 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten

In Versuch 4 wurde der Einfluss der Fibrinogenkonzentration auf die Faktorenkonzentration bei verschiedenen Retentionszeiten $t = 1 \text{ h}, 2 \text{ h}, 4 \text{ h}, 8 \text{ h}$ untersucht (s. Schritt 4 in Abb. 2).

Die Proben aller Konditionen 1-3 wurden zuvor acht Tage inkubiert.

In Kondition 1 wurde zu 1 ml HPP nur 0,2 ml Thrombin/Calcium-Lösung und kein zusätzliches Fibrinogen gegeben (s. Tab. 7).

Inkubationszeit	8 Tage	8 Tage	8 Tage	8 Tage
Fibrinogen	-	-	-	-
Thrombin/Ca²⁺	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Retentionszeit	1 h	2 h	4 h	8 h
Releasezeit	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation

Tab. 7: Tabellarische Darstellung des Versuchsansatzes bei einer Zugabe von 0 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin für Experiment 4

Die Proben in Kondition 2 enthielten neben 1 ml HPP jeweils 0,1 ml Fibrinogen und 0,1 ml Thrombin/Calcium-Lösung (s. Tab. 8).

Inkubationszeit	8 Tage	8 Tage	8 Tage	8 Tage
Fibrinogen	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Thrombin/Ca²⁺	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Retentionszeit	1 h	2 h	4 h	8 h
Releasezeit	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation

Tab. 8: Tabellarische Darstellung des Versuchsansatzes bei Zugabe von jeweils 0,1 ml Fibrinogen und Thrombin für Experiment 4

In Kondition 3 wurde zu jeweils 1 ml HPP 0,2 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin/Calcium-Lösung gegeben (s. Tab. 9).

Inkubationszeit	8 Tage	8 Tage	8 Tage	8 Tage
Fibrinogen	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Thrombin/Ca²⁺	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Retentionszeit	1 h	2 h	4 h	8 h
Releasezeit	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation	Zentrifugation

Tab. 9: Tabellarische Darstellung des Versuchsansatzes bei Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin für Experiment 4

In jeder Kondition mit unterschiedlicher Fibrinogen-Konzentration wurde die Retentionszeit variiert (1 h, 2 h, 4 h, 8 h), d.h. nach der jeweiligen Zeit wurde die PBS-Gewinnung inkl. Zentrifugation durchgeführt (s. blau gekennzeichnet in Tab. 7-9).

2.5.5 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Fibringel-Gewicht

In diesem Versuchsansatz wurde jeweils das aus Versuch 4 entstandene Fibringel der Samples aus den Konditionen 1-3 gewogen, um den Einfluss der unterschiedlichen Fibrinogen- und Thrombin-Konzentrationen auf das Gewicht des Fibringels zu detektieren (s. Schritt 5 in Abb. 2).

2.5.6 Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität

In Versuch 6 wurde die Release-Rate bei maximaler Inkubations- und Retentionszeit gemessen.

Dazu wurde die Releasezeit in Kondition 1-5 mit $t = 2 \text{ h}, 4 \text{ h}, 8 \text{ h}, 12 \text{ h}$ und 24 h variiert (s. Schritt 6 in Abb. 2 sowie rot dargestellt in Tab. 10).

Inkubiert wurde das Blut für acht Tage. Zu 1 ml HPP wurde jeweils 0,2 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin/Calcium-Lösung gegeben. Die Inkubationszeit sowie die Fibrinogen- und Thrombin-Zugabe waren somit maximal ausgeschöpft. Nach Abwarten einer maximalen Retentionszeit von 24 h wurden die Proben nach Zugabe zur PBS-Lösung auf einer Rocking-Plattform fixiert. Die jeweilige Releasezeit wurde abgewartet und danach das Fibringel aus der PBS-Lösung extrahiert.

	Kondition 1	Kondition 2	Kondition 3	Kondition 4	Kondition 5
Max. Inkuba- tionszeit 37°C	8 Tage				
Max. Fibrinogen	0,2 ml				
Max. Thrombin/Ca²⁺	0,2 ml	0, 2ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Max. Retentionszeit	24 h				
Releasezeit	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h

Tab. 10: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 6

2.6 Statistische Methoden

Jeder experimentelle Ansatz wurde dreimal durchgeführt ($n = 3$). Die Daten wurden als Mittelwert (M) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die grafische Abbildung erfolgte in Kurven- und Balkendiagrammen, die Fehlerindikatoren zeigen jeweils die Standardabweichung. Für die Auswertung wurden statistische Analysen herangezogen. Bei einem Vergleich der Mittelwerte von maximal zwei Gruppen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Analyse von mehr als zwei Gruppen diente eine einfaktorielle Varianzanalyse, eine sog. oneway ANOVA. Für die statistische Analyse der Ergebnisse des sechsten Versuches (Effekt der Releasezeit) wurde eine repeated measures ANOVA oder auch einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung verwendet, da es sich in diesem Fall um abhängige Stichproben handelt. Das Konfidenzintervall für einen Fehler 1. Art wurde jeweils auf 5% ($\alpha = 0,05$) festgelegt. Das entspricht einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05 = 5\%$. Das Signifikanzniveau gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an. Ein statistisch signifikantes Ergebnis liegt dann vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 5% ist ($p < 0,05$). Gekennzeichnet wurde dies in der Grafik jeweils mit einem Stern *. Wenn dies nicht zutraf (p größer als 5%, $p > 0,05$), musste von einem nicht signifikanten Ergebnis ausgegangen werden. Alle genauen Zahlenwerte wurden im Anhang tabellarisch zusammengefasst. Die grafischen Darstellungen sind mit dem Softwarepaket Excel für Mac entstanden, die statistische Analyse wurde mit Hilfe der SPSS 22 und 24 Software für Mac durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration

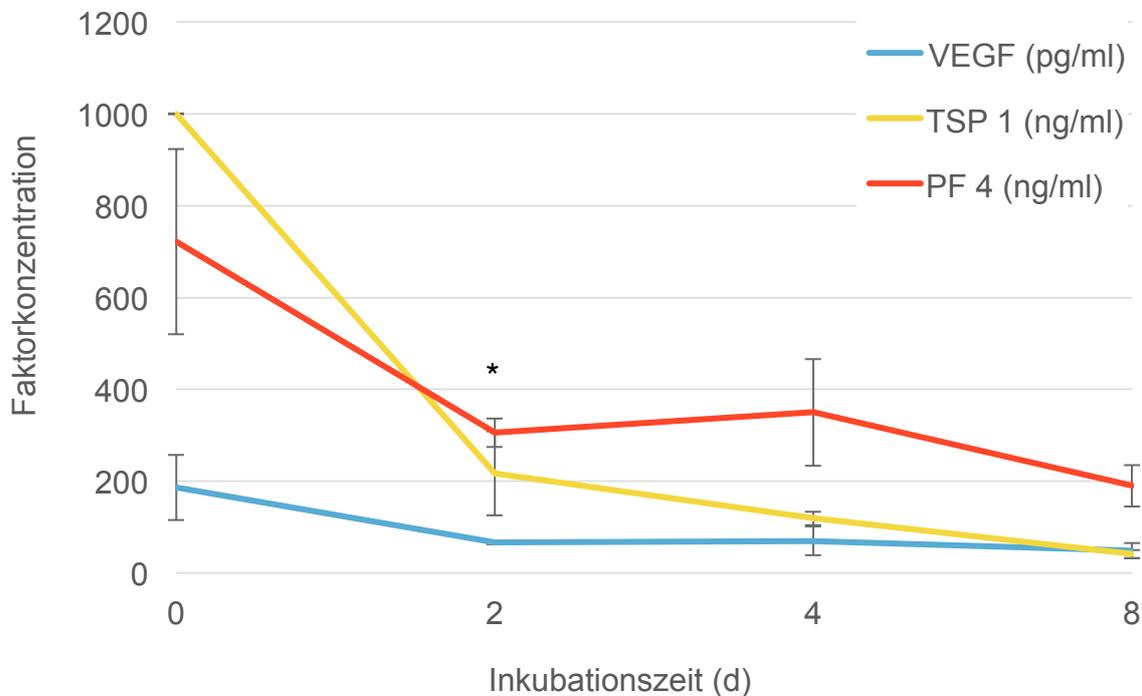


Abb. 9: Einfluss der Inkubationszeit auf die Faktoren-Konzentration im Releasate

Dargestellt ist die Konzentration von VEGF, TSP1 und PF4 im Fibrinmatrix-Releasate bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Inkubiert wurde antikoaguliertes Blut unter Hypoxie für jeweils 0 (ca. 4 h) Tage, 2 Tage, 4 Tage sowie 8 Tage bei 37 °C (jeweils 3 Samples, n = 3). Die Fibrinmatrix (ca. 300 mg) wurde bei 37 °C im HPP für 24 h inkubiert (Retentionszeit 24 h), anschließend in neuem Medium (PBS) zentrifugiert und im Releasate die Konzentration der Faktoren gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung als Fehlerindikatoren. Beachte: Zum Zeitpunkt von 0 h wurde für die Konzentration von TSP1 der Höchstwert der Standardkurve zum Vergleich herangezogen, da nicht in den Messbereich getroffen wurde („overflow“). Der Wert von 1000 ng/ml stellt somit den kleinsten möglichen Wert dar, den die Konzentration annehmen kann. Der reale Wert wird sicher darüber liegen. Deshalb ist in diesem Fall die SD auch 0. Da zum Zeitpunkt 0 d bei TSP1 nicht in den Messbereich getroffen wurde, ist eine statistische Analyse eigentlich nicht zulässig. Um jedoch die anderen Zeitpunkte auszuwerten, wurden bei kleinen Fallzahlen (n = 3) die Werte zum Zeitpunkt 0 d dennoch in die Analyse miteinbezogen. Wenn man die Zeitpunkte 0 d, 2 d, 4 d und 8 d miteinander vergleicht, zeigt sich eine statistische Signifikanz zwischen der TSP1-Konzentration zum Zeitpunkt von * 2 d vs. 8 d, p = 0,007.

Im Vergleich zur Konzentration von VEGF, die sich mit verlängerter Inkubationszeit nicht merklich verändert, verringerte sich die Konzentration des Faktors TSP1 bei verlängerter Inkubationszeit. Am deutlichsten war die Abnahme um fast 80 % zu Beginn der Inkubationsperiode (vgl. TSP1, Zeitpunkt 0 Tage: $M = 1000,00$ $SD = 0,00$ und Zeitpunkt 2 Tage: $M = 217,13$, $SD = 91,53$). Im weiteren Verlauf wurde die Konzentration im Releasate immer geringer. Beim Vergleich der Mittelwerte fiel ein

abnehmender Trend auf. Nach acht Inkubationstagen war noch eine Konzentration von ca. 40 ng/ml messbar ($M = 41,33$, $SD = 8,99$), was ungefähr einem Anteil von 4 % des Ausgangswertes bei null Tagen entspricht. Da zum Zeitpunkt 0 d bei TSP1 nicht in den Messbereich getroffen wurde, ist eine statistische Analyse eigentlich nicht zulässig. Um jedoch die anderen Zeitpunkte auszuwerten, wurden die Werte zum Zeitpunkt 0 d dennoch in die Analyse miteinbezogen, da sich ein Ausklammern bei sehr kleiner Fallzahl ($n = 3$) im Ergebnis evtl. bemerkbar machen würde. Um eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen Inkubationszeitpunkten für den Faktor TSP1 zu untersuchen, wurde eine einfaktorielle ANOVA mit dem Inkubationszeitpunkt als Faktor (vier Stufen: 0 d, 2 d, 4 d, 8 d) durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Varianzhomogenität überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Insgesamt ergab sich ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied mit $F(3, 11) = 271,205$, $p < 0,001$. Die Post-hoc-Untersuchungen ergaben, dass die Konzentrationen für TSP1 zum Zeitpunkt 2 d und 8 d signifikant voneinander abweichen ($p = 0,007$, s. * im Schaubild).

Ebenfalls war zu Beginn eine Abnahme der Konzentration von PF4 zu sehen, wenn auch nicht so ausgeprägt (vgl. PF4, Zeitpunkt 0 Tage: $M = 721,57$, $SD = 201,65$ und Zeitpunkt 2 Tage: $M = 305,30$, $SD = 30,78$). Dies entspricht ungefähr einer Abnahme um 60 %. Im zeitlichen Verlauf pendelten sich die Werte auf einem stabilen Niveau ein.

3.2 Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibringel-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe

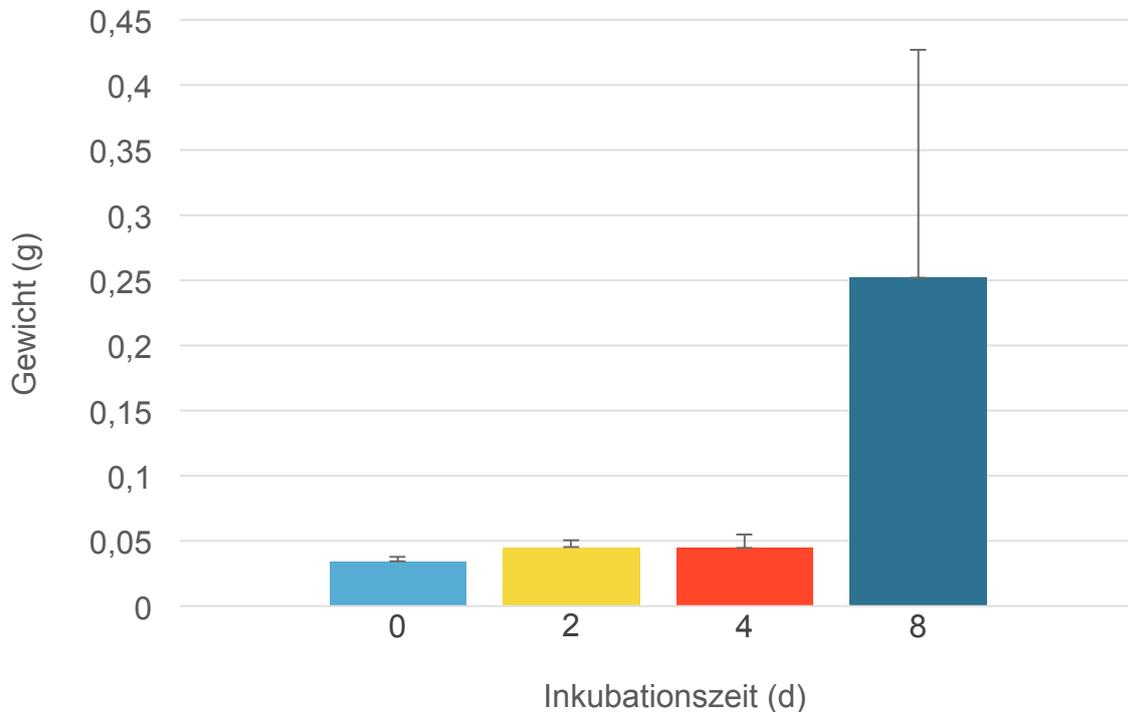


Abb. 10: Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibringel-Gewicht

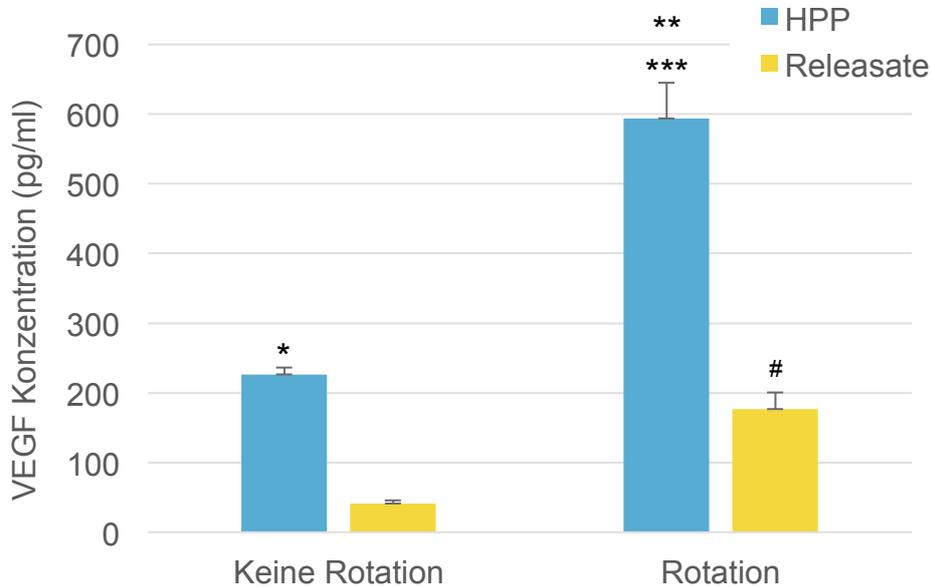
Dargestellt ist das Gewicht der entstandenen Fibrinmatrix im Vergleich zu verschiedenen Inkubationszeiten. Das antikoagulierte Blut wurde bei 37 °C für 0 Tage, 2 Tage, 4 Tage und 8 Tage inkubiert (jeweils 3 Samples, $n = 3$). Durch Zugabe von Thrombin/ Ca^{2+} formierte sich eine Fibringel-Matrix. Auf eine weitere Zugabe von Fibrinogen wurde verzichtet. Anschließend wurde das formierte Fibringel 5 min im HPP inkubiert, im neuen Medium zentrifugiert und das Gewicht gemessen. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an.

In diesem Diagramm ist das Gewicht der Fibrinmatrix gegen verschiedene Inkubationszeiten aufgetragen. Eine Zugabe von Fibrinogen fand nicht statt.

Das Gewicht zeigte stabile Werte im Bereich von ca. 50 mg (0 Tage: $M = 0,03$, $SD = 0,00$; 2 Tage: $M = 0,05$, $SD = 0,01$; 4 Tage: $M = 0,05$, $SD = 0,01$). Bei einer Inkubationszeit von 8 Tagen wurden sehr viel höhere Werte im Mittel gemessen: $M = 0,25$, $SD = 0,17$. Beim genauen Betrachten scheint dies jedoch durch das Vorliegen zweier Ausreißer bedingt zu sein.

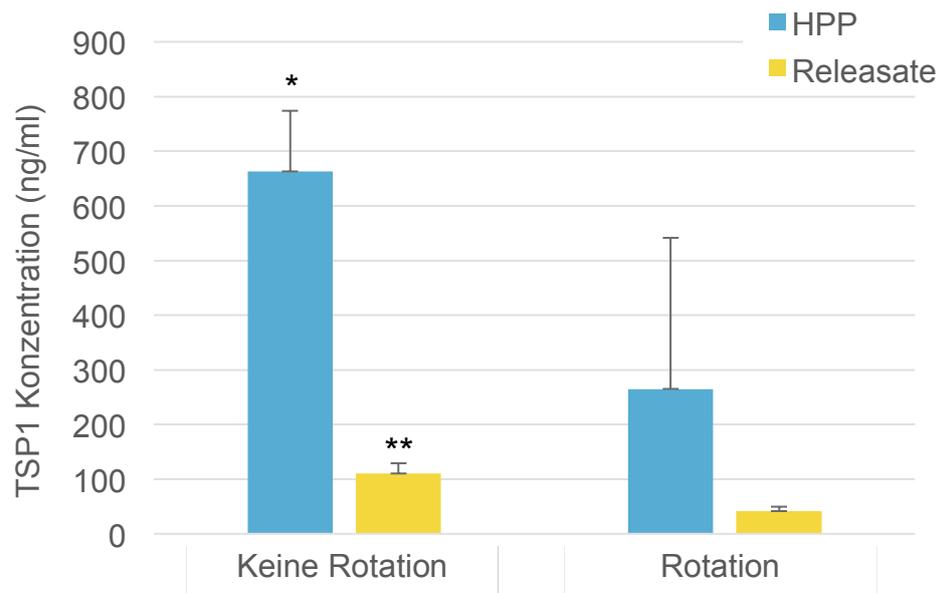
3.3 Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP

A



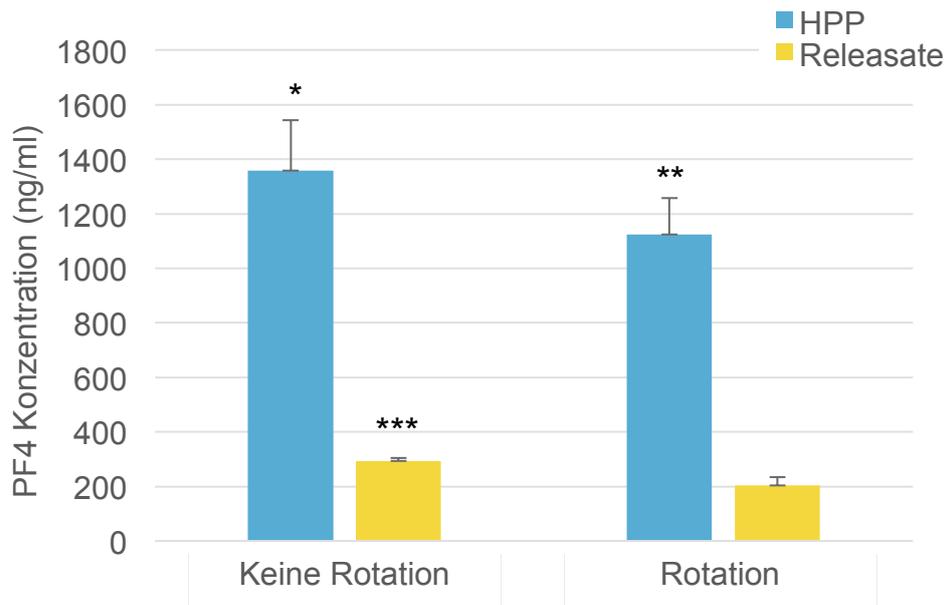
A * VEGF Konzentration ohne Rotation: HPP vs. Releasate, statistisch signifikant mit $p < 0,001$, ** VEGF Konzentration bei Rotation: HPP vs. Releasate, statistisch signifikant mit $p < 0,001$, *** VEGF Konzentration im HPP: Rotation vs. keine Rotation, statistisch signifikant mit $p = 0,005$, # VEGF Konzentration im Releasate: Rotation vs. keine Rotation, statistisch signifikant mit $p = 0,008$.

B



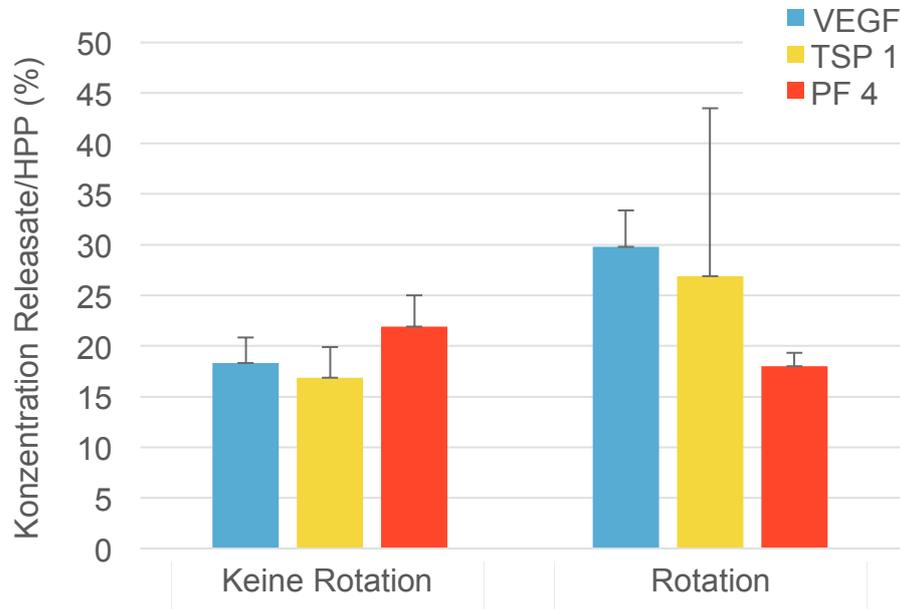
B * TSP1 Konzentration bei keiner Rotation: HPP vs. Releasate, statistisch signifikant mit $p = 0,011$, ** TSP1 Konzentration im Releasate: Rotation vs. keine Rotation statistisch signifikant mit $p = 0,004$.

C



C * PF4 Konzentration bei keiner Rotation: HPP vs. Releasate, statistisch signifikant mit $p = 0,001$, ** PF4 Konzentration bei Rotation: HPP vs. Releasate, statistisch signifikant mit $p < 0,001$, *** PF4 Konzentration im Releasate: Rotation vs. keine Rotation, statistisch signifikant mit $p = 0,009$.

D



D Verhältnis der Faktorenkonzentration im Releasate zur Faktorenkonzentration im HPP bei Rotation im Vergleich zu keiner Rotation. Fehlerindikatoren zeigen jeweils die Standardabweichung an.

Abb. 11: Einfluss von Rotation auf die Faktoren-Konzentration im Releasate/HPP

A-C Einfluss von Rotation auf die Konzentration von VEGF (A), TSP1 (B) und PF4 (C) im Releasate bzw. im HPP. Das antikoagulierte Blut wurde für 4 Tage bei 37 °C unter Hypoxie inkubiert (jeweils 3 Samples für jeden Ansatz; n = 3). Die Bewegung der Tubes beim jeweiligen Ansatz „Rotation“ wurde durch einen Rotator während der Inkubationszeit sichergestellt. Anschließend wurde die Konzentration der Faktoren im HPP direkt gemessen (jeweils blauer Balken). Nach Herstellung der Fibrinmatrix aus dem restlichen HPP wurde diese für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend in neuem Medium zentrifugiert. Die Konzentration der Faktoren wurde anschließend im Releasate gemessen (jeweils gelber Balken). Mit dem t-Test wurden alle Mittelwerte auf Signifikanz verglichen.

A) Im Diagramm dargestellt ist die Konzentration von VEGF im Releasate und im HPP zum einen bei kontinuierlicher Rotation während der Inkubationszeit, zum anderen bei nicht vorhandener Rotation.

Vergleich der Konzentrationen von HPP und Releasate:

Die Konzentration von VEGF war im HPP um fast das Fünffache höher (vgl. Konzentration in pg/ml, „keine Rotation“, HPP: $M = 226,57$, $SD = 10,22$) als im Releasate (Releasate: $M = 41,37$, $SD = 4,64$). Um einen eventuellen Unterschied zwischen den verschiedenen Ausgangsstoffen (HPP und Releasate) sowie den Verfahrensweisen („Rotation“ und „keine Rotation“) zu überprüfen, wurden jeweils unabhängige t-Tests durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Es ergab sich im t-Test ein signifikanter Unterschied (s. * mit $t(4) = 28,576$, $p < 0,001$).

Bei Rotation zeigte die Konzentration von HPP im Gegensatz zum Releasate einen ca. dreifach höheren Wert an (vgl. HPP: $M = 593,73$, $SD = 51,19$; Releasate: $M = 176,77$, $SD = 23,79$). Die Bedingung der Varianzhomogenität ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Es wurde ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied im t-Test für unabhängige Stichproben nachgewiesen (s. ** $t(4) = 12,794$, $p < 0,001$).

Vergleich der Verfahrensweisen „keine Rotation“ und „Rotation“:

Vergleicht man nun die Ergebnisse des Ansatzes „Rotation“ mit denen des Ansatzes „keine Rotation“ zeigte sich eine Konzentrationserhöhung von VEGF sowohl im HPP als auch im Releasate. Wenn man z.B. die Werte für das HPP vergleicht, zeigte sich eine dreifache Steigerung auf ca. 600 pg/ml (HPP „keine Zellbewegung“: $M = 226,57$, $SD = 10,22$; HPP „Zellbewegung“: $M = 593,73$, $SD = 51,19$).

Im Releasate war die Konzentration bei Rotation ebenfalls gesteigert auf ca. 180 pg/ml (Releasate „keine Rotation“: $M = 41,37$, $SD = 4,64$; Releasate „Rotation“: $M = 176,77$, $SD = 23,79$). Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist jeweils nicht erfüllt (Levene $p = 0,034$ für Releasate und $p = 0,036$ für HPP). Deshalb wird entsprechend die in den t-Test integrierte Korrektur eingesetzt.

Die Konzentrationen unterschieden sich jeweils statistisch signifikant (s. *** HPP: $t(2,159) = -12,182$, $p = 0,005$; s. # Releasate: $t(2,152) = -9,677$, $p = 0,008$).

B) Dargestellt im Schaubild ist die TSP1-Konzentration im Releasate und im HPP ebenfalls sowohl bei Rotation als auch bei nicht vorhandener Bewegung.

Vergleich der Konzentrationen von HPP und Releasate:

Die Konzentrationswerte für HPP waren wieder jeweils höher als im Releasate. TSP1 war im HPP ca. sechsfach höher konzentriert als im Releasate, wenn die Zellen nicht bewegt wurden (vgl. Konzentration von TSP1 in ng/ml, „keine Rotation“ HPP: $M = 663,07$, $SD = 110,64$; Releasate: $M = 110,33$, $SD = 18,37$). Um einen eventuellen Unterschied zwischen den verschiedenen Ausgangsstoffen (HPP und Releasate) sowie den Verfahrensweisen („Rotation“ und „keine Rotation“) zu überprüfen, wurden jeweils unabhängige t-Tests durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist nicht erfüllt (Levene $p = 0,033$). Entsprechend wird die in den t-Test integrierte Korrektur eingesetzt. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied (s. * mit $t(2,110) = 8,536$, $p = 0,011$).

Bei dem Versuchsansatz „Rotation“ ergab sich ebenfalls eine sechsfach höhere Konzentration von TSP1 im HPP ($M = 265,13$, $SD = 276,20$) als im Releasate ($M = 41,60$, $SD = 7,69$). Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist nicht erfüllt (Levene $p = 0,018$). Entsprechend wird die in den t-Test integrierte Korrektur eingesetzt. Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ($t(2,003) = 1,401$, $p = 0,296$).

Vergleich der Verfahrensweisen „keine Rotation“ und „Rotation“:

Es zeigte sich im Vergleich zu Abb. A (VEGF) eine Konzentrationsminderung bei Rotation. Die Werte der TSP1-Konzentration für das Releasate („keine Rotation“ $M = 110,33$, $SD = 18,37$ vs. „Rotation“ $M = 41,60$, $SD 7,69$) waren bei Bewegung um ca. 50 % geringer. Wenn man die Konzentrationen für das HPP vergleicht, ergab sich ebenfalls eine Konzentrationsminderung im Versuchsansatz „Rotation“ („keine Rotation“ $M = 663,07$, $SD = 110,64$ vs. „Rotation“ $M = 265,13$, $SD 276,20$). Um einen eventuellen Unterschied zwischen den verschiedenen Verfahrensweisen (jeweils für HPP und Releasate) zu überprüfen, wurden jeweils unabhängige t-Tests durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied für die Verfahrensweisen „keine Rotation“ und „Rotation“ für die Konzentration von TSP1 im Releasate mit $t(4) = 5,978$, $p = 0,004$, s. **. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahrensweisen bei Betrachtung der Konzentration von TSP1 im HPP konnte jedoch nicht nachgewiesen werden ($t(4) = 2,317$, $p = 0,081$).

C) Im Diagramm wird die Konzentration für PF4 sowohl im Releasate als auch im HPP jeweils bei Rotation oder keiner Rotation dargestellt. Es ist ein ähnlicher Verlauf wie in Abb. B (TSP1) zu erkennen.

Vergleich der Konzentrationen von HPP und im Releasate:

Die Konzentration von PF4 war im HPP deutlich höher als im Releasate.

Die Konzentration von PF4 nahm im HPP einen Wert von ungefähr 1400 ng/ml an ($M = 1357,32$, $SD = 186,88$), das Releasate enthielt nur noch ca. 300 ng/ml PF4 ($M = 293,42$, $SD = 10,09$), was ungefähr einer fünffachen Abnahme entspricht. Es wurden wiederum t-Tests durchgeführt, um eventuelle Differenzen zu untersuchen. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist bei Betrachtung der Konzentration von PF4 ohne Rotation nicht erfüllt (Levene $p = 0,026$). Entsprechend wird die in den t-Test integrierte Korrektur angewendet. Insgesamt ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration von PF4 im HPP und Release für „keine Rotation“ (s. * $t(2,012) =$

9,846, $p = 0,01$). Analog konnte dies auch auf die Werte bei Rotation übertragen werden.

Im HPP war PF4 deutlich höher konzentriert ($M = 1123,72$, $SD = 134,54$) als im Releasate ($M = 202,53$, $SD = 31,45$). Das Releasate enthielt nur noch ca. 20 % der Konzentration an PF4 im HPP. Die Bedingung der Varianzhomogenität ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Es zeigte sich, dass sich die Konzentrationen von PF4 im HPP und Releasate signifikant auch bei Rotation unterscheiden (s. ** mit $t(4) = 11,548$, $p < 0,001$).

Vergleich der Verfahrensweisen „keine Rotation“ und „Rotation“:

Um eine Auswirkung der verschiedenen Versuchsvorgänge „keine Rotation“ und „Rotation“ darzustellen, wurden wiederum die Konzentrationswerte von PF4 im HPP und im Releasate miteinander verglichen. Bei Bewegung war die PF4-Konzentration im HPP ($M = 1123,72$, $SD = 134,54$) etwas geringer als im Versuchsansatz ohne Rotation ($M = 1357,32$, $SD = 186,88$). Um mögliche Differenzen zu untersuchen, wurde jeweils wieder ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Varianzhomogenität überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Insgesamt wurde jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen mit $t(4) = 1,757$, $p = 0,154$.

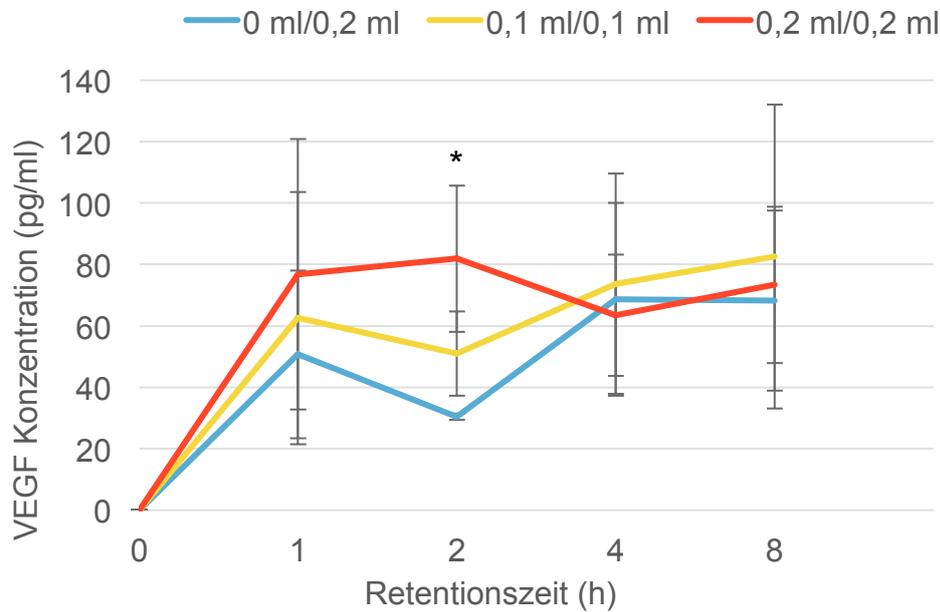
Ähnlich verhielt es sich bei Betrachtung der Konzentrationen im Releasate („Rotation“ $M = 202,53$, $SD = 31,45$ vs. „keine Rotation“ $M = 293,42$, $SD = 10,09$). Die Bedingung der Varianzhomogenität ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bei Betrachtung der Verfahrensweisen „Rotation“ und „keine Rotation“ mit $t(4) = 4,766$, $p = 0,009$, s. ***).

D) Im Diagramm werden jeweils die Konzentrationen der Faktoren VEGF, TSP1 und PF4 in einem Verhältnis dargestellt. Der Quotient setzt sich aus den Mittelwerten der Konzentrationen im Releasate sowie im HPP zusammen und wird sowohl für den Versuchsansatz „Rotation“ als auch für die Verfahrensweise „keine Rotation“ abgebildet.

Es zeigte sich, dass ungefähr 20 % der Faktoren letztendlich im Releasate vorhanden sind. Die Bewegung im Versuchsansatz schien dabei keine Rolle zu spielen.

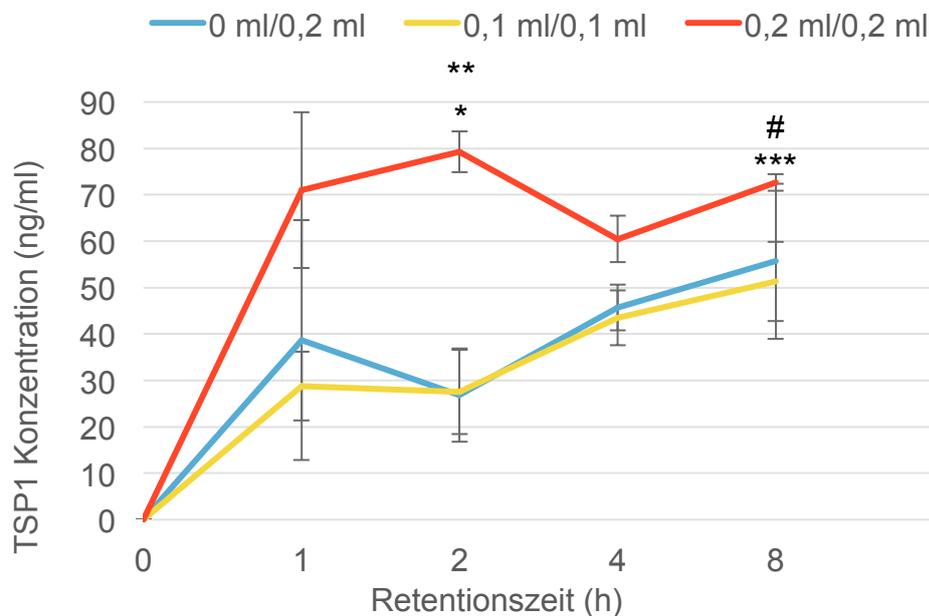
3.4 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei versch. Retentionszeiten

A



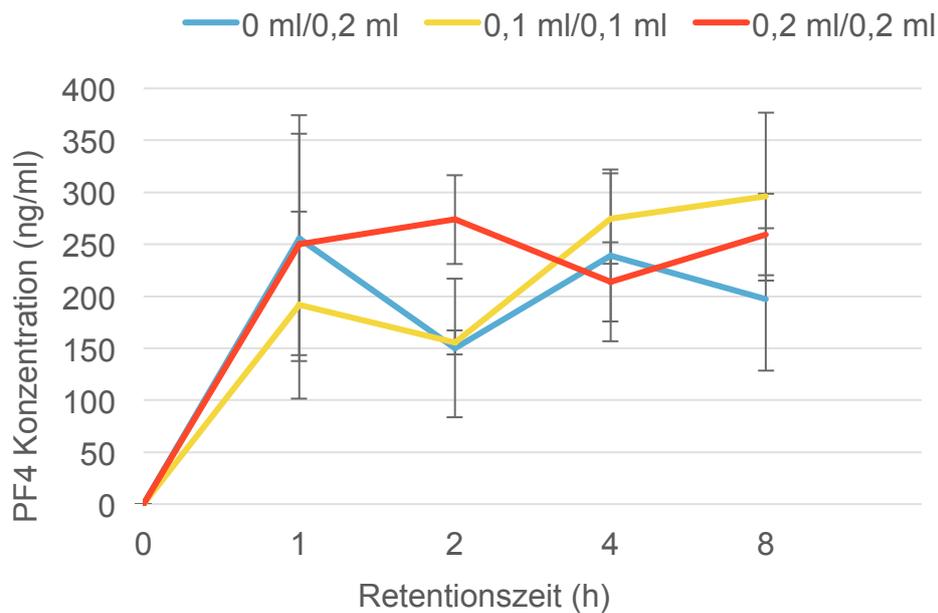
A * VEGF-Konzentration bei 2 h, 0 ml/0,2 ml vs. 0,2 ml/0,2 ml statistisch signifikant mit $p = 0,017$.

B



B * TSP1-Konzentration bei 2 h, 0 ml/0,2 ml vs. 0,2 ml/0,2 ml statistisch signifikant mit $p = 0,001$; ** TSP1-Konzentration bei 2h, 0,1 ml/0,1 ml vs. 0,2 ml/0,2 ml statistisch signifikant mit $p = 0,001$; *** TSP1-Konzentration bei Zugabe von 0,1 ml Fibrinogen und Thrombin, 1 h vs. 8 h signifikant mit $p = 0,032$; # TSP1-Konzentration bei Zugabe von 0,1 ml Fibrinogen und Thrombin, 2 h vs. 8 h signifikant mit $p = 0,025$.

C



C Es wurde kein signifikanter Gruppenunterschied zwischen den verschiedenen Zugaben nachgewiesen bei einer Retentionszeit von 2 h.

Abb. 12: Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate

A-C Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten (A: VEGF, B: TSP1, C: PF4). Das antikoagulierte Blut wurde für 8 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das HPP extrahiert und verschiedene Mengen an Fibrinogen zugegeben (blau: 0,2 ml Thrombin, gelb: 0,1 ml Fibrinogen und 0,1 ml Thrombin, rot: 0,2 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin). Das entstandene Fibrinigel wurde unterschiedlich lang im HPP bei 37 °C inkubiert, s. Retentionszeiten 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, anschließend im neuen Medium zentrifugiert und die Konzentration der Faktoren mittels ELISA im Releasate bestimmt; Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an. Hinweis: Die Bindung der Faktoren wurde nicht durch ihre Verfügbarkeit im Plasma begrenzt.

Um den Effekt der Fibrinmasse auf die Faktorenkonzentration im Releasate zu überprüfen, wurden unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin/ Ca^{2+} zum Plasma hinzugegeben. Durch eine vermehrte Zugabe von Fibrinogen und Thrombin/ Ca^{2+} vergrößerte sich die Fibrinmatrix (s. auch Experiment 5).

Grafisch dargestellt wird der Einfluss der Fibrinigel-Masse auf die Konzentration der Faktoren im Releasate bei unterschiedlichen Retentionszeiten.

A) Im Schaubild ist die Konzentration von VEGF im Releasate abgebildet, nachdem unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin zugegeben wurden (blau: 0,2 ml Thrombin und kein Fibrinogen, gelb: 0,1 ml Fibrinogen/Thrombin, rot: 0,2 ml Fibrinogen/Thrombin) und die entstandene Matrix bei verschiedenen Zeiten

(Retentionszeit 1 h, 2 h, 4 h, 8 h; 37 °C) inkubiert wurde. Die höchste Konzentration von VEGF erhielt man bei Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin und einer Retentionszeit von 2 h ($M = 81,90$, $SD = 23,85$ [pg/ml]). Zum gleichen Zeitpunkt deutlich niedriger als die Hälfte (ca. dreifache Abnahme) war die Konzentration bei einer Zugabe von nur 0,2 ml Thrombin ($M = 30,37$, $SD = 0,98$). Um eventuelle Differenzen zwischen den Fibrinmassen bei einer Retentionszeit von 2 h zu untersuchen, wurde eine einfaktorielle ANOVA mit der Zugabe von Fibrinogen/Thrombin als Faktor (drei Stufen: 0 ml /0,2 ml, 0,1 ml /0,1 ml, 0,2 ml /0,2 ml) durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Insgesamt ergab sich ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied mit $F(2, 8) = 7,979$, $p = 0,020$. Die Post-hoc-Untersuchungen ergaben, dass sich die Konzentration von VEGF im Releasate bei einer Zugabe von 0 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin bei einer Retentionszeit von 2 h statistisch signifikant gegenüber einer Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin unterscheidet ($p = 0,017$, s *).

Darüber hinaus ließ sich kein weiterer Effekt weder durch Erhöhung der Retentionszeit noch durch Erhöhung der Fibrinogen- und Thrombinmenge feststellen. Bei allen verschiedenen Mengenzugaben zu späteren Zeitpunkten erreichte die VEGF-Konzentration im Releasate eine Plateauphase bei ca. 8 h und blieb auf stabilem Niveau.

B) In diesem Diagramm ist analog zu Schaubild A die Konzentration von TSP1 im Releasate dargestellt, nachdem unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin zugegeben wurden (blau: 0,2 ml Thrombin, gelb: 0,1 ml Fibrinogen/Thrombin, rot: 0,2 ml Fibrinogen/Thrombin) und die entstandene Matrix bei verschiedenen Zeiten (Retentionszeit 1 h, 2 h, 4 h, 8 h; 37 °C) inkubiert wurde. Ein deutlicher Effekt zeigte sich beim Retentionszeitpunkt von 2 h: Die größte Konzentration an TSP1 entstand bei Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin, wenn das Fibringel anschließend für zwei Stunden inkubiert wurde ($M = 79,27$, $SD = 4,39$ [ng/ml]). Die Konzentration von TSP1 im Releasate war zu diesem Zeitpunkt fast viermal so groß wie bei Zugabe von weniger Fibrinogen und Thrombin ($M = 26,80$, $SD = 10,05$ bzw. $M = 27,53$, $SD = 9,12$). Um eventuelle Differenzen zwischen den Fibrinmassen bei einer Retentionszeit von 2 h zu untersuchen, wurde

eine einfaktorielle ANOVA mit der Zugabe von Fibrinogen/Thrombin als Faktor (drei Stufen: 0 ml /0,2 ml, 0,1 ml /0,1 ml, 0,2 ml /0,2 ml) durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Insgesamt ergab sich ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied mit $F(2, 8) = 39,997$, $p < 0,001$. In den Post-hoc-Untersuchungen weichen die Zugaben von 0 ml /0,2 ml und 0,2 ml /0,2 ml sowie 0,1 ml /0,1 ml und 0,2 ml /0,2 ml voneinander ab (s. * 0 ml /0,2 ml vs. 0,2 ml /0,2 ml statistisch signifikant mit $p = 0,001$; ** 0,1 ml /0,1 ml vs. 0,2 ml /0,2 ml statistisch signifikant mit $p = 0,001$).

Bei Betrachtung des Diagramms zeigt sich des Weiteren ein Anstieg der Konzentration von TSP1 bei verlängerten Retentionszeiten, wenn weniger Fibrinogen zugegeben wurde (Schaubild blau und gelb). Es wurde eine einfaktorielle ANOVA mit der Retentionszeit als Faktor (vier Stufen: 1 h , 2 h , 4 h und 8 h) für die Konzentrationen 0 ml /0,2 ml und 0,1 ml /0,1 ml durchgeführt, um eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen Retentionszeiten zu untersuchen. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist bei der Zugabe von 0 ml /0,2 ml nicht erfüllt (Levene $p = 0,033$). In diesem Fall wird die robustere Welch-ANOVA zur Auswertung herangezogen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Retentionszeiten bei einer Zugabe von 0 ml /0,2 ml Fibrinogen/Thrombin mit $F(3, 3,887) = 2,608$, $p = 0,192$. Die Bedingung der Varianzhomogenität war bei den Werten für die Zugabe von 0,1 ml Fibrinogen und 0,1 ml Thrombin erfüllt (Levene $p > 0,05$). Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Retentionszeiten mit $F(3, 11) = 6,516$, $p = 0,015$. Die Retentionszeiten 1 h und 8 h sowie 2 h und 8 h wichen signifikant voneinander ab (s. *** 1 h vs. 8 h statistisch signifikant mit $p = 0,032$; # 2 h vs. 8 h statistisch signifikant mit $p = 0,025$).

Wenn jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin zum Plasma gegeben werden, zeigten sich im Verlauf der Retentionszeit stabile Werte (rotes Schaubild). Ein deutlicher Anstieg jedoch fehlte.

C) Im Diagramm ist vergleichbar mit Schaubild A (VEGF) und B (TSP1) die Konzentration von PF4 im Releasate dargestellt, nachdem unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin zum HPP gegeben wurden (blau: 0,2 ml Thrombin, gelb:

0,1 ml Fibrinogen/Thrombin, rot: 0,2 ml Fibrinogen/Thrombin) und das entstandene Fibrinigel bei verschiedenen Zeiten (Retentionszeit 1 h, 2 h, 4 h, 8 h; 37 °C) inkubiert wurde. Entsprechend ließ sich ebenfalls ein deutlicher Effekt nach einer Retentionszeit von 2 h feststellen. Die Konzentration bei Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin war deutlich höher ($M = 273,87$, $SD = 42,86$ [ng/ml]) als wenn weniger zugegeben wurde. Um eventuelle Differenzen zwischen den Fibrinmassen bei einer Retentionszeit von 2 h zu untersuchen, wurde eine einfaktorielle ANOVA mit der Zugabe von Fibrinogen/Thrombin als Faktor (drei Stufen: 0 ml /0,2 ml, 0,1 ml /0,1 ml, 0,2 ml /0,2 ml) durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist nicht erfüllt (Levene $p = 0,044$). Entsprechend wird die robustere Welch-ANOVA zur Auswertung herangezogen. Es ergab sich insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Welch-Test mit $F(2, 2,915) = 8,733$, $p > 0,059$.

Bei Betrachtung der Messwerte bei einer Zugabe von jeweils 0,1 ml Fibrinogen und Thrombin fiel ein Anstieg der Konzentration durch eine verlängerte Retentionszeit auf. Insgesamt erreichte die PF4-Konzentration im Releasate eine Plateauphase bei ca. 8 h und blieb auf stabilem Niveau.

3.5 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf das Fibringel-Gewicht

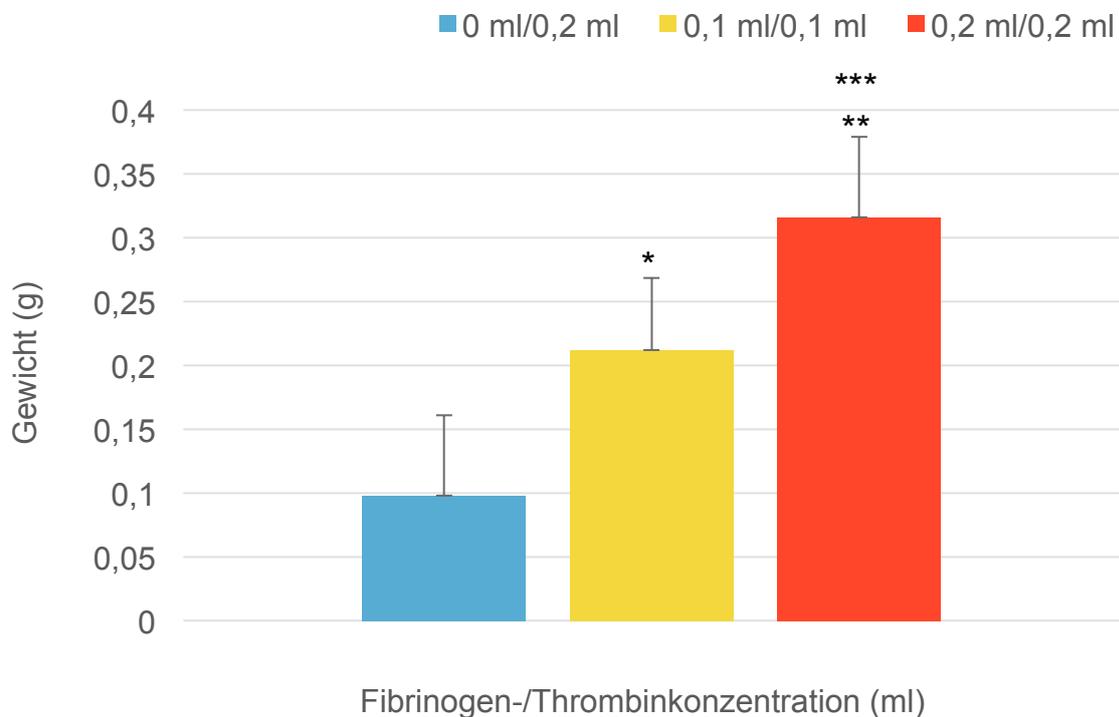


Abb. 13: Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf das Fibringel-Gewicht

Das antikoagulierte Blut wurde für 8 Tage bei 37 °C inkubiert und das HPP extrahiert. Es wurden unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin hinzugegeben (blau: 0,2 ml Thrombin, gelb: jeweils 0,1 ml Fibrinogen und Thrombin, rot: jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin). Die entstandene Matrix wurde ebenfalls wieder inkubiert, in neuem Medium zentrifugiert und anschließend gewogen. Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an. * Gewicht des Fibringels, 0 ml/0,2 ml vs. 0,1 ml /0,1 ml statistisch signifikant mit $p < 0,001$; ** 0 ml /0,2 ml vs. 0,2 ml /0,2 ml signifikant mit $p < 0,001$; *** 0,1 ml / 0,1 ml vs. 0,2 ml /0,2 ml signifikant mit $p = 0,001$.

Im Diagramm ist der Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Gewicht der Fibrinmatrix dargestellt. Zum HPP, das zuvor aus acht Tage bei 37 °C inkubiertem Blut gewonnen wurde, wurden unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin hinzugegeben (s. Abb.). Mit zunehmender Menge an Fibrinogen und Thrombin ließ sich ein fast proportionaler Anstieg des Fibringel-Gewichtes zeigen. Bei Zugaben von jeweils 0,2 ml hat sich das Gewicht der Matrix von ca. 0,1 g auf ca. 0,3 g verdreifacht (vgl. $M = 0,10$, $SD = 0,06$ vs. $M = 0,32$, $SD = 0,06$). Je mehr Fibrinogen und Thrombin zum Plasma hinzugegeben wurden, desto größer wurden Gewicht und Masse der Matrix. Zugaben von 0 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin brachten ein Fibringerinnsel von ca. 100 mg hervor, wohingegen die Fibrinmatrix ein

Gewicht von ca. 200 mg aufwies, wenn jeweils 0,1 ml zugegeben wurden. Ca. 300 mg wurden erreicht, wenn jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin zum HPP hinzugegeben wurden. Um eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen Gewichtsangaben statistisch zu untersuchen, wurde eine einfaktorielle ANOVA mit der Zugabe von Fibrinogen und Thrombin als Faktor (drei Stufen: 0 ml /0,2 ml, 0,1 ml /0,1 ml, 0,2 ml /0,2 ml) durchgeführt. Als Teil des Verfahrens wurden die Gruppen auf Homogenität der Varianzen überprüft. Diese Bedingung ist erfüllt (Levene $p > 0,05$). Insgesamt ergab sich für die Masse der Fibrinmatrix ein signifikanter Unterschied bei verschiedenen Zugaben von Fibrinogen und Thrombin mit $F(2, 35) = 38,241$, $p < 0,001$. Die Post-hoc-Untersuchungen ergaben, dass sich das Gewicht bei Zugaben von 0 ml /0,2 ml jeweils von den anderen Konzentrationen unterscheidet (jeweils $p < 0,001$, s. * und **). Zudem weicht das Gewicht bei Konzentrationen von 0, 1 ml/0,1 ml und 0,2 ml /0,2 ml statistisch signifikant voneinander ab ($p = 0,001$, s. *).

Bei Betrachtung der folgenden Abbildung wird der Massenunterschied auch visuell deutlich.

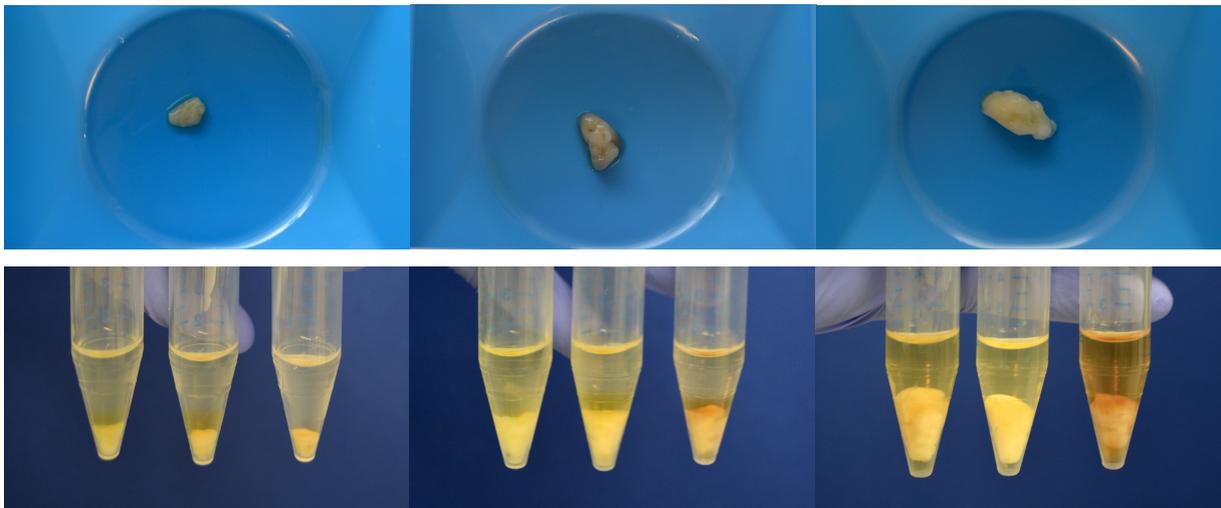
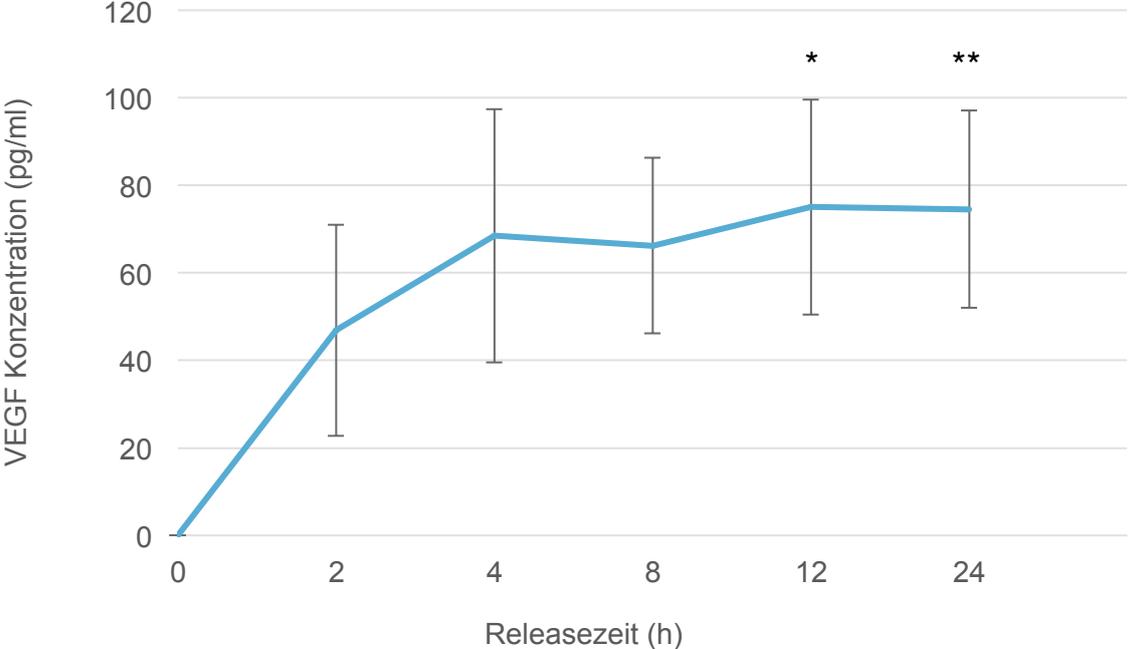


Abb. 14: Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf die Masse der Fibrinmatrix

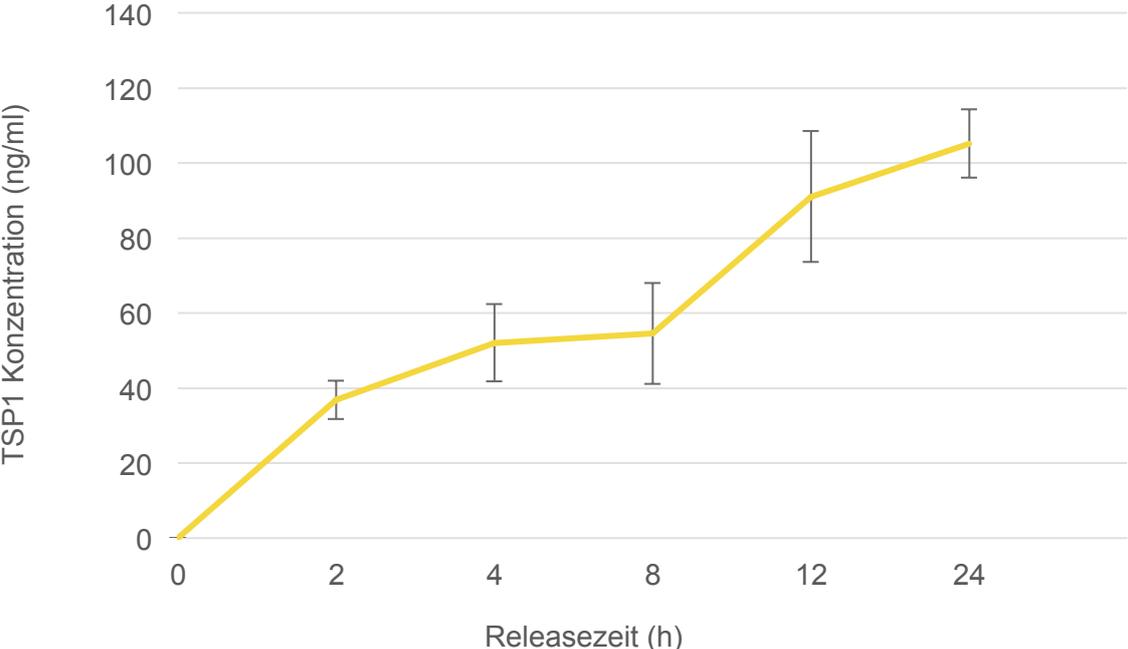
Es zeigte sich eine deutliche Zunahme bei steigender Konzentration sowohl in der Waagschale als auch im Reagenzglas, das nach der Zentrifugation das PBS noch enthielt (links: 0 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin bei einem Gewicht von ca. 100 mg, Mitte: jeweils 0,1 ml Fibrinogen und Thrombin bei einem Gewicht von ca. 200 mg, rechts: jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin bei einem Gewicht von ca. 300 mg.).

3.6 Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität

A



B



C

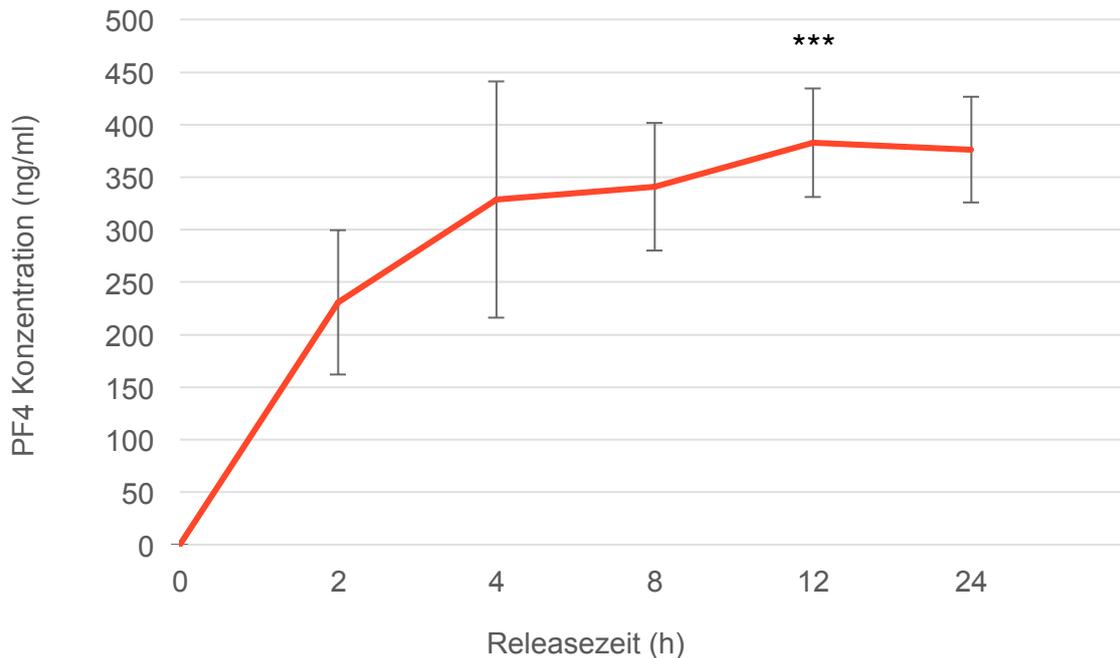


Abb. 15: Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate

Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration von VEGF (blau), TSP1 (gelb) und PF4 (rot) im Releasate. Dabei wurde das antikoagulierte Blut bei 37 °C für acht Tage unter Hypoxie inkubiert, anschließend jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin zugegeben und das zellfreie Fibrinigel für 24 h bei 37 °C im Plasma inkubiert. Die Fibrinmatrix wurde in neuem Medium für 2 h, 4 h, 8 h, 12 h oder 24 h auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur fixiert. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an. * VEGF-Konzentration, 2 h vs. 12 h statistisch signifikant mit $p = 0,049$; ** VEGF-Konzentration, 2 h vs. 24 h statistisch signifikant mit $p = 0,017$; *** PF4-Konzentration, 2 h vs. 12 h statistisch signifikant mit $p = 0,042$.

Im Diagramm ist jeweils der Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate dargestellt, jeweils ein Kurvenverlauf für die Faktoren VEGF (blau), TSP1 (gelb) und PF4 (rot).

Die Inkubationszeit betrug acht Tage. Zum HPP wurden danach jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin zugegeben, die Retentionszeit wurde für 24 h festgelegt.

A) Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der Konzentration von VEGF fällt auf, dass eine Plateauphase schon früh zum Zeitpunkt von 4 h erreicht wurde. Ein weiterer Anstieg der Konzentration durch Verlängerung der Releasezeit blieb aus. Die Konzentration von VEGF im Releasate betrug bei 24 h ca. 70 pg/ml (vgl. Konzentration bei einer Releasezeit von 4 h $M = 68,47$, $SD = 28,90$ vs. 24h: $M = 74,53$, $SD = 22,55$). Um eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen

Releasezeiten zu untersuchen wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (fünf Levels: 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h) durchgeführt. Die im Vorfeld dieser Betrachtung durchgeführten Tests auf Normalverteilung ergaben, dass die Werte jeder einzelnen Variable (Releasezeit) normalverteilt sind (Shapiro-Wilk $p > 0,05$). Eine weitere Annahme, die zur Durchführung dieses Testverfahrens erfüllt sein muss, betrifft die Sphärizität. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl (jeweils $n = 3$) konnten Werte zur Sphärizität nicht berechnet werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der rmANOVA dargestellt und besprochen. Jedoch sollten aufgrund der nur einstelligen Fallzahl diese Werte ausschließlich als vorläufige Erkenntnisse betrachtet werden. Es zeigte sich in der rmANOVA, dass ein statistischer signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Releasezeitpunkten besteht mit $F(4, 8) = 20,880$, $p < 0,001$. Die Post-hoc-Tests ergaben einen signifikanten Unterschied der Konzentrationen von VEGF bei einer Releasezeit von 2 h und 12 h, $p = 0,049$ (s. * im Schaubild) sowie bei einer Releasezeit von 2 h und 24 h, $p = 0,017$ (s. ** im Schaubild).

B) TSP1 zeigte einen steigenden Verlauf der Konzentration bei zunehmender Releasezeit, wobei sich bei erst bei ca. 12 h eine Plateauphase einstellte. Analog zur Betrachtung bei VEGF wurde eine ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt, um eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen Releasezeiten statistisch zu untersuchen (fünf Levels: 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h). Die im Vorfeld dieser Betrachtung durchgeführten Tests auf Normalverteilung ergaben, dass die Werte jeder einzelnen Variable (Releasezeit) normalverteilt sind (Shapiro-Wilk $p > 0,05$). Eine weitere Annahme, die zur Durchführung dieses Testverfahrens erfüllt sein muss, betrifft die Sphärizität. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl (jeweils $n = 3$) konnten Werte zur Sphärizität nicht berechnet werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der rmANOVA dargestellt und besprochen. Jedoch sollten aufgrund der nur einstelligen Fallzahl diese Werte ausschließlich als vorläufige Erkenntnisse betrachtet werden. Die rmANOVA ergab in diesem Fall ein insgesamt statistisch signifikantes Ergebnis mit $F(4, 8) = 13,358$, $p = 0,001$. Die Post-hoc-Untersuchungen ergaben, dass die verschiedenen Releasezeitpunkte zwar jeweils voneinander abweichen, jedoch keine einzelne dieser Abweichungen isoliert Signifikanz erreicht (jeweils $p > 0,05$). Somit haben eine Reihe von marginaler Gruppendifferenzen zu einem insgesamt signifikanten Ergebnis geführt.

C) Im Verlauf der Konzentrationskurve von PF4 stellte sich ebenfalls erst zu einem späteren Zeitpunkt (Releasezeit von 12 h) eine Plateauphase ein. Davor war ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Analog zur Betrachtung bei VEGF und TSP1 wurde eine ANOVA mit Messwiederholung durchgeführt, um eventuelle Differenzen zwischen den verschiedenen Releasezeiten statistisch zu untersuchen (fünf Levels: 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h). Die im Vorfeld dieser Betrachtung durchgeführten Tests auf Normalverteilung ergaben, dass die Werte der Variablen 2 h, 8 h, 12 h und 24 h normalverteilt sind (Shapiro-Wilk $p > 0,05$). Die Werte für die Releasezeit von 4 h waren jedoch nicht normalverteilt, was eine Überprüfung mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab ($p = 0,042$ für die Variable 4 h). Die einfaktorielle ANOVA zeigt sich relativ robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme, v.a. wenn die Größe der Gruppen gleich ist (hier jeweils $n = 3$). Deshalb wird in diesem Fall mit den vorliegenden Daten fortgefahren, ohne Gegenmaßnahmen zu ergreifen. Eine weitere Annahme, die zur Durchführung dieses Testverfahrens erfüllt sein muss, betrifft die Sphärizität. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl (jeweils $n = 3$) konnten Werte zur Sphärizität nicht berechnet werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der rmANOVA dargestellt und besprochen. Jedoch sollten aufgrund der nur einstelligen Fallzahl diese Werte ausschließlich als vorläufige Erkenntnisse betrachtet werden. Die rmANOVA ergab in diesem Fall ein insgesamt statistisch signifikantes Ergebnis mit $F(4, 8) = 14,087$ $p = 0,001$. In den Post-hoc-Tests zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Konzentrationen von PF4 bei einer Releasezeit von 2 h und 12 h, $p = 0,042$ (s. *** im Schaubild).

Die Testverfahren in diesem Experiment wurden jeweils auf der Grundlage geschätzter Randmittel durchgeführt. Da es sich jedoch um eine ausgesprochen kleine Stichprobe handelt ($n = 3$), wurden hier ausschließlich Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Die Darstellung von geschätzten Randmitteln und Standardfehlern impliziert das Umlegen der vorliegenden Erkenntnisse auf die Gesamtpopulation. Bei vorläufigen Erkenntnissen auf der Grundlage von $n = 3$ kann ein solcher Anspruch jedoch nicht erhoben werden.

4 Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse

4.1.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration

In mehreren Studien wurde dargelegt, dass Hypoxie einen gegensätzlichen Effekt auf die Expression von pro- und anti-angiogenen Faktoren wie VEGF und TSP1 hat [60, 100]. Es wurde gezeigt, dass durch den Sauerstoffabschluss während der Inkubationszeit von PBCs die Produktion von TSP1 herunterreguliert wird, weshalb diese in niedrigerer Konzentration vorkommen als unter normalem Sauerstoffpartialdruck [38]. Zudem wurde herausgefunden, dass VEGF unter Hypoxie quantitativ jeweils mehr produziert wurde, als wenn PBCs unter einem normalen Sauerstoffdruck inkubiert wurden [38].

Beim Vergleich der zeitlichen Komponente wurde gleichermaßen gezeigt, dass die VEGF-Konzentration über eine längere Zeitspanne unter Hypoxie (als auch unter normalem Sauerstoffgehalt) gering abnimmt bzw. in etwa stabil bleibt [38, 42].

In Ergänzung dazu wurde in diesem Versuch nun die Länge der Inkubationszeit des Blutes unter Hypoxie auf die Faktorenkonzentration im Releasate einer Fibrinmatrix untersucht. Dabei wurden die PBCs im antikoagulierten Blut wie beschrieben in einem lokal induzierten hypoxischem Setting inkubiert. Über eine verlängerte Inkubationszeit konnte ein Rückgang der Faktorenkonzentration von TSP1 und PF4 detektiert werden. Eine initiale Hochregulation von TSP1 war nicht erkennbar.

Die Konzentration von TSP1 im Releasate bei einer Inkubationszeit von null Tagen (entspricht ca. 4 h) war so hoch, dass im ELISA nicht in den Messbereich getroffen wurde. Man spricht von einem sog. Overflow. Die höchsten Werte der Standardkurve wurden deshalb vergleichend herangezogen. Es handelt sich um den kleinsten möglichen Wert, den die Konzentration von TSP1 annehmen könnte, der reale Wert liegt sicher darüber.

Die Konzentrationswerte des angiogenen Faktors VEGF blieben hingegen über eine längere Inkubationsperiode stabil.

Es konnte über eine längere Zeitspanne kein Anstieg der VEGF-Konzentration gemessen werden. Durch den hypoxischen Stimulus würde man evtl. einen geringen Anstieg der VEGF-Konzentration erwarten. Womöglich ist dies darauf zurückzuführen, dass die Konzentrationsbestimmungen jeweils aus einem Releasate durchgeführt wurden. Durch die Vorgänge im Versuchsaufbau nimmt man einen

deutlichen Verlust der Faktoren in Kauf. Um eine merkliche Konzentrationszunahme von VEGF zu detektieren, hätte womöglich direkt eine Bestimmung der Konzentration im HPP nach Abwarten der Inkubationszeiten durchgeführt werden müssen (vgl. hier auch Experiment 3, in dem die Konzentrationen in unterschiedlichen Medien gemessen wurden). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass anhand der Fibrinmatrix und Untersuchung der Konzentrationen im Releasate relative Änderungen der durch Hypoxie induzierten Expression von pro- und anti-angiogenen Faktoren sichtbar gemacht werden können.

4.1.2 Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrin-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe

Untersucht wurde der Einfluss verschiedener Inkubationszeiten auf das Gewicht des Fibringels. Die Werte zeigten sich allesamt relativ stabil bei einem Mittelwert von ca. 50 mg (vgl. Gewichtsangaben für 0 Tage in Gramm: $M = 0,03$, $SD = 0,00$, 2 Tage: $M = 0,05$, $SD = 0,01$, 4 Tage: $M = 0,05$, $SD = 0,01$). Lediglich die gemessenen Gewichtsangaben bei einer Inkubationszeit von acht Tagen wichen deutlich ab. Der Mittelwert lag bei ca. 250 mg, was bei einer Verdopplung der Inkubationszeit von vier auf acht Tage zu einem Gewichtsanstieg auf das Fünffache rückschließen würde (vgl. gemessenes Gewicht für eine Inkubationszeit von vier Tagen: s.o. und acht Tagen: $M = 0,25$, $SD = 0,17$). Bei genauerer Betrachtung scheinen diese Ergebnisse durch das Vorliegen zweier Ausreißer-Werte bedingt zu sein, die jedoch durch die geringe Anzahl der Versuchsansätze ($n=3$) deutlich zum Ausdruck kommen. Demnach darf nicht von einem Gewichtsanstieg des Fibringels bei einer gewählten Inkubationszeit von acht Tagen ausgegangen werden.

Das Vorliegen derart hoher Werte ist evtl. auf fälschliches Pipettieren zurückzuführen. Eine andere Möglichkeit wäre ein Messfehler beim Wiegen. Zusätzlich ist zu beachten, dass die Matrix aus einem flüssigen Medium entnommen wird und auch nach sorgfältigem Abtupfen mehr oder weniger Flüssigkeit enthält.

In vivo zeigt das von der Leber gebildete Fibrinogen - wenn es nicht durch Thrombin im Rahmen eines Gerinnungsprozesses in Fibrin umgewandelt wird - im Plasma eine Halbwertszeit von ca. 100 h (entspricht ca. drei bis fünf Tagen) [62]. In vitro wird Fibrinogen jedoch langsamer abgebaut, somit bleibt die Menge, die im Plasma

enthalten ist, relativ konstant. Auch nach einer Inkubationszeit des HPP von acht Tagen sollte nahezu die gleiche Menge Fibrinogen enthalten sein wie zu früheren Zeitpunkten. Durch Zugabe einer bestimmten Menge von Thrombin und Calcium-Ionen (im Versuch jeweils 0,2 ml) zum HPP entstand demnach immer dieselbe Menge an Fibrin. Das Gewicht der Fibrinmatrix war deshalb über den Verlauf stabil und verringerte sich nicht.

4.1.3 Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP

Zum Einfluss der Rotation

Durch die permanente Bewegung des Blutes während der Inkubationsperiode wurde in diesem Versuchsansatz die Degranulation der im Vollblut enthaltenen Thrombozyten verstärkt. Durch Wechselwirkungen mit den künstlichen Oberflächen sowie vermehrten Scherkräften zwischen den verschiedenen Blutbestandteilen kam es zur vermehrten Degranulation der Speichergranula [5]. In den Speichergranula sind mehrere Mediatoren enthalten, u.a. auch VEGF [83]. Es kommt somit durch die Bewegungskomponente zu einer vermehrten Freisetzung von VEGF aus den Speichergranula. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die kontinuierliche Bewegung ein weiterer Effekt getriggert wurde: Die enthaltenen PBCs wurden womöglich zur Produktion von VEGF angeregt. Dadurch könnte die deutliche Konzentrationssteigerung um fast das Dreifache von VEGF im Versuchsansatz mit Rotation erklärt werden. Dieser Effekt wurde sowohl im HPP als auch im Releasate deutlich (vgl. Abb. A).

Die Mediatoren TSP1 und PF4 sind ebenfalls in den Speichergranula der Thrombozyten vorhanden [83]. Durch eine vermehrte Degranulation durch die Bewegung im Inkubationsgefäß sollte auch eine zusätzliche Freisetzung von TSP1 und PF4 zu erwarten sein.

Die Konzentrationswerte zeigten sich jedoch stabil bzw. nahmen sogar ab. Durch die Bewegungskomponente war keine Steigerung der Faktorenkonzentration detektierbar. Im Releasate kam es in beiden Fällen (TSP1 und PF4) durch die Rotation während der Inkubationszeit sogar zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Konzentration der Faktoren. Eine weitere Degranulation der Speichergranula durch die zusätzlichen Scherkräfte der kontinuierlichen Rotation

schien demnach für die letztendliche Konzentration der Mediatoren im Releasate keine Rolle zu spielen, da die Ausgangswerte der Konzentrationen bei TSP1 und PF4 sehr hoch waren. Vermutlich konnten kleine Effekte dementsprechend durch die Methode nicht detektiert werden. Die Ausgangswerte der Konzentrationen von VEGF waren deutlich geringer, die Werte bewegten sich im Pikogramm-Bereich, wohingegen TSP1 und PF4 im Nanogramm-Bereich 1000-fach höher konzentriert waren, was auch daran liegen könnte, dass PF4 im Plasma in größerer Menge vorhanden ist [4]. Dies könnte ein plausibler Grund sein, warum die Bewegungskomponente nur bei geringen Ausgangskonzentrationen einen Effekt hervorgebracht hat.

Zum Einfluss der verschiedenen Medien

Die Konzentrationswerte der verschiedenen Faktoren waren in allen Versuchsansätzen im HPP im Vergleich zum Releasate jeweils höher (VEGF, TSP1 und PF4 für jeweils „Rotation“ und „keine Rotation“). Durch die Zugabe von Fibrinogen und Thrombin zum Plasma entstand die Fibrinmatrix, die wiederum nach Versuchsaufbau inkubiert wurde. In dieser sog. Retentionszeit wurde eine Anzahl der im Plasma enthaltenen Faktoren an die Fibrinmatrix gebunden. Es wurde ein Verlust von Faktoren in Kauf genommen, die nicht gebunden wurden. Im weiteren Verlauf wurde das Fibrinigel in einem neuen Medium zentrifugiert, wobei die Faktoren in das Medium freigesetzt wurden. Ein Teil der Faktoren verblieb vermutlich im Fibrinigel, was demnach zu einem weiteren Verlust führte. Somit war die Konzentration der Proteine im Releasate deutlich geringer als im HPP.

Um dies auch grafisch zu verdeutlichen, wurden in Diagramm D die jeweiligen Konzentrationen von VEGF, TSP1 und PF4 in ein Verhältnis gesetzt. Der Quotient setzt sich aus den Mittelwerten der Konzentrationen im Releasate sowie im HPP zusammen und wird sowohl für den Versuchsansatz „Rotation“ als auch für die Verfahrensweise „keine Rotation“ abgebildet.

Ungefähr 20% der Faktoren waren letztendlich im Releasate vorhanden. Die Bewegungskomponente schien dafür unbedeutend.

In diesem Versuchsansatz gibt es einige Störfaktoren, die die Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben. Die Wechselwirkungen der Blutbestandteile mit der Innenfläche der Reagenzgefäße sind nicht eindeutig mess- oder detektierbar.

4.1.4 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten

In einem Blutgerinnsel ist je nach Volumen eine unterschiedliche Menge an Thrombozyten eingeschlossen. Demnach variiert auch die Konzentration von PF4 und anderen Faktoren, die durch Thrombozytenaktivierung und -degranulation freigesetzt werden [83]. Ein größerer Thrombus enthält mehr Thrombozyten, die in ihren Speichergranula PF4 sowie TSP1 enthalten. Dementsprechend müsste eine größere Fibrinmasse auch eine höhere Konzentration von PF4 sowie TSP1 enthalten.

Es wird angenommen, dass die Konzentration von VEGF und weiteren Faktoren im Releasate, die unter Hypoxie vermehrt freigesetzt werden, vor allem durch ihre spezifische Bindung in der Fibrinmatrix festgelegt wird [4, 89]. Die Fibrinmasse scheint deshalb auch die VEGF-Konzentration in größerem Ausmaß zu beeinflussen, wohingegen die PF4-Bindung vermeintlich deutlich weniger massenabhängig ist.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin/ Ca^{2+} zum Plasma hinzugegeben. Die Masse des zellfreien Fibringels wurde dementsprechend vergrößert (s. auch Experiment 5). Somit konnte der Einfluss der Fibringel-Masse auf die Konzentration der Faktoren im Releasate dargestellt werden. Neben der Fibrinmasse ist die Zeitspanne, in der die Faktoren von der Matrix gebunden werden, eine andere Komponente, die letztendlich die Faktorenkonzentration beeinflussen kann.

Im Schaubild A ist die Konzentration von VEGF im Releasate abgebildet, nachdem unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin zugegeben wurden und die Retentionszeit variiert wurde. Die höchste Konzentration von VEGF erhielt man bei Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin und einer Retentionszeit von 2 h. Wenn die Fibrinmasse kleiner war, d.h. weniger Fibrinogen und Thrombin zugegeben wurde, wurden auch die Konzentrationswerte für VEGF kleiner. Bei einer kleineren Oberfläche mit vermeintlich weniger Bindungsstellen wurden die Faktoren langsamer gebunden. Wenn zu einem frühen Zeitpunkt die Fibrinmasse verdreifacht

wurde, stieg die Konzentration von VEGF im Releasate proportional um fast das Dreifache an.

Darüber hinaus ließ sich kein weiterer Effekt weder durch Erhöhung der Retentionszeit noch durch Erhöhung der Fibrinogen- und Thrombinmenge feststellen. Bei allen verschiedenen Mengenzugaben zu späteren Zeitpunkten erreichte die VEGF-Konzentration sowie die PF4-Konzentration im Releasate eine Plateauphase bei ca. 8 h und blieb auf stabilem Niveau. Es kann angenommen werden, dass demnach die Fibrinmatrix zu diesem Zeitpunkt gesättigt war und nicht mehr VEGF/PF4 gebunden werden konnte. Die VEGF-Bindung in der Fibrinmatrix scheint jedoch zu einem frühen Zeitpunkt (Retentionszeit von 2 h) in größerem Umfang von der Masse abzuhängen. Nach einer entsprechend längeren Zeitspanne hatte eine Massenänderung der Fibrinmatrix keinen zusätzlichen Effekt. Im Gegensatz zu VEGF scheint jedoch die PF4-Bindung deutlich weniger massenabhängig zu sein. Bei einem Zeitpunkt von 2 h war ein Anstieg der PF4-Konzentration von 150 auf 274 ng/ml zu verzeichnen, wenn jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin/ Ca^{2+} zugegeben wurden, was einer ungefähren Verdopplung entspricht. Dies korreliert jedoch eher mit der Volumenzunahme der Fibrinmatrix auf das Doppelte. Es konnte darüber hinaus in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass eine spezifische Bindung von VEGF in einer Fibrinmatrix in einem hohen Ausmaß von der Masse abhängt, und weniger durch einen osmotischen Effekt hervorgerufen wird: Die VEGF-Konzentration in Releasates von Fibrinmatrizen war bedeutend höher als in Releasates von anderen Materialien, die eine höhere Wassermenge beinhalteten [42]. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration von VEGF im Releasate von Fibrinmatrizen, die nach einem bestimmten Modell unter Hypoxie inkubiert wurden, bei Verdopplung der Masse verdrei- bzw. verfünffachte [42]. Die Korrelation war bei PF4 deutlich geringer: Eine Verdopplung der Fibrinmasse führte lediglich zu einer proportionalen Zunahme der PF4-Konzentration im Releasate [42]. Insgesamt betrachtet scheint somit die VEGF-Konzentration und -Bindung im Vergleich zu PF4 in einem bedeutenden Ausmaß von der Masse abhängig zu sein, was die vorliegenden Ergebnisse noch einmal bestätigt.

Ein deutlicher Effekt zeigte sich ebenfalls bei der Betrachtung der Konzentrationswerte für TSP1. Wenn man zu einem frühen Zeitpunkt (2 h) die Fibrinmasse groß ansetzte, erhielt man die höchsten Konzentrationswerte.

Bei Betrachtung des Diagramms zeigt sich zudem ein Anstieg der Konzentration von TSP1 und PF4 bei verlängerten Retentionszeiten und kleiner Fibrinmasse. Je länger die Matrix inkubiert wurde, desto mehr Faktoren wurden aus dem HPP im Fibrin gebunden. Der Einfluss der Retentionszeit als Variable war nur bei kleineren Fibrinmassen detektierbar. Wenn man eine große Fibrinmasse wählt, zeigten sich im Verlauf der Retentionszeit stabile Werte. Ein deutlicher Anstieg jedoch fehlte. Die Fibrinmasse war wahrscheinlich zu groß, um den Konzentrationsanstieg durch die Retentionszeit festzustellen. Es könnte angenommen werden, dass zu Beginn alle vorhandenen Faktoren im HPP an das Fibrin gebunden waren und die Retentionszeit deshalb keinen weiteren Einfluss auf die TSP1-Konzentration nehmen konnte.

4.1.5 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Fibrin-Gewicht

Es wurden unterschiedliche Mengen an Fibrinogen und Thrombin zum Plasma hinzugegeben. Je mehr Fibrinogen und Thrombin zum Plasma hinzugegeben wurde, desto größer wurden Gewicht und Masse der Matrix. Der Anstieg war jeweils proportional. Dies ist vergleichbar mit bekannten Ergebnissen, bei denen eine doppelte bzw. dreifache Zugabe von Fibrinogen Fibrinmatrizen von etwa doppelter bzw. dreifacher Masse hervorbrachte [42].

4.1.6 Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität

Es wurde der Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate untersucht. Um diesen Effekt aufzuzeigen, wurden die anderen Parameter im Rahmen der Versuchsreihen jeweils maximal ausgeschöpft. So wurde die Inkubationszeit maximal mit acht Tagen sowie die Retentionszeit maximal mit 24 h gewählt. Ebenfalls wurde die zugegebene Menge an Fibrinogen und Thrombin mit jeweils 0,2 ml im maximalen Bereich angesiedelt. Somit konnte eine maximale Bindungsfähigkeit der Faktoren in der Fibrinmatrix erreicht und nur die Auswirkung der Releasezeit auf die letztendliche Konzentration detektiert werden. Während sich bei der Konzentration von VEGF schon früh (zum Zeitpunkt 4 h) eine Plateauphase

einstellte, wurde diese bei TSP1 und PF4 erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht (Zeitpunkt 12 h). Davor stieg die Konzentration von TSP 1 und PF4 im Überstand bei zunehmender Releasezeit.

Es ist demnach zu vermuten, dass VEGF schneller als TSP1 und PF4 von der Fibrinmatrix an den Überstand abgegeben wurde.

4.2 Evaluierung der Versuchsbedingungen

Für die vorliegenden Experimente wurde lediglich von einem Probanden das Plasma als Versuchsmaterial verwendet. Ob die unterschiedlichen Verfahrensweisen und Versuchsansätze demnach auch beim Material mehrerer Personen ähnliche Effekte erzielen, ist unbekannt. Demnach ist eine kollektiv valide Aussage nur begrenzt möglich.

Um die Aussagekraft und entsprechend die statistische Power zu erhöhen, hätten mehrere Wiederholungsversuche durchgeführt werden müssen. Pro Ansatz wurden die Versuche jedoch nur mit einem Minimum von $n = 3$ Wiederholungen durchgeführt. Dies ist vor allem durch die hohen Kosten bedingt, die unter anderem z.B. durch die Fibrinogen- und Thrombinlösungen verursacht werden.

Eine weitere Rolle spielen Messungenauigkeiten z.B. bei den Gewichtsangaben. Die Matrix wird aus der PBS-Lösung genommen und enthält selbst nach Abtupfen mehr oder weniger Flüssigkeit.

Außerdem kann die Zugabe der Reagenzien beim Zu- und Abpipettieren trotz Vorsichtsmaßnahmen fehlerbehaftet oder auch mehr oder weniger ungenau sein. Zum Beispiel können bei der Herstellung des Plasmas versehentlich zelluläre Spuren enthalten sein, die die Konzentration der Faktoren und somit auch die Messergebnisse im ELISA evtl. beeinflussen.

Im Versuchsansatz mit der Bewegungskomponente (vgl. Experiment 3) gibt es weitere Störfaktoren, die nicht berücksichtigt werden, z.B. Scherkräfte mit der Tube-Innenfläche.

Die Form der Fibringerinnsel wurde nicht genormt. Durch den Mischungsprozess von Plasma und Fibrinogen/Thrombin entstand jeweils eine uneinheitlich geformte Fibrinmatrix, die sich in ihrer Oberfläche unterscheidet. Je nach Oberfläche sind evtl. mehr oder weniger Bindungsstellen für Faktoren vorhanden, d.h. bei einer größeren Oberfläche könnten innerhalb einer kürzeren Zeitspanne auch mehr Faktoren

gebunden werden. Ob der Oberflächenunterschied im Endeffekt bei den Konzentrationsmessungen von Bedeutung ist, bleibt ungewiss.

Für die Antikoagulation des Blutes wurde EDTA verwendet. Wie schon oben beschrieben, wirkt EDTA als Calcium-Bindungsmittel. Die Zellen benötigen zu einem bestimmten Maß auch Calcium-Ionen für den Stoffwechsel, das dann nicht zur Verfügung steht. Eine höhere Stoffwechselrate könnte evtl. durch die Verwendung von mit Heparin antikoaguliertem Blut erreicht werden.

4.3 Anwendung

Das HPP stellt ein Medium dar, um vielfältige biologische Mechanismen in vitro darzustellen. Zudem können die Ergebnisse zum Verständnis molekularer Prozesse beitragen und neue Ansätze für die biologische Forschung liefern. Im Mittelpunkt stehen dabei u.a. verschiedene Aspekte in der Wundheilung.

Neben der Anwendung auf molekularer Ebene stellt Hypoxie präkonditioniertes Plasma die bedeutende Grundlage für ein injizierbares Biomaterial in der plastisch ästhetischen Chirurgie und Dermatologie dar.

4.3.1 Weiterführende Ansätze für Biologie

4.3.1.1 *Hämostase und Angiogenese im Wundheilungsprozess*

Bei Gefäßverletzungen sind zwei Prozesse - Hämostase und Angiogenese - zur Wiederherstellung der Mikrozirkulation wichtig [86].

Unmittelbar nach der Verletzung ist eine effektive Blutstillung/Hämostase notwendig, um übermäßige Blutungen zu verhindern. In diesem Stadium wäre eine vorzeitige Initiierung der Angiogenese kontraproduktiv, da die neu gebildeten feinen Gefäße instabil sind [75]. Beide Prozesse - Hämostase und Angiogenese - sind aus diesem Grund streng zeitlich reguliert, um sicherzustellen, dass die Angiogenese nur nach einer weitgehend vollständig abgeschlossenen Hämostase ablaufen kann. Physiologisch zeigt sich dieser zeitliche Ablauf auch bei der Wundheilung, bei der die Angiogenese erst drei Tage nach der vorangegangenen Verletzung initiiert wird [86, 102]. Dafür verantwortlich könnten verschiedene hämostatische Faktoren sein, die eine anti-angiogene Aktivität aufweisen [15, 26]. Diese Faktoren und ihre induzierten

zellulären Reaktionen sind wichtige Bestandteile eines größeren Regulationsmechanismus.

4.3.1.2 Die Fibrinmatrix in der Hämostase

Hämostase und Angiogenese treten nach einer Verletzung innerhalb desselben Biomaterials - Fibrin - auf. Im Anschluss an die Aktivierung des Gerinnungsprozesses werden in der Fibrinmatrix Thrombozyten gebunden und ein Thrombus entsteht. Dieser Thrombus wird schrittweise durch kapillarreiches Granulationsgewebe und letztendlich durch Kollagen ersetzt, eine extrazelluläre Matrix (EZM oder ECM) entsteht [86].

Die zellulären Vorgänge in einem Wundheilungsprozess nehmen eine aktive Rolle ein, mehrere Signaltransduktionsprozesse werden stimuliert. Die EZM bildet ein passives Gerüst für Zellmigration und -proliferation [32, 86, 104]. Zusätzlich dient die Fibrinmatrix jedoch als nachhaltiges Reservoir für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren [15, 70, 86].

4.3.1.3 Hämostase-Modell in vitro

Um die Rolle der Fibrinmatrix bei der Hämostase in vitro weiter zu untersuchen, wurde in anderen Versuchen ein spezielles Modell entwickelt [42]. Ein frühes Blutgerinnsel besteht aus Thrombozyten, die in einem Netzwerk aus Fibrin eingebettet sind. Mit fortschreitender Hämostase kommt es zur Migration von weiteren Zelltypen [86]. Eine Untersuchung des Gerinnungsprozesses bzw. eines Wundheilungsprozesses in vivo gestaltet sich schwierig. Das Zusammenspiel von zellulären Prozessen und Komponenten, die die Fibrinmatrix betreffen, kann einzeln jeweils schwer untersucht werden. In einem in vitro-Modell, das die Hämostase simuliert, konnte die funktionelle Assoziation beider Komponenten (zellulär und Matrix-betreffend) dargestellt werden. Man spricht von einem „Hemostatic Components Model“ (HCM). Dabei wurde eine physikalische Trennung der beiden Prozesse aufrechterhalten. Die Bedeutung der Fibrinmatrix als Depot für Proteinfaktoren konnte unabhängig von der Rolle als Zellgerüst beurteilt werden [42]. Matrix-gebundene und auch freigesetzte Proteine konnten identifiziert werden. Im Vergleich dazu wäre eine solche Analyse bei einem regulären zellulären Fibrin-

Gerinnsel nicht möglich, da sowohl Matrix-gebundene als auch ungebundene, direkt durch Zellen sezernierte Proteinfaktoren freigesetzt werden.

4.3.1.4 Fibrinmatrix als Depot für Signaltransduktionsfaktoren

In einer Fibrinmatrix können angiogene Faktoren wie VEGF [70, 89], FGF [70, 90] sowie PDGF [70] gebunden werden. Ebenso werden auch Faktoren gebunden, die die Angiogenese hemmen wie z.B. TSP1 [15] und PF4 [4]. Die hier vorliegenden Ergebnisse stellen dabei VEGF, TSP1 und PF4 in den Vordergrund.

Diese Proteine werden jeweils während der Blutgerinnungskaskade freigesetzt. Die Fähigkeit, diese Faktoren einerseits zu binden als auch freizusetzen, ist eine Voraussetzung für eine räumlich definierte und zeitlich regulierte Angiogenese [42]. Die Zeitspanne für die Bindungsprozesse könnte in vitro durch die Retentionszeit abgebildet werden. Während der Releasezeit werden die Proteinfaktoren jeweils wieder von der Matrix abgegeben.

Über einen direkten Zellkontakt vermittelt können Wachstumsfaktoren in einem lokalen Prozess direkt Signale übertragen. Des Weiteren regulieren Signalmoleküle auch im entfernteren Gewebe weitreichend zelluläre Prozesse [7, 20, 32].

4.3.1.5 Zeitliche Abläufe bei der Wundheilung

Bei der Blutstillung beruht eine effektive Hämostase auf der Bildung einer stabilen Fibrinmatrix. Eine Vaskularisierung der Fibrinmatrix wird jedoch durch eine kontrollierte lokale Fibrinolyse vermittelt, wodurch eine Invasion von Endothelzellen ermöglicht wird [15, 25, 47]. Auf den Vorgang der Hämostase folgt schon zu Beginn die Freisetzung einer Vielzahl von pro- und anti-angiogenen Faktoren [15, 26]. Nach der Hämostase und somit einer stabilen Gerüstbildung können neue Gefäße adäquat einwachsen. Ein noch fragiler Thrombus würde durch eine überschießende, zu früh einsetzende Angiogenese keine adäquate Struktur aufweisen und eine effiziente Blutgerinnung wäre dementsprechend nicht möglich.

Hämostase und Angiogenese finden aufeinanderfolgend statt, wobei die Massenänderung der Fibrinmatrix, d.h. letztendlich die Gesamtkonzentration von Fibrin in der Wunde, vermutlich der ausschlaggebende Faktor zum Übergang vom

einem zum anderen Verlauf ist und damit auch die Menge der pro- und anti-angiogenen Faktoren, die von der Fibrinmatrix gebunden und in die Umgebung freigesetzt werden [42]. In einem Wundheilungsprozess überwiegt ab einer bestimmten Masse an Fibrin und damit auch ab einem bestimmten Verhältnis von pro- und anti-angiogenen Signalmolekülen der angiogenetische Verlauf, während die Hämostase ab diesem Zeitpunkt eher in den Hintergrund tritt [42].

Die Ablagerung von Fibrin in einer Wunde oder einer thrombotischen Stelle führen einerseits zu einer erhöhten Bindung und andererseits zur lokalen Freisetzung von anti-angiogenen Faktoren (Inhibitoren). Diese konkurrieren mit der gleichzeitigen Akkumulation von pro-angiogenen Faktoren (Stimulatoren), die dadurch in ihrer Wirkung abgeschwächt werden.

Die Kapazität der Fibrinmatrix, besagte anti-angiogene Faktoren in wirksamen Dosen zu konzentrieren, wirkt des Weiteren ausgleichend auf die pro-angiogene Wirkung der von Thrombozyten freigesetzten Komponenten [8, 13, 87]. Die daraus resultierende Verlagerung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren, verhindert wiederum eine schnelle, d.h. vorzeitige Vaskularisierung und somit Destabilisierung des Fibringerinnsels [15].

Neben PF4 sind auch andere Inhibitoren der Angiogenese wie z.B. gespaltenes Antithrombin, TSP1, PEDF und Endostatin an diesem Prozess beteiligt. Diese wurden jeweils in Releasates von Fibrinmatrizen nachgewiesen [42].

Zudem reduziert PF4 die Durchlässigkeit des Fibrinnetzwerkes [4], was eine Angiogenese zusätzlich erschwert. Der Zerfall der Matrix wird reguliert, indem eine Hemmung der Expression von MMP durch Endothelzellen herbeigeführt wird [55].

Die Fibrinmatrix nimmt bei der Wundheilung eine duale Rolle ein. Zu Beginn steht die Barrierefunktion im Vordergrund: Hämostase und Anti-Angiogenese sind die bedeutenden Vorgänge. Zu einem späteren Zeitpunkt dient die Fibrinmatrix als Gerüst für Zellen sowie einwachsende Gefäße und damit für die Prozesse der Angiogenese.

4.3.1.6 Der Einfluss der Fibrinmasse

Die Fibrinmatrix bietet neben ihrer Gerüstrolle für adhärierende und migrierende Zellen eine Plattform, die über die Bindung und Freisetzung von angiogenen

Faktoren im umgebenden Gewebe eine kompensatorische Angiogenese ermöglicht. Diese Vorgänge werden abhängig von der Fibrinmasse reguliert und je nach Wundgröße und Ausdehnung der Gefäßverschlüsse werden entsprechende Mediatoren gebunden und freigesetzt.

Verfügbares VEGF wird durch die Fibrinmatrix nicht nur in höherem Maß gespeichert als PF4, sondern wird schon bei kleinsten Änderungen der Fibrinmasse freigesetzt. Das Empfindlichkeitsniveau für die Freisetzung ist deutlich niedriger als für PF4, d.h. die PF4-Bindung ist deutlich weniger massenabhängig (vgl. 3.6).

Dies wirkt der Freisetzung von PF4 und anderen anti-angiogenen Faktoren wie TSP1 entgegen, die im Gerinnungsprozess in signifikant höheren Konzentrationen vorliegen (vgl. 3.1: Die Konzentrationen von TSP1 und PF4 sind im Nanogramm-Bereich angesiedelt, VEGF im Pikogramm-Bereich). Trotz des Vorhandenseins dieser Angiogenese-hemmenden Komponenten, konnte durch Zunahme der Matrixmasse eine Zunahme der Konzentration von VEGF im Releasate nachgewiesen werden. Die Fibrinmatrix bildet durch Bindung und Freisetzung der Signalmoleküle einen Gradienten an chemotaktisch wirksamen Substanzen im verletzten Gewebe, was zu einem überwiegend Angiogenese-fördernden Prozess führt. Somit kann eine gerichtete Angiogenese zum verletzten Gewebe hin erfolgen [7, 42].

4.3.1.7 Der Einfluss der Matrixdichte

Fibrinmatrizen mit vergleichbarer Dichte binden einen ähnlichen Anteil von VEGF und PF4 [42]. Angesichts des großen Volumens der untersuchten Fibrinmatrizen (d.h. 1 - 3 cm³ bzw. einer Masse von ca. 100 - 300 mg, was einem physiologischen Gerinnsel entspricht [74]) wurden die Ergebnisse vermutlich in hohem Maße durch eine begrenzte Diffusion der Faktoren beeinflusst. Die Diffusion von niedermolekularen Proteinen durch eine Matrix wird v.a. durch Wasser vermittelt, was zu einer Hydratisierung des Netzwerks führt [16]. Die Matrixdichte, d.h. das Verhältnis von Wasser zu Masse, ist ein wichtiger Parameter, der die spezifische Bindung der Faktoren bestimmt. Demnach könnten Veränderungen der Masse der Fibrinmatrix bei gleich bleibendem Wassergehalt die Regulierung der angiogenen Signalübermittlung erleichtern, was insofern zum einen durch eine Änderung des

Diffusionsvermögens der Faktoren sowie zum anderen durch die Verfügbarkeit von Bindungsstellen erfolgt.

4.3.1.8 Hypoxie als Stimulator der Angiogenese

Im Gerinnungsprozess kommt es durch die Thrombozyten zu einer Ausschüttung des Angiogenese-fördernden Signalproteins VEGF. Es konnte gezeigt werden, dass durch Hypoxie in einem Gerinnsel diese Freisetzung potenziert werden kann [31, 38]. Darüber hinaus korreliert die Schwere bzw. Dauer der perizellulären Hypoxie mit der Dichte der Blutzellen, da dies einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauches entspricht. Des Weiteren spielt zusätzlich das Sauerstoffdiffusionsvermögen, das je nach Masse des Gerinnsels limitiert ist, eine Rolle. Eine Ansammlung von Zellen im reifenden Wundbett oder innerhalb eines wachsenden Thrombus bedeutet auch eine Erhöhung der lokalen aeroben Nachfrage. Demnach wird das bereits begrenzte Sauerstoffangebot weiter reduziert. Durch die zunehmende Hypoxie, die in vitro durch die zunehmende Inkubationszeit simuliert wird, werden anti-angiogene Faktoren wie TSP1 und PF 4 herunterreguliert bzw. deren Expression gehemmt [38, 51, 100]. Infolgedessen wird dadurch der Angiogenese-fördernde Effekt noch verstärkt.

Bei chronischen Wunden wie z.B. dem diabetischen Fußsyndrom, bei Verbrennungen oder auch bei anderen ischämischen Wunden ist die Heilung ein sehr schwieriger und langwieriger Prozess. Über einen längeren Zeitraum zeigt sich keine Heilungstendenz, die Kontinuität des Gewebes ist unterbrochen. Diese Wunden treten auf, wenn durch eine Grunderkrankung der Heilungsprozess gestört und/oder das Gewebe mangelhaft versorgt wird [86]. Durch diese Minderversorgung sind die Wunden ständig hypoxischen Bedingungen ausgesetzt.

Eine der wichtigsten antreibenden Kräfte für Wundheilung ist Angiogenese, die Einsprossung neuer Blutgefäße, die eine adäquate Blutversorgung im Gewebe sicherstellen [105]. Die Zellen produzieren Faktoren wie VEGF und andere Angiopoietine, um die Angiogenese zu stimulieren und hochzuregulieren [78]. Der maßgebende Ausschlag für diesen Mechanismus ist Hypoxie.

Oftmals funktioniert eine zufriedenstellende Wundheilungsreaktion mit ausreichender Blutversorgung bei chronischen Wunden trotz ständig vorhandenem Stimulus jedoch nicht [66]. Die Zellen sind nach einer längeren Periode, in der sie ständig

hypoxischem Stress ausgesetzt sind, nicht mehr ausreichend in der Lage, angiogene Faktoren zu exprimieren [43, 66]. Des Weiteren nimmt mit zunehmendem Zellalter das Ansprechen auf Wachstumsfaktoren ab. Die verminderte Fähigkeit eines Gewebes, die Angiogenese entsprechend zu fördern, führt durch ein niedriges Nährstoff- und Sauerstoffangebot zu einem Voranschreiten des Gewebedefektes. Meistens ist eine Fehlregulation des hypoxia-inducible factor = HIF der Grund dafür [84].

Hypoxie - als ausschlaggebender Stimulus für Angiogenese - spielt bei der Embryogenese wie eben auch in pathologischen Situationen wie Wundheilung, Ischämie oder Tumorbildung eine wichtige Rolle [43, 46].

Setzt man Zellen in vitro hypoxischen wundähnlichen Bedingungen aus, produzieren sie angiogene Proteine [41, 81]. Die erhaltenen Faktoren - nach einer bestimmten Zeit entnommen - haben angiogenes Potenzial.

Eine kontrollierte Zugabe von bestimmten Faktoren-Kompositionen zu chronisch-ischämischem Gewebe könnte also in vivo ausgleichen, was ein ischämisches Gewebe nur begrenzt zur Verfügung stellen kann. So könnte die limitierte Fähigkeit einer chronisch ischämischen Wunde überwunden und die Angiogenese aktiviert und unterstützt werden [38]. Ein adäquater Regenerationsprozess wird eingeleitet. Auch die Vaskularisierung von bestimmten Geweben vor einer Implantation bzw. Transplantation - z.B. Haut-, Fett-, Muskel- oder Knochengewebe - könnte unterstützt und eine bessere Integration geschaffen werden (s.u.) [44].

4.3.2 Anwendungen in der Medizin

Neben der Anwendung in der biologischen Forschung auf molekularer Ebene könnte der Nutzen von HPP auch in der Medizin von essentieller Bedeutung sein. HPP könnte die Grundlage für ein injizierbares Biomaterial in der plastisch ästhetischen Chirurgie und in der Dermatologie darstellen. Eine epidermale Anwendung wäre in dieser Hinsicht ebenfalls denkbar. Zudem könnte die Heilung chronisch ischämischer Wunden aktiv unterstützt werden.

4.3.2.1 HPP als injizierbares Biomaterial

Das vorkonditionierte HPP könnte auf verschiedene Art und Weise zur Anwendung kommen. Die direkte subkutane Injektion stellt eine Möglichkeit dar [40]. Dem Patienten würde Blut entnommen und bei 37 °C unter Hypoxie entsprechend der vorgestellten Ergebnisse inkubiert. Eine Zeitspanne von ca. vier Tagen wäre ausreichend, um den Effekt der Hypoxie auszureizen. Das HPP würde extrahiert und über eine subkutane Injektion direkt wieder zugeführt. Durch weitere Zugabe von Thrombin und Calcium bzw. Fibrinogen zum HPP wird die plasmatische Gerinnungskaskade aktiviert, wodurch eine Fibrin-gel-Matrix entsteht. Mit der weiteren Zugabe von Fibrinogen könnte das Volumen des Gels beeinflusst werden, wie in vitro dargelegt wurde.

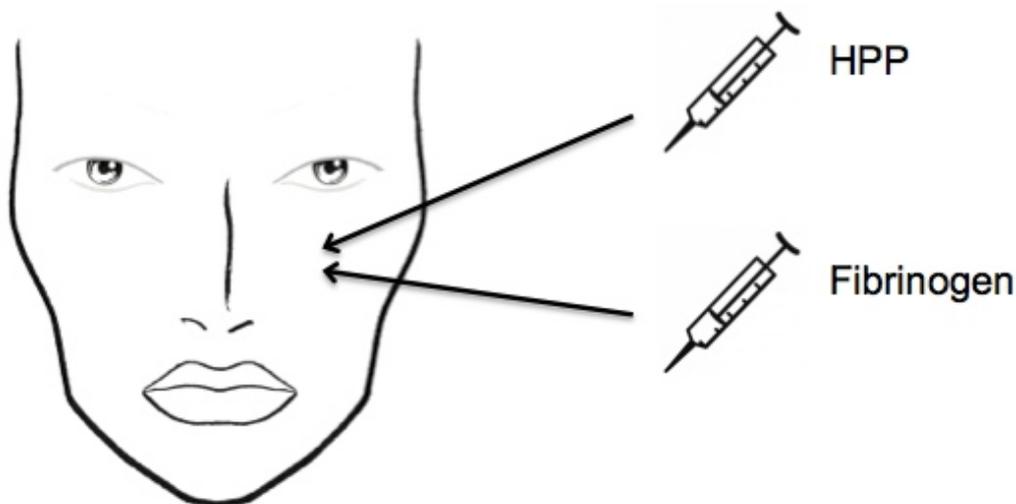


Abb. 16: HPP als injizierbares Biomaterial im Sinne eines regenerativen Face-lifts

Eine erste Injektion könnte das HPP mit den angiogenen Faktoren wie VEGF enthalten. Die zweite Injektion würde Fibrinogen sowie Thrombin und Calcium beinhalten. An der Injektionsstelle würde sich analog zu den Ergebnissen eine Fibrin-haltige gelähnliche Matrix formieren (modifiziert nach [50]).

Zelluläre Vorgänge

Die im HPP enthaltenen Proteine würden wie gezeigt in die Fibrinmatrix übergehen, was in vitro durch die Retentionszeit abgebildet wurde. Innerhalb von ca. acht Stunden sind alle Faktoren gebunden, wie in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt wurde. Anschließend zum Versuchsaufbau in vitro käme es an der Injektionsstelle zu

einer Freigabe der angiogenetischen Faktoren aus der Fibrinmatrix (vgl. Abb. 23). Die Faktoren würden kontinuierlich kontrolliert abgegeben werden, indem eine spezifische Bindung oder auch passive Aufnahme stattfindet [89]. Der Fibrinmatrix käme eine Depotfunktion zu. In vitro wurde diese Zeitspanne durch die Releasezeit dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF schneller an das Medium abgegeben wurde als TSP1 und PF4. Durch die Depotfunktion würden zusätzlich unerwünschte Nebeneffekte wie eine Verletzung von Gefäßen oder überschießende bzw. ektop stattfindende Angiogenese vermieden werden.

Die Fibrinmatrix würde analog an der Injektionsstelle als ein temporäres Gerüst fungieren, in das durch die angiogenen Signale Endothelzellen migrieren und neue Gefäße einsprossen könnten (vergleichbar mit dem Wundheilungsprozess, s.o.). Durch die Migration von Fibroblasten würde eine extrazelluläre Matrix (extracellular matrix = ECM oder EZM) formiert, die als Verankerung von Zellen und als Formkonsistenz des Gewebes dienen könnte.

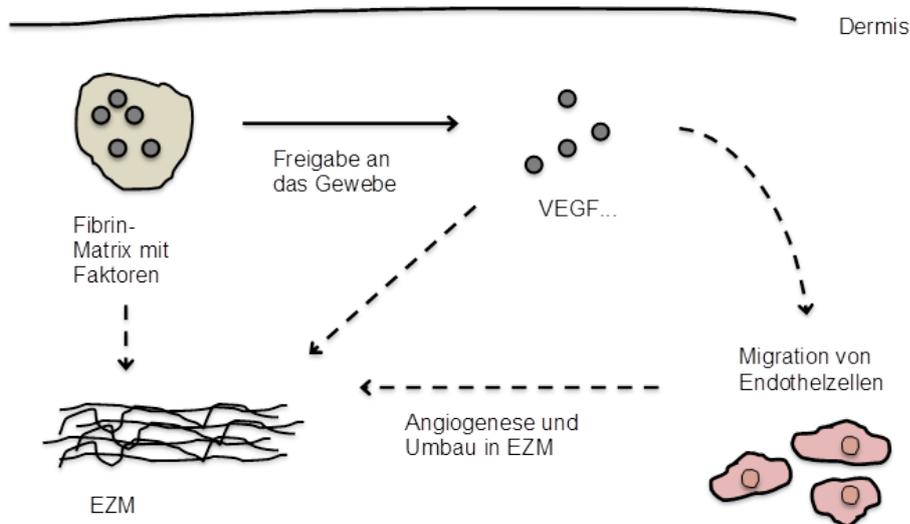


Abb. 17: Zelluläre Mechanismen an der Injektionsstelle

Die Fibrinmatrix bindet die angiogenen Proteine des HPP, die kontinuierlich an das umliegende Gewebe abgegeben werden. Der Fibrinmatrix kommt eine Depotfunktion zu. Eine Migration von Endothelzellen und Einsprossung von Gefäßen ist die Folge. Es kommt zur Formierung einer EZM.

Somit könnte eine Verbesserung der Kontur, eine Reduktion von Falten, Linien sowie Unebenheiten und damit eine verbesserte Formgebung erreicht werden. Neben der kurzfristigen ästhetischen Wirkung als Filler - und damit als Volumen-gebendes Material - könnte die Fibrinmatrix durch die enthaltenen Faktoren mit angiogenem

Potential jedoch zusätzlich entsprechend der Wirkung eines Liquid-Facelifts einen langfristigen Beitrag zur Regeneration des Gewebes leisten.

Spezifische Injektionsstellen im Gesichtsbereich wären der Stirnbereich und die Glabellaregion, die periorbitale und die Wangenregion sowie der Nasolabialbereich. Von weiterer Bedeutung im unteren Gesichtsbereich wären Kinn, Lippenkontur (vermilion border) und Mundwinkelfalten (marionette lines).

Ein weiterer Einsatzbereich von HPP könnte die Kombination mit einer Transplantation von autologen Fettzellen zur ästhetischen Modellierung von Gesicht und Körperkontur sein. Die im HPP vorhandenen Faktoren würden die Einheilungsrate der transplantierten Fettgewebszellen erhöhen, indem die Angiogenese vermeintlich gefördert und somit das Nährstoffangebot der Zellen verbessert würde. Ein schnelleres Anwachsen könnte die Kontinuitätswiederherstellung bedeutend beschleunigen (vgl. auch 4.3.1.8) [44].

Die Behandlung von Narben könnte ebenfalls eine Therapiemöglichkeit darstellen. Durch die im HPP enthaltenen Faktoren könnte eine Verbesserung der Konsistenz und der Form erreicht werden. Im HPP enthaltene Kollagen-spaltenden Enzyme, die die Narbenstruktur veränderten, könnten zur Regeneration des Gewebes führen [44].

4.3.2.2 HPP in der epidermalen Anwendung

Das vorkonditionierte HPP könnte nicht nur als subkutane Injektion angewendet, sondern auch direkt auf die Haut oder auf Wunden aufgetragen werden.

HPP könnte direkt auf einen passenden Träger wie z.B. auf eine poröse Matrix eingebracht werden, die dann auf einer Wunde platziert würde [38]. Die Träger könnten aus abbaubaren Materialien bestehen, die mit angiogenen Faktoren versehen sind, und an einem Defekt (z.B. einer tiefen Wunde etc.) nach dem gleichen Prinzip als Gerüst für einwachsende Zellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen dienen und somit einen enormen Beitrag zur Rekonstruktion und Regeneration von Geweben leisten [44]. Die personalisierte HPP-Therapie in Form einer epidermalen Anwendung wäre demnach als Angiogenese-fördernde Therapie

bei peripheren ischämischen Verhältnissen wie Wunden, Ulcera oder Verbrennungen im Klinikalltag gedacht (s. auch 4.3.1.8).

Auch in ästhetischer Hinsicht spielte die epidermale Anwendung von HPP eine Rolle: Qualitative Eigenschaften wie Hautstruktur, Pigmentierung und Porösität sowie mechanische Eigenschaften wie Elastizität und Feuchtigkeit könnten durch das angiogene Potential verbessert werden. Aus dem individuell hergestellten HPP könnten die Faktoren extrahiert und in einer z.B. Hyaluronsäure-haltigen Creme gebunden werden, die dann auf die Haut aufgetragen würde [44]. Das kleine Molekulargewicht der Signalmoleküle wie VEGF würde eine hohe Eindringtiefe in die Dermis ermöglichen. Moleküle wie Kollagen und Hyaluronsäure sind dagegen Proteine mit großem Molekulargewicht, die durch eine reine epidermale Anwendung weniger Wirkung entfalten könnten. Die Verbindung mit speziellen Liposomen und das Entfernen großer Moleküle wie Fibrinogen würde die Eindringtiefe der Moleküle zusätzlich erhöhen [44].

4.3.2.3 HPP als zellfreies Material

Durch die hypoxischen Bedingungen in der Konditionierungsphase gehen einige der Zellen zugrunde [22]. Das entstehende apoptotische Zellmaterial könnte in gewissem Maß zu immunologischen Reaktionen und Entzündungsprozessen führen. Obwohl das HPP ein zellfreies Material ist, kann es durch kleinste Reste zellulären Materials verunreinigt sein. Um eine sichere Verwendung von HPP im medizinischen Bereich zu gewährleisten, wäre eine Reinigung der freigesetzten Proteine durch eine Abfilterung von zellulärem Material erforderlich. In vitro wurde eine Filtermethode für das HPP entwickelt: Die Faktoren wurden auf einen zellfreien Träger aufgetragen [38]. Zuvor wurden PBCs auf Kollagen- oder Fibrinträgern unter wundähnlichen Bedingungen bei einem Sauerstoffgehalt von 3 % und 37° C inkubiert, um die Angiogenese stimulierenden Signaltransduktionswege hochzuregulieren. Ein Nanofilter trennte anschließend Blutbestandteile vom Gelträger mit den Faktoren. Mit diesem Gel konnte in vitro Angiogenese in Form von Zell-Migration (Endothelzellen) und einem entstehenden Tubulisystem nachgewiesen werden [38]. Dieses Filter-System, integriert in einen Bioreaktor, könnte den Erhalt von HPP in Form eines zellfreien Trägers in einem Schritt möglich machen [44] - eine Kombination von

Inkubationskammer für das HPP, Filterung der unerwünschten Bestandteile und gleichzeitigem Erhalt der gewünschten Faktoren auf einem Träger. Analog zu den hier vorliegenden Versuchen trennte sich das Plasma während der Konditionierung durch Sedimentation von den zellulären Bestandteilen des Blutes. Somit konnte HPP isoliert werden. Der Filter im Reaktor trennte den Plasmateil vom Trägermaterial, hielt zelluläre Kompartimente zurück und reinigte das Plasma. Gleichzeitig wurden die im HPP enthaltenen Faktoren an den zellfreien Träger gebunden [38].

4.3.2.4 HPP als autologe Therapieform

Hypoxie präkonditioniertes Plasma (HPP) stellt eine besondere Form eines Kulturmediums und eine zellulose Weiterentwicklung einer autologen Therapie dar.

Die Zusammensetzung und das Verhältnis von im HPP enthaltenen Faktoren ist entsprechend des Vorkommens im eigenen Blut individuell unterschiedlich [44]. Auch Prozesse wie Genexpression und Signalwege, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren vermittelt werden, unterliegen einer großen Bandbreite und variieren deutlich. Aus diesem Grund wäre eine personalisierte Therapie besonders bedeutsam.

Gleichermaßen unterliegt die Hochregulation von VEGF bei der Stimulation von PBCs mit Hypoxie einer solchen Variation [38]. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf Abweichungen im HIF-System zurückzuführen [14] und ausschlaggebend dafür, dass der Prozess bei einer Wundheilung, die durch eine adäquate Angiogenese gekennzeichnet ist, individuell verläuft.

Auf diese individuellen Bedürfnisse im Wundheilungsprozess könnte durch die Verwendung einer personalisierten Therapie eingegangen werden.

Ein weiterer Vorteil bei einer autologen Therapie wäre das Fehlen von immunologischen Prozessen als Reaktion auf Fremdmaterial und die geringe allergische sowie infektionsfördernde Wirkung. Im Vergleich zu vielen anderen injizierbaren Biomaterialien würde es sich um eine körpereigene zellfreie Substanz handeln, die keine synthetischen oder tierischen Bestandteile enthält.

4.3.2.5 Vergleich von HPP mit Verfahren beruhend auf Thrombozytenkonzentraten

Die Aktivierung von Thrombozyten führt zur Ausschüttung ihrer Speichergranula, in denen aggregationsfördernde Stoffe enthalten sind [5]. Eine bestimmte Komposition von Faktoren konnte durch diesen Vorgang bei Verwendung von thrombozytenreichem Plasma (platelet rich plasma = PRP) oder thrombozytenreicher Fibrinmatrix (platelet-rich fibrin matrix = PRFM) erhalten werden [21].

Die Faktorenkomposition ausgehend von thrombozytenreichen Produkten enthält neben angiogenen Proteinen eine bedeutende Menge an anti-angiogenen Faktoren mit hohem Potenzial wie z.B. PF4 oder TSP1. Da diese in einem besonders hohen Maß in Thrombozytenkonzentraten vorhanden sind, schwächen sie die Angiogenese fördernde Wirkung vermeintlich ab. Deshalb sind Faktorenkompositionen entstehend aus thrombozytenreichen Produkten für die Heilung von chronischen Wunden eher ungeeignet [69]. Des Weiteren spielen Thrombozyten vor allem in der frühen Entzündungsphase bei der Hämostase eine Rolle, wohingegen die Prozesse der Angiogenese erst drei bis vier Tage nach Verletzung einsetzen [86].

In Hypoxie-inkubiertem Plasma ist die Konzentration von thrombozytären Faktoren deutlich geringer als im Blutserum [38], da antikoaguliertes Blut verwendet wird. Das vermeintlich angiogene Potenzial von HPP ist deshalb vermutlich weniger auf Faktoren aus Thrombozytengranula zurückzuführen. Durch die Präkonditionierung des HPP unter Hypoxie wird eine zusätzliche Stimulation der PBCs angeregt, entsprechende Wachstumsfaktoren zu produzieren, die die Angiogenese fördern könnten [42]. Bei der Verwendung von PRP wird das Blut jedoch nur zentrifugiert und nicht präkonditioniert. Dadurch kommt es lediglich zu einer Konzentrationserhöhung der Thrombozyten und der damit verbunden Proteinfaktoren [21, 69]. HPP könnte demnach eine verbesserte Alternative zu thrombozytären Produkten darstellen, um mit der entsprechenden Faktorenkomposition die Angiogenese in ischämischen Wundverhältnissen optimal zu unterstützen. Die Zusammensetzung hat vermeintlich eine hohe angiogene Potenz und Proteinkonzentration. Fehlende angiogene Signalfaktoren könnten somit ergänzt werden und für die Regeneration des Gewebes hilfreich sein.

4.4 Ausblick

Neben den dargestellten Möglichkeiten, anhand von HPP biologische bzw. molekularbiologische Vorgänge darzulegen, könnten weitere interessante Ansätze in den Vordergrund rücken, um bestimmte Teilaspekte der Angiogenese aufzuzeigen. Wie die Fibrinmatrix als regulatives Medium in diesem Prozess eine zentrale Rolle einnehmen kann, wurde schon ausführlich veranschaulicht. Es wurde der Effekt von löslichen Faktoren, die von der Fibrinmatrix freigesetzt werden, auf eine Induktion der Angiogenese durch Endothelzellen untersucht [42]. Es konnte bestätigt werden, dass die enthaltenen Faktoren im Releasate der Fibrinmatrix die Ausbildung von Endothelzellen unterstützen, d.h. die Fibrinmatrix weist ein angiogenes Potential auf. Darauf aufbauend stellt sich nun die Frage, wie sich Endothelzellen verhalten, die direkt auf der Fibrinmatrix kultiviert bzw. inkubiert werden. Verschiedene biophysikalische Effekte könnten die Beobachtungen beeinträchtigen, z.B. Unterschiede in der Fibrinstruktur, die weitgehend von den Bedingungen bei der Polymerisierung abhängig sind [25, 62], Unterschiede in der Fibrinolyse, da natürlich auftretende Fibrin(ogen)-Varianten unterschiedliche fibrinolytische Empfindlichkeit zeigen, wodurch wiederum die Endothelzellproliferation und Tubulogenese beeinflusst wird [62, 107].

Es wurde gezeigt, dass die Fibrinmatrix das Gleichgewicht zwischen Hämostase und der Erzeugung einer räumlich und zeitlich definierten Angiogenese auf biochemischer Ebene koordiniert [42]. In dieser Hinsicht tritt die Funktion als Depot für Signaltransduktionsmoleküle in den Vordergrund, die die Rolle als Zellgerüst unterstützt und moduliert.

Neben der Regulation der verschiedenen Wundheilungsphasen könnten die Ergebnisse auch für weitere pathophysiologische Prozesse Erkenntnisse liefern, in denen die Gerinnung und Angiogenese bedeutende Vorgänge sind, so z.B. die Entwicklung von chronischen Hämatomen [97, 98], der Zusammenhang zwischen einem erhöhten Plasmafibrinogen-Spiegel und kardiovaskulärem Risiko [56] oder auch die Beziehung von begrenzter Fibrinablagerung und Induktion der Angiogenese bei Hämophilie [75]. Weitere pathophysiologische Prozesse in diesem Zusammenhang sind die Bildung eines Kollateralkreislaufes sowie die Rekanalisierung und Auflösung eines Gerinnsels nach thrombotischem bzw. atherosklerotischem Gefäßverschluss [2, 31, 67, 72, 99] oder der Beitrag einer

erhöhten Resistenz von Fibringerinnseln ggü. deren Abbau bei der Alzheimer-Erkrankung [111, 112] oder auch Gerinnungsstörungen bei malignen Erkrankungen [26, 109].

Für die medizinische Anwendung ist es ausschlaggebend, ein möglichst naturnahes Modell *in vitro* zu verwenden, um die Vorgänge z.B. in einer chronischen Wundsituation wirklichkeitsgetreu nachzubilden. Die Verwendung von Serum anstatt Plasma als Biomaterial könnte von Bedeutung sein. Blutserum enthält im Gegensatz zu Plasma kein Fibrinogen.

Des Weiteren wäre eine weiterführende Untersuchung der Ergebnisse *in vivo* interessant: Ein Vergleich des Hautbildes bzw. der Wundsituation vor und nach der Behandlung mit Hypoxie prädkonditioniertem Plasma anhand verschiedener mechanischer Parameter sowie die Untersuchung von Hauteigenschaften bzw. Wundheilungsfortschritten.

5 Zusammenfassung

Es wurden mehrere einflussnehmende Größen auf ihre Bedeutung und Wirkung bei der Gewinnung und Weiterverarbeitung von HPP untersucht. Besonders essenziell für den Versuchsaufbau steht an erster Stelle die Zeitspanne, in der das Blut unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wird. Mit der Rotation während dieser Inkubationszeit kommt eine weitere Variation im Versuchsablauf hinzu. Zudem wurden verschiedene Mengen von Fibrinogen und Thrombin getestet, die eine entstehende Fibrinmatrix entscheidend in der Masse beeinflussten. Inwiefern die Fibrinmasse auf die Konzentration der untersuchten Proteine einen Einfluss ausübt, wurde ebenfalls untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene Zeitspannen variiert und analysiert, in denen die bedeutenden Proteinfaktoren das Medium wechselten und von der Fibrinmatrix freigegeben werden.

Durch die Hypoxie während der Inkubationszeit ändern sich die Bedingungen im zellulären Umfeld und es kommt zur vermehrten Produktion von Angiogenese-fördernden Wachstumsfaktoren. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die anti-angiogenen Faktoren unter andauernder Hypoxie herunterreguliert werden.

Im weiteren Versuchsablauf kam zum Ausdruck, dass durch die verschiedenen Konditionierungsansätze die Konzentration der Faktoren im Releasate, d.h. nach mehreren Konditionierungsschritten, um ca. 80 % geringer ist als direkt im HPP. Um diesen Verlust bei der medizinischen Anwendung in vivo nicht in Kauf nehmen zu müssen, könnte deshalb direkt das HPP nach der Inkubationszeit als injizierbares Biomaterial verwendet werden.

Durch die permanente Zellbewegung während der Inkubationsperiode konnten zwei Effekte nachgewiesen werden. Zum einen wird die Degranulation der im Vollblut enthaltenen Thrombozyten verstärkt, was eine vermehrte Freisetzung von VEGF aus den Speichergranula bedeutet. Zusätzlich kommt es womöglich zu einer erhöhten Neuproduktion von VEGF.

Die Masse der Fibrinmatrix konnte durch eine erhöhte Zugabe von Fibrinogen und Thrombin vergrößert werden. Die Masse der Fibrinmatrix beeinflusste wiederum auch die Konzentration der Faktoren im Releasate. Hier ist vor allem bedeutend, dass die Bindung des angiogenen Signalmoleküls VEGF durch die Matrix zu einem frühen Zeitpunkt von der Fibrinmasse abhängig ist. Eine größere Masse der

Fibrinmatrix kann innerhalb einer kürzeren Zeitspanne mehr VEGF binden. Im Gegensatz dazu ist jedoch die Bindung des anti-angiogenen Faktors PF4 deutlich weniger von der Masse abhängig. Je länger die Fibrinmatrix inkubiert wurde, desto mehr Faktoren wurden aus dem HPP im Fibrin gebunden. Dieser Einfluss der Retentionszeit als bedeutende Variable ist jedoch nur bei kleineren Fibrinmassen detektierbar. Ein Sättigungseffekt der Fibrinmatrix zeigte sich ab einer Zeitspanne von ca. acht Stunden für alle untersuchten Fibrinmassen und Proteinfaktoren.

Die von der Fibrinmatrix gebundenen Faktoren werden mit zunehmender Zeit an einen Überstand - in vivo an das umliegende Gewebe - abgegeben. Je länger gewartet wird, desto mehr Faktoren werden abgegeben. VEGF wurde dabei nach einer Periode von ungefähr vier Stunden komplett an das neue Medium abgegeben, TSP1 und PF4 zu einem späteren Zeitpunkt, nach ca. zwölf Stunden.

Die Hypoxie als initiales Wachstumssignal stimuliert die Produktion von Wachstumsfaktoren, die im HPP in höherer Konzentration vorliegen. Gleichermaßen werden inhibitorische Signaltransduktionsmoleküle herunterreguliert, die somit in niedriger Konzentration vorliegen. Die Faktoren werden bei Zugabe von Fibrinogen und Thrombin sowie Calcium in der entstehenden Fibrinmasse gebunden und wieder an ein neues Medium bzw. an die Umgebung abgegeben. Es wurde in weiterführenden Versuchen gezeigt, dass diese Überstände ein angiogenes Potential aufweisen und eine Migration sowie Proliferation von Endothelzellen die Folge ist.

Dieses Grundprinzip ist in mehreren Anwendungsbereichen von Bedeutung. Das HPP dient als Basis für die Darstellung vielfältiger biologischer Mechanismen. Die Versuche in vitro dienen als Hilfestellung für das Verständnis von Prozessen auf molekularer Ebene. Im Fokus steht hier die Bedeutung der Fibrinmatrix in einem Wundheilungsprozess. Sie dient im Modell zum einen als Depot für Signaltransduktionsmoleküle sowie zum anderen als Grundgerüst für einwachsende Zellen.

Im Wundheilungsprozess kommt es früh zur Hämostase bzw. Gerinnung, eine Fibrinmatrix entsteht. Anti-angiogene Proteine wie TSP1 und PF4 werden vermehrt von enthaltenen Thrombozyten freigesetzt. Somit wird vermutlich eine verfrühte Gefäßneubildung in der Umgebung und eine Destabilisierung der noch fragilen

Matrix verhindert und der hämostatische Prozess nicht unterbrochen. Mit zunehmender Größe des Blutgerinnsels und damit verbundener zellulärer Akkumulation innerhalb der Matrix kommt es durch die initiale Gefäßverletzung zu einer mangelnden Zufuhr von Sauerstoff. Eine hypoxische Umgebung entsteht. Durch die Hypoxie werden Wachstumsfaktoren wie VEGF hoch- sowie anti-angiogene Proteine wie TSP1 und PF4 herunterreguliert, was letztendlich eine Stimulation der Angiogenese bedeutet. Nach Beendigung der hämostatischen Phase kommt es im fortlaufenden Wundheilungsprozess zur Fibrinolyse und zur Abnahme von anti-angiogenen Signalmolekülen bei gleichzeitiger vermehrter Freisetzung von angiogenen Faktoren. Eine zur Wundregion gerichtete Migration und Proliferation von Endothelzellen führt zur Einsprossung von neuen Gefäßen. Eine Stimulation der Angiogenese ermöglicht die Vaskularisierung der Matrix und damit die Regeneration eines Wundgewebes.

Neben der Anwendung in der biologischen Forschung auf molekularer Ebene könnte Hypoxie präkonditioniertes Plasma die bedeutende Grundlage für ein injizierbares Biomaterial in der plastisch ästhetischen Chirurgie und Dermatologie darstellen. Als autologe Therapieform mit einer individuellen Zusammensetzung und regenerativem Potential könnte nicht nur kurzfristig eine Konturverbesserung erreicht werden, sondern auch langfristig über angiogene Signale ein Beitrag zur Regeneration des Gewebes geleistet werden. Eine Injektion in Narben und tiefere Wunden wäre ebenfalls möglich. Des Weiteren könnte eine Kombination mit autologen Transplantaten wie z.B. Fettzellen erfolgen, womit ein besseres Anwachsen des Transplantats erzielt werden könnte.

Eine epidermale Anwendung wäre ebenfalls denkbar. Das Hautbild könnte durch die vorhandenen Signaltransduktionsfaktoren verbessert werden. Darüber hinaus wäre HPP von Bedeutung bei der Heilung chronisch ischämischer Wunden wie z.B. dem diabetischen Fußsyndrom, bei Ulcera mit schlechten Durchblutungsverhältnissen oder auch bei Verbrennungen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Adams JC. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:861-5.
- [2] Aidoudi S, Bikfalvi A. Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2010;104:941-8.
- [3] Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant* 2009;18:371-80.
- [4] Amelot AA, Tagzirt M, Ducouret G, Kuen RL, Le Bonniec BF. Platelet factor 4 (CXCL4) seals blood clots by altering the structure of fibrin. *J Biol Chem* 2007;282:710-20.
- [5] Andrews RK, Berndt MC. Platelet adhesion: a game of catch and release. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:3009-11.
- [6] Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res* 2012;129:382-7.
- [7] Barkefors I, Le Jan S, Jakobsson L, Hejll E, Carlson G, Johansson H, Jarvius J, Park JW, Li Jeon N, Kreuger J. Endothelial cell migration in stable gradients of vascular endothelial growth factor A and fibroblast growth factor 2: effects on chemotaxis and chemokinesis. *J Biol Chem* 2008;283:13905-12.
- [8] Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE, Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* 2011;118:1359-69.
- [9] Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Kim BS. Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Eng Part A* 2012;18:2138-47.
- [10] Bikfalvi A, Gimenez-Gallego G. The control of angiogenesis and tumor invasion by platelet factor-4 and platelet factor-4-derived molecules. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:137-44.
- [11] Bouchentouf M, Paradis P, Forner KA, Cuerquis J, Boivin MN, Zheng J, Boulassel MR, Routy JP, Schiffrin EL, Galipeau J. Monocyte derivatives promote angiogenesis and myocyte survival in a model of myocardial infarction. *Cell Transplant* 2010;19:369-86.
- [12] Braems G, Jensen A. Hypoxia reduces oxygen consumption of fetal skeletal muscle cells in monolayer culture. *J Dev Physiol* 1991;16:209-15.
- [13] Brill A, Elinav H, Varon D. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;63:226-35.
- [14] Brooks JT, Elvidge GP, Glennly L, Gleadle JM, Liu C, Ragoussis J, Smith TG, Talbot NP, Winchester L, Maxwell PH, Robbins PA. Variations within oxygen-regulated gene expression in humans. *J Appl Physiol (1985)* 2009;106:212-20.
- [15] Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:1521-4.
- [16] Burczak K, Fujisato T, Hatada M, Ikada Y. Protein permeation through poly(vinyl alcohol) hydrogel membranes. *Biomaterials* 1994;15:231-8.
- [17] Burdon RH. Temperature and animal cell protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 1987;41:113-33.
- [18] Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 2003;163:1233-43.
- [19] Cai Y, Li X, Wang YS, Shi YY, Ye Z, Yang GD, Dou GR, Hou HY, Yang N, Cao XR, Lu ZF. Hyperglycemia promotes vasculogenesis in choroidal neovascularization in diabetic mice by stimulating VEGF and SDF-1 expression in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2014;123:87-96.
- [20] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
- [21] Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty* 2011;11:e38.

- [22] Cheema U, Brown RA, Alp B, MacRobert AJ. Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:177-86.
- [23] Cheema U, Hadjipanayi E, Tammi N, Alp B, Mudera V, Brown RA. Identification of key factors in deep O₂ cell perfusion for vascular tissue engineering. *Int J Artif Organs* 2009;32:318-28.
- [24] Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 2000;19:597-614.
- [25] Collen A, Koolwijk P, Kroon M, van Hinsbergh VW. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 1998;2:153-65.
- [26] Daly ME, Makris A, Reed M, Lewis CE. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment? *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1660-73.
- [27] Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991;30:10363-70.
- [28] Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Henrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4584-7.
- [29] Eisman R, Surrey S, Ramachandran B, Schwartz E, Poncz M. Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood* 1990;76:336-44.
- [30] Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 2007;370:2103-11.
- [31] Evans CE, Humphries J, Mattock K, Waltham M, Wadoodi A, Saha P, Modarai B, Maxwell PH, Smith A. Hypoxia and upregulation of hypoxia-inducible factor 1{alpha} stimulate venous thrombus recanalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2443-51.
- [32] Feng X, Tonnesen MG, Mousa SA, Clark RA. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *Int J Cell Biol* 2013;2013:231279.
- [33] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 2006;312:594-607.
- [34] Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:562-77.
- [35] Goodger AM, Rogers PA. Endometrial endothelial cell proliferation during the menstrual cycle. *Human reproduction (Oxford, England)* 1994;9:399-405.
- [36] Gupta SK, Singh JP. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol* 1994;127:1121-7.
- [37] Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of kidney fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:S16.
- [38] Hadjipanayi E, Bauer AT, Moog P, Salgin B, Kuekrek H, Fersch B, Hopfner U, Meissner T, Schluter A, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF. Cell-free carrier system for localized delivery of peripheral blood cell-derived engineered factor signaling: towards development of a one-step device for autologous angiogenic therapy. *J Control Release* 2013;169:91-102.
- [39] Hadjipanayi E, Brown RA, Mudera V, Deng D, Liu W, Cheema U. Controlling physiological angiogenesis by hypoxia-induced signaling. *J Control Release* 2010;146:309-17.
- [40] Hadjipanayi E, Cheema U, Hopfner U, Bauer A, Machens HG, Schilling AF. Injectable system for spatio-temporally controlled delivery of hypoxia-induced angiogenic signalling. *J Control Release* 2012;161:852-60.
- [41] Hadjipanayi E, Cheema U, Mudera V, Deng D, Liu W, Brown RA. First implantable device for hypoxia-mediated angiogenic induction. *J Control Release* 2011;153:217-24.
- [42] Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P, Bauer AT, Kuekrek H, Mirzoyan L, Hummel A, Kirchhoff K, Salgin B, Isenburg S, Dornseifer U, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF. The

- Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control. *PLoS One* 2015;10:e0135618.
- [43] Hadjipanayi E, Schilling AF. Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: the dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration. *Organogenesis* 2013;9:261-72.
- [44] Hadjipanayi E, Schilling AF. Regeneration through autologous hypoxia preconditioned plasma. *Organogenesis* 2014;10:164-9.
- [45] Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003;107:1359-65.
- [46] Hickey MM, Simon MC. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol* 2006;76:217-57.
- [47] Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998;95:365-77.
- [48] Hoetzenecker K, Assinger A, Lichtenauer M, Mildner M, Schweiger T, Starlinger P, Jakab A, Berenyi E, Pavo N, Zimmermann M, Gabriel C, Plass C, Gyongyosi M, Volf I, Ankersmit HJ. Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) attenuates microvascular obstruction in a porcine closed chest reperfused acute myocardial infarction model: role of platelet aggregation and vasodilation. *Basic Res Cardiol* 2012;107:292.
- [49] Holzinger C, Zuckermann A, Kopp C, Schollhammer A, Imhof M, Zwolfer W, Baumgartner I, Magometschnigg H, Weissinger E, Wolner E. Treatment of non-healing skin ulcers with autologous activated mononuclear cells. *Eur J Vasc Surg* 1994;8:351-6.
- [50] <https://www.macfacecharts.com/wp-content/uploads/2010/10/blankfacechart-landscape.jpg>, 22.09.2019.
- [51] Hu CJ, Chen SD, Yang DI, Lin TN, Chen CM, Huang TH, Hsu CY. Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1519-26.
- [52] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
- [53] Izzedine H, Rixe O, Billefont B, Baumelou A, Deray G. Angiogenesis inhibitor therapies: focus on kidney toxicity and hypertension. *Am J Kidney Dis* 2007;50:203-18.
- [54] Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-39.
- [55] Klein-Soyer C, Duhamel-Clerin E, Ravanat C, Orvain C, Lanza F, Cazenave JP. PF4 inhibits thrombin-stimulated MMP-1 and MMP-3 metalloproteinase expression in human vascular endothelial cells. *C R Acad Sci III* 1997;320:857-68.
- [56] Koenig W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost* 2003;89:601-9.
- [57] Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 α and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res* 2010;180:15-34.
- [58] Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:3118-26.
- [59] Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Ohshima M, Qin SL, Hamano K. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H590-5.
- [60] Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp AM, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ. Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6:2941-50.

- [61] Lasagni L, Grepin R, Mazzinghi B, Lazzeri E, Meini C, Sagrinati C, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Alain-Courtois N, Ballerini L, Netti GS, Maggi E, Annunziato F, Serio M, Romagnani S, Bikfalvi A, Romagnani P. PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* 2007;109:4127-34.
- [62] Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006;4:932-9.
- [63] Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 2002;6:1-12.
- [64] Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006627.
- [65] Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005;51:2415-8.
- [66] Levy AP. A cellular paradigm for the failure to increase vascular endothelial growth factor in chronically hypoxic states. *Coron Artery Dis* 1999;10:427-30.
- [67] Loeffen R, Spronk HM, ten Cate H. The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2012;10:1207-16.
- [68] Lorusso V. Bevacizumab in the treatment of HER2-negative breast cancer. *Biologics* 2008;2:813-21.
- [69] Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Sola I, Exposito JA, Bolibar I, Rodriguez L, Garcia J. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:Cd006899.
- [70] Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4563-8.
- [71] Maurer AM, Zhou B, Han ZC. Roles of platelet factor 4 in hematopoiesis and angiogenesis. *Growth Factors* 2006;24:242-52.
- [72] Modarai B, Burnand KG, Humphries J, Waltham M, Smith A. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Haemost* 2005;93:801-9.
- [73] Mohamed KM, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV. Correlation between VEGF and HIF-1alpha expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2004;76:143-52.
- [74] Mollet NR, Dymarkowski S, Volders W, Wathiong J, Herbots L, Rademakers FE, Bogaert J. Visualization of ventricular thrombi with contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 2002;106:2873-6.
- [75] Monroe DM, Hoffman M. The clotting system - a major player in wound healing. *Haemophilia* 2012;18 Suppl 5:11-6.
- [76] Montesano R, Mossaz A, Ryser JE, Orci L, Vassalli P. Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. *J Cell Biol* 1984;99:1706-15.
- [77] Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:31189-95.
- [78] Nauta TD, van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Hypoxic Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* 2014;15:19791-815.
- [79] Ozturk A, Kucukardali Y, Tangi F, Erikci A, Uzun G, Bashekim C, Sen H, Terekeci H, Narin Y, Ozyurt M, Ozkan S, Sayan O, Rodop O, Nalbant S, Sildiroglu O, Yalniz FF, Senkal IV, Sabuncu H, Oktenli C. Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia. *J Diabetes Complications* 2012;26:29-33.
- [80] Panutsopoulos D, Zafiroopoulos A, Krambovitis E, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Spandidos DA. Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. *J Transl Med* 2003;1:6.

- [81] Park K. Engineered cell/matrix platform for hypoxia-induced angiogenesis. *J Control Release* 2011;153:197.
- [82] Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin MF, Lee FS. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med* 2008;358:162-8.
- [83] Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, Jr., Michel LV, Fox L, Klement GL, Folkman J. Normal ranges of angiogenesis regulatory proteins in human platelets. *American journal of hematology* 2010;85:487-93.
- [84] Pichiule P, LaManna JC. Angiopoietin-2 and rat brain capillary remodeling during adaptation and deadaptation to prolonged mild hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 2002;93:1131-9.
- [85] Rankin EB, Wu C, Khatri R, Wilson TL, Andersen R, Araldi E, Rankin AL, Yuan J, Kuo CJ, Schipani E, Giaccia AJ. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell* 2012;149:63-74.
- [86] Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012;49:35-43.
- [87] Rhee JS, Black M, Schubert U, Fischer S, Morgenstern E, Hammes HP, Preissner KT. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost* 2004;92:394-402.
- [88] Roche. *Lexikon Medizin*. München, Jena: Urban & Fischer; 2003; 81, 611, 895.
- [89] Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 2000;96:3772-8.
- [90] Sahni A, Odrliin T, Francis CW. Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 1998;273:7554-9.
- [91] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-50.
- [92] Sebag J, McMeel JW. Diabetic retinopathy. Pathogenesis and the role of retina-derived growth factor in angiogenesis. *Survey of ophthalmology* 1986;30:377-84.
- [93] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
- [94] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
- [95] Skosey JL, Chow DC, Nusinow S, May J, Gestautas V, Niwa Y. Effect of oxygen tension on human peripheral blood leukocytes: lysosomal enzyme release and metabolic responses during phagocytosis. *J Cell Biol* 1981;88:358-63.
- [96] Staples KJ, Sotoodehnejadnematlahi F, Pearson H, Frankenberger M, Francescut L, Ziegler-Heitbrock L, Burke B. Monocyte-derived macrophages matured under prolonged hypoxia transcriptionally up-regulate HIF-1alpha mRNA. *Immunobiology* 2011;216:832-9.
- [97] Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res* 2000:224-37.
- [98] Tang J, Ai J, Macdonald RL. Developing a model of chronic subdural hematoma. *Acta Neurochir Suppl* 2011;111:25-9.
- [99] Tayebjee MH, Lip GY, MacFadyen RJ. Collateralization and the response to obstruction of epicardial coronary arteries. *Qjm* 2004;97:259-72.
- [100] Tenan M, Fulci G, Albertoni M, Diserens AC, Hamou MF, El Atifi-Borel M, Feige JJ, Pepper MS, Van Meir EG. Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med* 2000;191:1789-98.
- [101] Thachil J. The prothrombotic potential of platelet factor 4. *Eur J Intern Med* 2010;21:79-83.
- [102] Thompson WD, Harvey JA, Kazmi MA, Stout AJ. Fibrinolysis and angiogenesis in wound healing. *J Pathol* 1991;165:311-8.
- [103] Timar J, Dome B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 2001;7:85-94.
- [104] Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:40-6.

- [105] van Weel V, Seghers L, de Vries MR, Kuiper EJ, Schlingemann RO, Bajema IM, Lindeman JH, Delis-van Diemen PM, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH. Expression of vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor-1, and CXCR4 in human limb muscle with acute and chronic ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1426-32.
- [106] Verhoef C, de Wilt JH, Verheul HM. Angiogenesis inhibitors: perspectives for medical, surgical and radiation oncology. *Curr Pharm Des* 2006;12:2623-30.
- [107] Weijers EM, van Wijhe MH, Joosten L, Horrevoets AJ, de Maat MP, van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Molecular weight fibrinogen variants alter gene expression and functional characteristics of human endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2010;8:2800-9.
- [108] Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 2004;2:37-45.
- [109] Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001;3:371-84.
- [110] Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1015-26.
- [111] Zamolodchikov D, Strickland S. Abeta delays fibrin clot lysis by altering fibrin structure and attenuating plasminogen binding to fibrin. *Blood* 2012;119:3342-51.
- [112] Zhang W, Huang W, Jing F. Contribution of blood platelets to vascular pathology in Alzheimer's disease. *J Blood Med* 2013;4:141-7.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

bEGF	basic epidermal growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMI	Body mass index
Ca ²⁺	Calcium
CD36	Cluster of differentiation 36, CD-Antigen 36
CD47	Cluster of differentiation 47, CD-Antigen 47
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL4	C-X-C motif ligand 4, Chemokin
d	Tage (Einheit)
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	F-Wert in der Varianzanalyse
FGF	Fibroblast growth factor
FnE	Fibrin fragment E
FSF	Fibrinstabilisierender Faktor = Faktor XIII
g	Gramm (Einheit)
h	Stunde (Einheit)
HCM	Hemostatic components model
HIF	Hypoxia-inducible factor
HPP	Hypoxia preconditioned plasma
IL 8	Interleukin 8
M	arithmetischer Mittelwert
ml	Milliliter (Einheit)
MMP	Matrix-Metalloprotease
ng	Nanogramm (Einheit)
NO	Stickstoffmonoxid
p	p-Wert
PBCs	Peripheral blood cells
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PF4	Platelet factor 4
pg	Pikogramm (Einheit)
PIGF	Placental growth factor
PRFM	Platelet rich fibrin matrix
PRP	Platelet rich plasma
Rpm	Rounds per minute
SD	Standard deviation = Standardabweichung
t	T-Wert im T-Test
TGF β	Transforming growth factor β
TSP1	Thrombospondin 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der Sedimentation.....	9
Abb. 2: Zusammenfassender Versuchsaufbau.....	13
Abb. 3: Sedimentation der Erythrozyten über eine Zeitperiode von insgesamt acht Tagen.....	14
Abb. 4: Blutbestandteile nach Sedimentation	15
Abb. 5: 24-Well-Platte	15
Abb. 6: Beispielsweiser Aufbau eines Versuchsansatzes	16
Abb. 7: 15 ml -Tube (mit jeweils 1 ml enthaltener PBS-Lösung und dem extrahierten Fibringel).....	17
Abb. 8: Extrahierte Fibringel-Matrix	17
Abb. 9: Einfluss der Inkubationszeit auf die Faktoren-Konzentration im Releasate ..	26
Abb. 10: Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibringel-Gewicht.....	28
Abb. 11: Einfluss von Rotation auf die Faktoren-Konzentration im Releasate/HPP ..	30
Abb. 12: Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate	36
Abb. 13: Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf das Fibringel-Gewicht.....	40
Abb. 14: Einfluss der Fibrinogen- und Thrombinkonzentration auf die Masse der Fibrinmatrix	41
Abb. 15: Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate	43
Abb. 16: HPP als injizierbares Biomaterial im Sinne eines regenerativen Face-lifts ..	61
Abb. 17: Zelluläre Mechanismen an der Injektionsstelle.....	62

7.3 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Verwendete Reagenzien	12
Tab. 2: Verwendetes Material	12
Tab. 3: Verwendete Geräte.....	13
Tab. 4: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 1	19
Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 2	20
Tab. 6: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 3	21
Tab. 7: Tabellarische Darstellung des Versuchsansatzes bei einer Zugabe von 0 ml Fibrinogen und 0,2 ml Thrombin für Experiment 4	22
Tab. 8: Tabellarische Darstellung des Versuchsansatzes bei Zugabe von jeweils 0,1 ml Fbrinogen und Thrombin für Experiment 4	22
Tab. 9: Tabellarische Darstellung des Versuchsansatzes bei Zugabe von jeweils 0,2 ml Fibrinogen und Thrombin für Experiment 4	23
Tab. 10: Tabellarische Darstellung der Versuchsansätze für Experiment 6	24

7.4 Daten und statistische Ergebnisse

7.4.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Releasate-Faktor-Konzentration

VEGF

	0 Tage	2 Tage	4 Tage	8 Tage
A	106,6	65,3	40,7	29,8
B	243,3	70,3	66	58,2
C	209,2	63,2	103	58,2
Mittelwert	186,366667	66,2666667	69,9	48,73333333
SD	71,1529573	3,64737348	31,3325709	16,3967476

TSP1

	0 Tage	2 Tage	4 Tage	8 Tage
A	1000*	311,4	100,2	39,2
B	1000*	211,4	130,2	51,2
C	1000*	128,6	125	33,6
Mittelwert	1000	217,1333333	119,1333333	41,33333333
SD	0	91,5347657	14,893399	8,99184816

* overflow gemessen, höchster Wert der Standardkurve als Ersatz

PF4

	0 Tage	2 Tage	4 Tage	8 Tage
A	533,95	339,3	259,95	148,4
B	934,8	297,25	308,25	237,85
C	695,95	279,35	481,2	183,45
Mittelwert	721,566667	305,3	349,8	189,9
SD	201,649054	30,7750305	116,330101	45,0724694

Deskriptive Statistik

Konzentration von TSP1 im Releasate

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0 Tage	3	1000,0000	,00000	,00000	1000,0000	1000,0000	1000,00	1000,00
2 Tage	3	217,1333	91,53477	52,84762	-10,2516	444,5183	128,60	311,40
4 Tage	3	119,1333	14,89340	8,59871	82,1361	156,1306	102,20	130,20
8 Tage	3	41,3333	8,99185	5,19145	18,9963	63,6703	33,60	51,20
Gesamtsumme	12	344,4000	402,62440	116,22765	88,5847	600,2153	33,60	1000,00

Varianzhomogenitätstest

Konzentration von TSP1 im Releasate

Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
3,985	3	8	,052

ANOVA

Konzentration von TSP1 im Releasate

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	1765807,920	3	588602,640	271,205	,000
Innerhalb der Gruppen	17362,560	8	2170,320		
Gesamtsumme	1783170,480	11			

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Konzentration von TSP1 im Releasate

Tukey-HSD

(I) Inkubationszeit in Tagen	(J) Inkubationszeit in Tagen	Mittelwertdifferenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95 % Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0 Tage	2 Tage	782,86667 [*]	38,03788	,000	661,0560	904,6773
	4 Tage	880,86667 [*]	38,03788	,000	759,0560	1002,6773
	8 Tage	958,66667 [*]	38,03788	,000	836,8560	1080,4773
2 Tage	0 Tage	-782,86667 [*]	38,03788	,000	-904,6773	-661,0560
	4 Tage	98,00000	38,03788	,121	-23,8107	219,8107
	8 Tage	175,80000 [*]	38,03788	,007	53,9893	297,6107
4 Tage	0 Tage	-880,86667 [*]	38,03788	,000	-1002,6773	-759,0560
	2 Tage	-98,00000	38,03788	,121	-219,8107	23,8107
	8 Tage	77,80000	38,03788	,249	-44,0107	199,6107
8 Tage	0 Tage	-958,66667 [*]	38,03788	,000	-1080,4773	-836,8560
	2 Tage	-175,80000 [*]	38,03788	,007	-297,6107	-53,9893
	4 Tage	-77,80000	38,03788	,249	-199,6107	44,0107

*. die Mittelwertdifferenz ist auf der Stufe 0.05 signifikant.

7.4.2 Einfluss der Inkubationszeit auf das Fibrigel-Gewicht ohne weitere Fibrinogen-Zugabe

	0 Tage	2 Tage	4 Tage	8 Tage
A	0,083	0,046	0,033	0,055
B	0,034	0,05	0,051	0,313
C	0,031	0,04	0,05	0,388
Mittelwert	0,03433333	0,04533333	0,04466667	0,252
SD	0,00351188	0,00503322	0,01011599	0,17467971

7.4.3 Einfluss von Rotation auf die Faktor-Konzentration im Releasate und im HPP

VEGF

	Keine Rotation HPP	Rotation HPP	Keine Rotation Releasate	Rotation Releasate
A	216	652,8	42,1	190,5
B	227,3	566,2	45,6	190,5
C	236,4	562,2	36,4	149,3
Mittelwert	226,566667	593,733333	41,366667	176,766667
SD	10,2197521	51,1923171	4,64363363	23,7868311

Retentions-Rate VEGF (Releasate/HPPx100)

	Keine Rotation	Rotation
A	19,4907407	29,1819853
B	20,0615926	33,645355
C	15,3976311	26,5563856
Mittelwert	18,3166548	29,7945753
SD	2,5440111	3,5839673

VEGF HPP vs. Releasate (ohne Rotation)

Gruppenstatistik

	Ausgangsmaterial	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
VEGF Konzentration	HPP	3	226,5667	10,21975	5,90038
ohne Rotation	Releasate	3	41,3667	4,64363	2,68100

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
VEGF Konzentration ohne Rotation	Varianzgleichheit angenommen	1,190	,337	28,576	4	,000	185,20000	6,48091	167,20610	203,19390
VEGF Konzentration mit Rotation	Varianzgleichheit nicht angenommen			28,576	2,792	,000	185,20000	6,48091	163,67811	206,72189

VEGF HPP vs. Releasate (mit Rotation)

Gruppenstatistik

	Ausgangsmaterial	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
VEGF Konzentration mit Rotation	HPP	3	593,7333	51,19232	29,55590
	Releasate	3	176,7667	23,78683	13,73333

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
VEGF Konzentration mit Rotation	Varianzgleichheit angenommen	3,723	,126	12,794	4	,000	416,96667	32,59073	326,48030	507,45303
VEGF Konzentration mit Rotation	Varianzgleichheit nicht angenommen			12,794	2,825	,001	416,96667	32,59073	309,52084	524,41249

VEGF HPP Rotation vs. keine Rotation

Gruppenstatistik

	Verfahrensweise im Versuchsaufbau	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
VEGF Konzentration im HPP	Keine Rotation	3	226,5667	10,21975	5,90038
	Rotation	3	593,7333	51,19232	29,55590

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Unterer	Oberer
VEGF Konzentration im HPP	9,658	,036	12,182	4	,000	-367,16667	30,13910	450,84623	283,48710
VEGF Konzentration im HPP			12,182	2,159	,005	-367,16667	30,13910	488,10152	246,23181

VEGF Releasate Rotation vs. keine Rotation

Gruppenstatistik

	Verfahrensweise im Versuchsaufbau	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
VEGF Releasate	Keine Rotation	3	41,3667	4,64363	2,68100
	Rotation	3	176,7667	23,78683	13,73333

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleich heit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- seiti g)	Mittelwertdiffer enz	Standardfehler differ enz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
VEGF	Varianzgleich	9,928	,034	-	4	,001	-135,40000	13,99258	-	-
Konzentration im	heit angenommen			9,67					7	62
Releasate	Varianzgleich	9,928	,034	-	2,15	,008	-135,40000	13,99258	-	-
heit nicht	angenommen			9,67					7	24

TSP1

	Keine Rotation HPP	Rotation HPP	Keine Rotation Releasate	Rotation Releasate
A	535,8	584	103,2	47,8
B	736,4	111	131,2	44
C	717	100,4	96,6	33
Mittelwert	663,066667	265,133333	110,333333	41,6
SD	110,642186	276,19749	18,3699029	7,68635154

Retentions-Rate TSP1 (Releasate/HPPx100)

	Keine Rotation	Rotation
A	19,2609183	8,18493151
B	17,8164041	39,6396396
C	13,4728033	32,8685259
Mittelwert	16,8500419	26,897699
SD	3,01263348	16,5555956

TSP1 HPP vs. Releasate (ohne Rotation)

Gruppenstatistik

	Ausgangsmaterial	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
TSP1 Konzentration ohne Rotation	HPP Releasate	3 3	663,0667 110,3333	110,64219 18,36990	63,87930 10,60587

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleich heit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2- seiti g)	Mittelwertdiffer enz	Standardfehlerdiffer enz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Unterer	Oberer
TSP1 Konzentration ohne Rotation	10,124	,033	8,536	4	,001	552,73333	64,75376	372,94809	732,51858
Rotation			8,536	2,110	,011	552,73333	64,75376	287,60705	817,85962

TSP1 HPP vs. Releasate (mit Rotation)

Gruppenstatistik

	Ausgangsmaterial	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
TSP1 Konzentration mit Rotation	HPP Releasate	3 3	265,1333 41,6000	276,19749 7,68635	159,46270 4,43772

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
TSP1 Konzentration mit Rotation	Varianzgleichheit angenommen	15,081	,018	1,401	4	,234	223,53333	159,52443	-219,37750	666,44416
Rotation	Varianzgleichheit nicht angenommen			1,401	2,003	,296	223,53333	159,52443	-461,82867	908,89534

TSP1 HPP Rotation vs. keine Rotation

Gruppenstatistik

	Verfahrensweise im Versuchsaufbau	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
TSP1 Konzentration im HPP	Keine Rotation	3	663,0667	110,64219	63,87930
	Rotation	3	265,1333	276,19749	159,46270

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
TSP1 Konzentration im HPP	Varianzgleichheit angenommen	4,922	,091	2,317	4	,081	397,93333	171,78159	-79,00883	874,87550
	Varianzgleichheit nicht angenommen			2,317	2,626	,116	397,93333	171,78159	-195,58495	991,45162

TSP1 Releasate Rotation vs. keine Rotation

Gruppenstatistik

	Verfahrensweise im Versuchsaufbau	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
TSP1 Konzentration im Releasate	Keine Rotation	3	110,3333	18,36990	10,60587
	Rotation	3	41,6000	7,68635	4,43772

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleich heit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- seiti g)	Mittelwertdiffer enz	Standardfehlerdiffer enz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
TSP1	Varianzgleich	3,523	,134	5,97	4	,004	68,73333	11,49686	36,812	100,653
Konzentration im	heit angenommen			8					93	73
Releasate	Varianzgleich			5,97	2,67	,013	68,73333	11,49686	29,540	107,926
	heit nicht angenommen	8	9	14	53					

PF4

	Keine Rotation HPP	Rotation HPP	Keine Rotation Releasate	Rotation Releasate
A	1143,9	1140,8	291,45	222,75
B	1491,65	1248,9	304,35	218,55
C	1436,4	981,45	284,45	166,3
Mittelwert	1357,31667	1123,71667	293,416667	202,533333
SD	186,877355	134,540908	10,0947181	31,4491786

Retentions-Rate PF4 (Releasate/HPPx100)

	Keine Rotation	Rotation
A	25,4786258	19,5257714
B	20,4035799	17,4993995
C	19,8029797	16,9443171
Mittelwert	21,8950618	17,9898293
SD	3,11795257	1,35881112

PF4 HPP vs. Releasate (ohne Rotation)

Gruppenstatistik

	Ausgangsmaterial	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
PF4 Konzentration ohne Rotation	HPP Releasate	3 3	1357,3167 293,4167	186,87736 10,09472	107,89369 5,82819

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleich heit	T-Test für die Mittelwertgleichheit								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- seiti g)	Mittelwertdiffer enz	Standardfehlerdiffe renz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
PF4 Konzentration ohne Rotation	Varianzgleich heit angenommen	11,93 3	,026	9,84 6	4	,001	1063,90000	108,05099	763,902 36	1363,897 64
Rotation	Varianzgleich heit nicht angenommen			9,84 6	2,01 2	,010	1063,90000	108,05099	601,569 43	1526,230 57

PF4 HPP vs. Releasate (mit Rotation)

Gruppenstatistik

	Ausgangsmaterial	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
PF4 Konzentration mit Rotation	HPP Releasate	3 3	1123,7167 202,5333	134,54091 31,44918	77,67723 18,15719

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
PF4 Konzentration mit Rotation	Varianzgleichheit angenommen	3,175	,149	11,548	4	,000	921,18333	79,77114	699,70313	1142,66354
Rotation	Varianzgleichheit nicht angenommen			11,548	2,218	,005	921,18333	79,77114	608,32969	1234,03698

PF4 HPP Rotation vs. keine Rotation

Gruppenstatistik

	Verfahrensweise im Versuchsaufbau	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
PF4 Konzentration im HPP	Keine Rotation	3	1357,3167	186,87736	107,89369
	Rotation	3	1123,7167	134,54091	77,67723

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-seitig)	Mittelwertdifferenz	Standardfehlerdifferenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
PF4 Konzentration im HPP	Varianzgleichheit angenommen	,736	,439	1,757	4	,154	233,60000	132,94661	-135,51896	602,71896
	Varianzgleichheit nicht angenommen			1,757	3,634	,161	233,60000	132,94661	-150,64229	617,84229

PF4 Releasate Rotation vs. keine Rotation

Gruppenstatistik

	Verfahrensweise im Versuchsaufbau	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert
PF4 Konzentration im Releasate	Keine Rotation	3	293,4167	10,09472	5,82819
	Rotation	3	202,5333	31,44918	18,15719

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleich heit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- seiti g)	Mittelwertdiffer enz	Standardfehlerdiffer enz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Unterer	Oberer
PF4	Varianzgleich	6,274	,066	4,76	4	,009	90,88333	19,06965	37,937	143,829
Konzentration im	heit angenommen			6					51	16
Releasate	Varianzgleich			4,76	2,40	,028	90,88333	19,06965	20,811	160,955
heit nicht	heit nicht angenommen	6	8	54	13					

7.4.4 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei verschiedenen Retentionszeiten

VEGF 0 ml Fibrinogen/0,2 ml Thrombin

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	29,8	29,8	37,1	56,8
B	81,6	31,5	68,8	46,3
C	40,7	29,8	100,1	101,6
Mittelwert	50,7	30,3666667	68,6666667	68,2333333
SD	27,3095221	0,98149546	31,5002116	29,3694285

VEGF 0,1 ml Fibrinogen/0,1 ml Thrombin

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	29,8	37,1	47	51,9
B	49,1	51,2	59,7	56,1
C	108,7	64,6	114,5	139,8
Mittelwert	62,5333333	50,9666667	73,7333333	82,6
SD	41,1295919	13,7514848	35,8714836	49,5811456

VEGF 0,2 ml Fibrinogen/0,2 ml Thrombin

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	40,7	58,2	48,4	63,9
B	63,9	81,6	56,1	54
C	126	105,9	85,9	102,3
Mittelwert	76,8666667	81,9	63,4666667	73,4
SD	44,1035524	23,8514151	19,8056389	25,5129379

VEGF Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

Deskriptive Statistik

VEGF Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
					0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	3		
0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	3	50,9667	13,75148	7,93942	16,8061	85,1272	37,10	64,60
0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	3	81,9000	23,85142	13,77062	22,6498	141,1502	58,20	105,90
Gesamtsumme	9	54,4111	26,35059	8,78353	34,1563	74,6660	29,80	105,90

Varianzhomogenitätstest

VEGF Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
2,135	2	6	,199

ANOVA

VEGF Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	4036,916	2	2018,458	7,979	,020
Innerhalb der Gruppen	1517,913	6	252,986		
Gesamtsumme	5554,829	8			

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: VEGF Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

Tukey-HSD

(I) Konzentration von Fibrinogen und Thrombin	(J) Konzentration von Fibrinogen und Thrombin	Mittelwertdifferenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95 % Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	-20,60000	12,98680	,321	-60,4471	19,2471
	0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	-51,53333 [*]	12,98680	,017	-91,3804	-11,6863
0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	20,60000	12,98680	,321	-19,2471	60,4471
	0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	-30,93333	12,98680	,119	-70,7804	8,9137
0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	51,53333 [*]	12,98680	,017	11,6863	91,3804
	0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	30,93333	12,98680	,119	-8,9137	70,7804

*. die Mittelwertdifferenz ist auf der Stufe 0.05 signifikant.

TSP1 0 ml Fibrinogen/0,2 ml Thrombin (Werte x2)

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	23,6	33	44,4	66,2
B	68,6	32,2	51,2	64,4
C	24	15,2*	41,6	36,4
Mittelwert	38,7333333	26,8	45,7333333	55,6666667
SD	25,8660653	10,053855	4,93693562	16,7096778

* Underflow: $7,6 \times 2 = 15,2$

TSP1 0,1 ml Fibrinogen/0,1 ml Thrombin (Werte x2)

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	21,2	33	50,2	57,8
B	36	32,6	38,8	54,6
C	29,2	17	41,6	41,6
Mittelwert	28,8	27,53333333	43,53333333	51,33333333
SD	7,40810367	9,12432646	5,94081925	8,57982129

TSP1 0,2 ml Fibrinogen/0,2 ml Thrombin (Werte x2)

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	51,6	74,2	57,8	71
B	80,2	81,6	66,2	74,6
C	81,2	82	57,4	72,4
Mittelwert	71	79,26666667	60,46666667	72,66666667
SD	16,8083313	4,39241771	4,96923871	1,81475435

Deskriptive Statistik

TSP1 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
Oml Fibrinogen/0,2ml Thrombin 0,1ml	3	26,8000	10,05385	5,80460	1,8248	51,7752	15,20	33,00
Fibrinogen/0,1ml Thrombin 0,2ml	3	27,5333	9,12433	5,26793	4,8672	50,1994	17,00	33,00
Fibrinogen/0,2ml Thrombin	3	79,2667	4,39242	2,53596	68,3553	90,1780	74,20	82,00
Gesamtsumme	9	44,5333	27,01129	9,00376	23,7706	65,2961	15,20	82,00

Varianzhomogenitätstest

TSP1 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
2,152	2	6	,197

ANOVA

TSP1 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	5429,627	2	2714,813	39,997	,000
Innerhalb der Gruppen	407,253	6	67,876		
Gesamtsumme	5836,880	8			

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: TSP1 Konzentration im Releasate bei einer

Retentionszeit von 2h

Tukey-HSD

(I) Konzentration von Fibrinogen und Thrombin	(J) Konzentration von Fibrinogen und Thrombin	Mittelwertdifferenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95 % Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	-,73333	6,72684	,993	-21,3731	19,9065
	0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	-52,46667 [*]	6,72684	,001	-73,1065	-31,8269
0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	,73333	6,72684	,993	-19,9065	21,3731
	0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	-51,73333 [*]	6,72684	,001	-72,3731	-31,0935
0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	52,46667 [*]	6,72684	,001	31,8269	73,1065
	0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	51,73333 [*]	6,72684	,001	31,0935	72,3731

*. die Mittelwertdifferenz ist auf der Stufe 0.05 signifikant.

PF4 0 ml Fibrinogen/0,2 ml Thrombin (Werte x50 bzw. #x20)

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	367,72(#)	105,3	154,5	212,05
B	268,05	118,25	243,3	122,05
C	131,85	227,02 (#)	320,05	256,85
Mittelwert	255,873333	150,19	239,283333	196,983333
SD	118,405522	66,8510456	82,8480587	68,6513899

PF4 0,1 ml Fibrinogen/0,1 ml Thrombin (Werte x50)

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	118,8	143,95	224,55	233
B	163,5	166,9	301,1	267,4
C	292,1	155,65	299,2	387,4
Mittelwert	191,466667	155,5	274,95	295,933333
SD	89,9712361	11,4757353	43,6580176	81,0583329

PF4 0,2 ml Fibrinogen/0,2 ml Thrombin (Werte x50)

	1 h	2 h	4 h	8 h
A	160,1	250,05	174,25	266,15
B	222,15	248,2	216,8	217,4
C	367,9	323,35	250,65	295,3
Mittelwert	250,05	273,866667	213,9	259,616667
SD	106,672478	42,8638056	38,2824699	39,3588088

PF4 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

Deskriptive Statistik

PF4 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
0ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	3	150,1900	66,85105	38,59647	-15,8772	316,2572	105,30	227,02
0,1ml Fibrinogen/0,1ml Thrombin	3	155,5000	11,47574	6,62552	126,9927	184,0073	143,95	166,90
0,2ml Fibrinogen/0,2ml Thrombin	3	273,8667	42,86381	24,74743	167,3871	380,3463	248,20	323,35
Gesamtsumme	9	193,1856	72,63858	24,21286	137,3506	249,0205	105,30	323,35

Varianzhomogenitätstest

PF4 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
5,501	2	6	,044

Zuverlässige Tests auf Gleichheit der Mittelwerte

PF4 Konzentration im Releasate bei einer Retentionszeit von 2h

	Statistik ^a	df1	df2	Sig.
Welch	8,733	2	2,915	,059

a. Asymptotisch F-verteilt.

TSP1-Konzentration bei verschiedenen Retentionszeiten für Zugaben von 0 ml/0,2 ml sowie 0,1 ml/0,1 ml

Deskriptive Statistik

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
					Konzentration von TSP1 bei 0 ml Fibrinogen / 0,2 ml Thrombin	3		
	3	26,8000	10,05385	5,80460	1,8248	51,7752	15,20	33,00
	4	45,7333	4,93694	2,85034	33,4693	57,9974	41,60	51,20
	8	55,6667	16,70968	9,64734	14,1575	97,1758	36,40	66,20
Gesamtsumme	1	41,7333	17,77093	5,13003	30,4422	53,0244	15,20	68,60
	2							
Konzentration von TSP1 bei 0,1 ml Fibrinogen/ 0,1 ml Thrombin	3	28,8000	7,40810	4,27707	10,3973	47,2027	21,20	36,00
	3	27,5333	9,12433	5,26793	4,8672	50,1994	17,00	33,00
	4	43,5333	5,94082	3,42993	28,7755	58,2911	38,80	50,20
	8	51,3333	8,57982	4,95356	30,0199	72,6468	41,60	57,80
Gesamtsumme	1	37,8000	12,43660	3,59014	29,8982	45,7018	17,00	57,80
	2							

Varianzhomogenitätstest

	Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
Konzentration von TSP1 bei 0 ml Fibrinogen / 0,2 ml Thrombin	4,841	3	8	,033
Konzentration von TSP1 bei 0,1 ml Fibrinogen/ 0,1 ml Thrombin	,415	3	8	,747

ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Konzentration von TSP1 bei 0 ml Fibrinogen / 0,2 ml Thrombin	Zwischen Gruppen	1326,427	3	442,142	1,647	,254
	Innerhalb der Gruppen	2147,440	8	268,430		
	Gesamtsumme	3473,867	11			
Konzentration von TSP1 bei 0,1 ml Fibrinogen/ 0,1 ml Thrombin	Zwischen Gruppen	1207,280	3	402,427	6,516	,015
	Innerhalb der Gruppen	494,080	8	61,760		
	Gesamtsumme	1701,360	11			

Zuverlässige Tests auf Gleichheit der Mittelwerte

		Statistik ^a	df1	df2	Sig.
Konzentration von TSP1 bei 0 ml Fibrinogen / 0,2 ml Thrombin	Welch	2,608	3	3,887	,192
Konzentration von TSP1 bei 0,1 ml Fibrinogen/ 0,1 ml Thrombin	Welch	4,687	3	4,384	,076

a. Asymptotisch F-verteilt.

Mehrfachvergleiche

Tukey-HSD

Abhängige Variable	(I) Retentionszeit	(J) Retentionszeit	Mittelwertdifferenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95 % Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Konzentration von TSP1 bei 0 ml Fibrinogen / 0,2 ml Thrombin	1	2	11,93333	13,37734	,809	-30,9056	54,7723
		4	-7,00000	13,37734	,951	-49,8390	35,8390
		8	-16,93333	13,37734	,607	-59,7723	25,9056
	2	1	-11,93333	13,37734	,809	-54,7723	30,9056
		4	-18,93333	13,37734	,525	-61,7723	23,9056
		8	-28,86667	13,37734	,215	-71,7056	13,9723
	4	1	7,00000	13,37734	,951	-35,8390	49,8390
		2	18,93333	13,37734	,525	-23,9056	61,7723
		8	-9,93333	13,37734	,877	-52,7723	32,9056
	8	1	16,93333	13,37734	,607	-25,9056	59,7723
		2	28,86667	13,37734	,215	-13,9723	71,7056
		4	9,93333	13,37734	,877	-32,9056	52,7723
Konzentration von TSP1 bei 0,1 ml Fibrinogen/ 0,1 ml Thrombin	1	2	1,26667	6,41665	,997	-19,2817	21,8150
		4	-14,73333	6,41665	,178	-35,2817	5,8150
		8	-22,53333 [*]	6,41665	,032	-43,0817	-1,9850
	2	1	-1,26667	6,41665	,997	-21,8150	19,2817
		4	-16,00000	6,41665	,136	-36,5484	4,5484
		8	-23,80000 [*]	6,41665	,025	-44,3484	-3,2516
	4	1	14,73333	6,41665	,178	-5,8150	35,2817
		2	16,00000	6,41665	,136	-4,5484	36,5484
		8	-7,80000	6,41665	,635	-28,3484	12,7484
	8	1	22,53333 [*]	6,41665	,032	1,9850	43,0817
		2	23,80000 [*]	6,41665	,025	3,2516	44,3484
		4	7,80000	6,41665	,635	-12,7484	28,3484

*. die Mittelwertdifferenz ist auf der Stufe 0.05 signifikant.

7.4.5 Einfluss der Fibrinogen- und Thrombin-Konzentration auf das Fibringel-Gewicht

	0/0,2 ml	0,1/0,1ml	0,2/0,2ml
Gewicht	0,05	0,164	0,256
	0,119	0,184	0,219
	0,061	0,221	0,293
	0,052	0,128	0,283
	0,024	0,191	0,353
	0,02	0,164	0,349
	0,078	0,177	0,249
	0,137	0,214	0,311
	0,081	0,227	0,302
	0,188	0,289	0,443
	0,208	0,262	0,341
	0,157	0,323	0,391
	0,05	0,164	0,256
Mittelwert	0,09791667	0,212	0,31583333
SD	0,06301581	0,05654765	0,06337024

Deskriptive Statistik

Gewicht des Fibringels

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
					0/0,2	12		
0,1/0,1	12	,21200	,056548	,016324	,17607	,24793	,128	,323
0,2/0,2	12	,31583	,063370	,018293	,27557	,35610	,219	,443
Gesamtsumme	36	,20858	,107990	,017998	,17204	,24512	,020	,443

Varianzhomogenitätstest

Gewicht des Fibringels

Levene-Statistik	df1	df2	Sig.
,237	2	33	,790

ANOVA

Gewicht des Fibringels

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	,285	2	,143	38,241	,000
Innerhalb der Gruppen	,123	33	,004		
Gesamtsumme	,408	35			

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: Gewicht des Fibringels

Tukey-HSD

(I) Konzentration Fibrinogen und Thrombin	(J) Konzentration Fibrinogen und Thrombin	Mittelwertdifferenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95 % Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0/0,2	0,1/0,1	-,114083 [*]	,024927	,000	-,17525	-,05292
	0,2/0,2	-,217917 [*]	,024927	,000	-,27908	-,15675
0,1/0,1	0/0,2	,114083 [*]	,024927	,000	,05292	,17525
	0,2/0,2	-,103833 [*]	,024927	,001	-,16500	-,04267
0,2/0,2	0/0,2	,217917 [*]	,024927	,000	,15675	,27908
	0,1/0,1	,103833 [*]	,024927	,001	,04267	,16500

*. die Mittelwertdifferenz ist auf der Stufe 0.05 signifikant.

7.4.6 Einfluss der Releasezeit auf die Faktorenkonzentration im Releasate bei maximaler Bindungskapazität

VEGF

	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
A	29,8	48,4	56,1	54,7	57,5
B	36,4	55,4	53,3	68,1	66
C	74,5	101,6	89,4	102,3	100,1
Mittelwert	46,9	68,4666667	66,2666667	75,0333333	74,5333333
SD	24,1290282	28,9069772	20,0829115	24,5457396	22,5455835

Deskriptive Statistik								
Konzentration von VEGF im Releasate								
	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
2h	3	46,9000	24,12903	13,93090	-13,0398	106,8398	29,80	74,50
4h	3	68,4667	28,90698	16,68945	-3,3422	140,2756	48,40	101,60
8h	3	66,2667	20,08291	11,59487	16,3779	116,1554	53,30	89,40
12h	3	75,0333	24,54574	14,17149	14,0583	136,0083	54,70	102,30
24h	3	74,5333	22,54558	13,01670	18,5270	130,5397	57,50	100,10
Gesamt	15	66,2400	23,05146	5,95186	53,4745	79,0055	29,80	102,30

Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Std.-Abweichung	N
Zeit2h	46,9000	24,12903	3
Zeit4h	68,4667	28,90698	3
Zeit8h	66,2667	20,08291	3
Zeit12h	75,0333	24,54574	3
Zeit24h	74,5333	22,54558	3

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Zeit2h	,335	3	.	,858	3	,262
Zeit4h	,341	3	.	,847	3	,232
Zeit8h	,360	3	.	,808	3	,133
Zeit12h	,278	3	.	,940	3	,528
Zeit24h	,314	3	.	,893	3	,362

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Maß: MEASURE_1

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approx. Chi-Quadrat			Sig.	Greenhouse-Geisser		Epsilon ^b	
		df	Sig.	df		Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze	
Releasezeit	,000	.	.	9	.	,418	1,000	.	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.^a

a. Design: Konstanter Term

Innersubjektdesign: Releasezeit

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Innersubjektfaktoren

Maß: MEASURE_1

Releasezeit	Abhängige Variable
1	Zeit2h
2	Zeit4h
3	Zeit8h
4	Zeit12h
5	Zeit24h

Tests der Innersubjekteffekte

Maß: MEASURE_1

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	
Releasezeit	Sphärizität angenommen	1575,289	4	393,822	20,880	,000	
	Greenhouse-Geisser	1575,289	1,671	942,883	20,880	,014	
	Huynh-Feldt	1575,289	4,000	393,822	20,880	,000	
	Untergrenze	1575,289	1,000	1575,289	20,880	,045	
Fehler(Releasezeit)	Sphärizität angenommen	150,891	8	18,861			
	Greenhouse-Geisser	150,891	3,341	45,158			
	Huynh-Feldt	150,891	8,000	18,861			
	Untergrenze	150,891	2,000	75,445			

Paarweise Vergleiche

Maß: MEASURE_1

(I)Releasezeit	(J)Releasezeit	Mittlere Differenz (I-J)	Standard Fehler	Sig. ^b	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^b	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-21,567	2,769	,161	-60,580	17,447
	3	-19,367	3,514	,314	-68,881	30,148
	4	-28,133*	1,970	,049	-55,890	-,377
	5	-27,633*	1,155	,017	-43,909	-11,358
2	1	21,567	2,769	,161	-17,447	60,580
	3	2,200	5,745	1,000	-78,740	83,140
	4	-6,567	3,467	1,000	-55,409	42,275
	5	-6,067	3,808	1,000	-59,718	47,585
3	1	19,367	3,514	,314	-30,148	68,881
	2	-2,200	5,745	1,000	-83,140	78,740
	4	-8,767	5,113	1,000	-80,802	63,268
	5	-8,267	3,482	1,000	-57,318	40,785
4	1	28,133*	1,970	,049	,377	55,890
	2	6,567	3,467	1,000	-42,275	55,409
	3	8,767	5,113	1,000	-63,268	80,802
	5	,500	1,650	1,000	-22,750	23,750
5	1	27,633*	1,155	,017	11,358	43,909
	2	6,067	3,808	1,000	-47,585	59,718
	3	8,267	3,482	1,000	-40,785	57,318
	4	-,500	1,650	1,000	-23,750	22,750

Basiert auf den geschätzten Randmitteln

*. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

b. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

PF4

	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
A	180,55	266,15	320,05	347,4	360,3
B	202,6	261,2	293,4	358,95	335,95
C	308,9	458,95	409,45	442,4	432,8
Mittelwert	230,683333	328,766667	340,966667	382,916667	376,35
SD	68,6289723	112,769237	60,7867653	51,8367711	50,3803781

Deskriptive Statistik

Konzentration von PF4 im Releasate

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
					2h	3		
4h	3	328,7667	112,76924	65,10735	48,6324	608,9010	261,20	458,95
8h	3	340,9667	60,78677	35,09526	189,9640	491,9694	293,40	409,45
12h	3	382,9167	51,83677	29,92797	254,1470	511,6863	347,40	442,40
24h	3	376,3500	50,38038	29,08712	251,1982	501,5018	335,95	432,80
Gesamtsumme	15	331,9367	83,42670	21,54068	285,7365	378,1368	180,55	458,95

Innersubjektfaktoren

Maß: MEASURE_1

Releasezeit	Abhängige Variable
1	Zeit2h
2	Zeit4h
3	Zeit8h
4	Zeit12h
5	Zeit24h

Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Std.-Abweichung	N
Zeit2h	230,6833	68,62897	3
Zeit4h	328,7667	112,76924	3
Zeit8h	340,9667	60,78677	3
Zeit12h	382,9167	51,83677	3
Zeit24h	376,3500	50,38038	3

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Zeit2h	,325	3	.	,874	3	,308
Zeit4h	,377	3	.	,769	3	,042
Zeit8h	,301	3	.	,911	3	,422
Zeit12h	,345	3	.	,840	3	,213
Zeit24h	,292	3	.	,924	3	,466

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Maß: MEASURE_1

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approx. Chi- Quadrat	df	Sig.	Greenhouse- Geisser	Epsilon ^b	
						Huynh-Feldt	Untergrenze
Releasezeit	,000	.	9	.	,331	,729	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.^a

a. Design: Konstanter Term

Innersubjektdesign: Releasezeit

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tests der Innersubjekteffekte

Maß: MEASURE_1

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	
Releasezeit	Sphärizität angenommen	44745,996	4	11186,499	14,087	,001	
	Greenhouse-Geisser	44745,996	1,324	33800,117	14,087	,040	
	Huynh-Feldt	44745,996	2,916	15346,191	14,087	,004	
	Untergrenze	44745,996	1,000	44745,996	14,087	,064	
Fehler(Releasezeit)	Sphärizität angenommen	6352,769	8	794,096			
	Greenhouse-Geisser	6352,769	2,648	2399,369			
	Huynh-Feldt	6352,769	5,832	1089,380			
	Untergrenze	6352,769	2,000	3176,385			

Paarweise Vergleiche

Maß: MEASURE_1

(I)Releasezeit	(J)Releasezeit	Mittlere Differenz (I-J)	Standard Fehler	Sig. ^b	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^b	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-98,083	27,127	,687	-480,279	284,113
	3	-110,283	14,877	,177	-319,886	99,319
	4	-152,233*	9,845	,042	-290,939	-13,528
	5	-145,667	17,259	,137	-388,824	97,491
2	1	98,083	27,127	,687	-284,113	480,279
	3	-12,200	31,480	1,000	-455,717	431,317
	4	-54,150	35,669	1,000	-556,699	448,399
	5	-47,583	37,290	1,000	-572,958	477,792
3	1	110,283	14,877	,177	-99,319	319,886
	2	12,200	31,480	1,000	-431,317	455,717
	4	-41,950	11,910	,720	-209,754	125,854
	5	-35,383	6,053	,280	-120,667	49,900
4	1	152,233*	9,845	,042	13,528	290,939
	2	54,150	35,669	1,000	-448,399	556,699
	3	41,950	11,910	,720	-125,854	209,754
	5	6,567	10,474	1,000	-141,000	154,133
5	1	145,667	17,259	,137	-97,491	388,824
	2	47,583	37,290	1,000	-477,792	572,958
	3	35,383	6,053	,280	-49,900	120,667
	4	-6,567	10,474	1,000	-154,133	141,000

Basiert auf den geschätzten Randmitteln

*. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

b. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

TSP1

	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
A	31,2	50,6	64,4	71	98,4
B	38,2	42,6	39,2	99,4	105,2
C	41,2	63	60,2	102,8	87,2
Mittelwert	36,8666667	52,0666667	54,6	91,0666667	96,9333333
SD	5,13160144	10,2787807	13,50111111	17,4611951	9,08918772

Deskriptive Statistik

Konzentration von TSP1 im Releasate

	H	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
					2h	3		
4h	3	52,0667	10,27878	5,93446	26,5328	77,6006	42,60	63,00
8h	3	54,6000	13,50111	7,79487	21,0614	88,1386	39,20	64,40
12h	3	91,0667	17,46120	10,08123	47,6907	134,4427	71,00	102,80
24h	3	96,9333	9,08919	5,24764	74,3545	119,5121	87,20	105,20
Gesamtsumme	15	66,3067	26,29002	6,78805	51,7477	80,8656	31,20	105,20

Innersubjektfaktoren

Maß: MEASURE_1

Releasezeit	Abhängige Variable
1	Zeit2h
2	Zeit4h
3	Zeit8h
4	Zeit12h
5	Zeit24h

Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Std.-Abweichung	N
Zeit2h	36,8667	5,13160	3
Zeit4h	52,0667	10,27878	3
Zeit8h	54,6000	13,50111	3
Zeit12h	91,0667	17,46120	3
Zeit24h	96,9333	9,08919	3

Tests auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Zeit2h	,269	3	.	,949	3	,567
Zeit4h	,223	3	.	,985	3	,763
Zeit8h	,328	3	.	,871	3	,298
Zeit12h	,350	3	.	,829	3	,186
Zeit24h	,231	3	.	,980	3	,732

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Maß: MEASURE_1

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approx. Chi- Quadrat	df	Sig.	Greenhouse- Geisser	Epsilon ^b	
						Huynh-Feldt	Untergrenze
Releasezeit	,000	.	9	.	,463	1,000	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.^a

a. Design: Konstanter Term

Innersubjektdesign: Releasezeit

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tests der Innersubjekteffekte

Maß: MEASURE_1

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	
Releasezeit	Sphärizität angenommen	8272,763	4	2068,191	13,358	,001	
	Greenhouse-Geisser	8272,763	1,853	4465,457	13,358	,021	
	Huynh-Feldt	8272,763	4,000	2068,191	13,358	,001	
	Untergrenze	8272,763	1,000	8272,763	13,358	,067	
Fehler(Releasezeit)	Sphärizität angenommen	1238,581	8	154,823			
	Greenhouse-Geisser	1238,581	3,705	334,280			
	Huynh-Feldt	1238,581	8,000	154,823			
	Untergrenze	1238,581	2,000	619,291			

Paarweise Vergleiche

Maß: MEASURE_1

(I)Releasezeit	(J)Releasezeit	Mittlere Differenz (I-J)	Standard Fehler	Sig. ^a	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^a	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-15,200	5,444	1,000	-91,904	61,504
	3	-17,733	9,317	1,000	-148,999	113,533
	4	-54,200	7,201	,172	-155,654	47,254
	5	-60,067	7,034	,134	-159,163	39,030
2	1	15,200	5,444	1,000	-61,504	91,904
	3	-2,533	5,636	1,000	-81,939	76,872
	4	-39,000	10,515	,656	-187,152	109,152
	5	-44,867	11,182	,569	-202,407	112,673
3	1	17,733	9,317	1,000	-113,533	148,999
	2	2,533	5,636	1,000	-76,872	81,939
	4	-36,467	15,774	1,000	-258,707	185,773
	5	-42,333	12,005	,719	-211,467	126,800
4	1	54,200	7,201	,172	-47,254	155,654
	2	39,000	10,515	,656	-109,152	187,152
	3	36,467	15,774	1,000	-185,773	258,707
	5	-5,867	12,413	1,000	-180,755	169,022
5	1	60,067	7,034	,134	-39,030	159,163
	2	44,867	11,182	,569	-112,673	202,407
	3	42,333	12,005	,719	-126,800	211,467
	4	5,867	12,413	1,000	-169,022	180,755

Basiert auf den geschätzten Randmitteln

a. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

7.5 Dank

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung während meiner Schul- und Universitätszeit danken. Meiner Mutter Dr. Beate Hummel verdanke ich insbesondere die kritische Durchsicht meiner Manuskripte.

Meinen verbindlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Arndt Schilling für die Leitung des Projektes aussprechen.

Herzlichst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Ektoras Hadjipanayi für die Überlassung und Entwicklung des Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor und die Hilfestellung bei der Entwicklung der Arbeit sowie die Durchsicht meiner Manuskripte bedanken.

Einen weiteren großen Dank möchte ich Frau Ursula Hopfner für die Einarbeitung und Durchführung der ELISAs aussprechen.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Manuela Kirsch für die Einführung in die Laborarbeit.

Bei meiner lieben Schwester Sonja Hummel bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung und Interpretation der Statistik.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Partner Konrad Holtkamp für die Hilfestellung bei der Formatierung, der graphischen Darstellung und die moralische Unterstützung bedanken.