

**Aus der orthopädischen Klinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Charakterisierung der zellulären Signatur und Zusammensetzung von Knochenmarks-
MSC aus osteoarthrotischen Hüften**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Maximilian Leucht

aus Mettingen

Würzburg, September 2022

Referent: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

Korreferent/ Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Marietta Herrmann

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2023

Der Promovend ist Arzt

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Coxarthrose	1
1.1.1. Ursachen, Einteilung und Epidemiologie	1
1.1.1.1. Die Entzündungskomponente bei der Coxarthrose	3
1.1.1.2. Epidemiologie	5
1.1.1.3. Risikofaktoren der Coxarthrose.....	5
1.1.2. Symptome der Coxarthrose	6
1.1.3. Diagnostik	6
1.1.3.1. Klinische Untersuchung	6
1.1.3.2. Radiologie	7
1.1.3.3. Kellgren & Lawrence Score.....	7
1.1.4. Therapie.....	8
1.2. Der menschliche Knochen	10
1.2.1. Einleitung.....	10
1.2.2. Aufbau	11
1.2.2.1. Azelluläre Bestandteile des menschlichen Knochens	11
1.2.2.2. Zelluläre Bestandteile des menschlichen Knochens	12
1.2.2.3. Knochenmarksraum/-höhle	12
1.3. Zellpopulationen und Stammzellnischen im menschlichen Knochenmark.....	13

1.3.1. Mononukleäre Zellen im humanen Knochenmark.....	13
1.3.2. Mesenchymale Stammzellen.....	14
1.3.3. Perizyten	19
1.3.4. Stammzellnischen.....	20
1.3.5. MSC Nische	21
1.4. Oberflächenmarker	21
1.4.1. (Putative) positive Oberflächenmarker für MSC.....	22
1.4.2. Negative MSC-Marker	25
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Klinisches Material.....	27
2.1.1.1. Ethikvotum	27
2.1.1.2. Einverständniserklärung.....	27
2.1.1.3. Patientendaten und Röntgenbilder.....	27
2.1.1.4. Primärmaterial (Reaming)	28
2.1.2. Chemikalien (Feststoffe).....	29
2.1.3. Flüssigkeiten/ Lösungen	29
2.1.3.1. Kommerziell erhältliche Lösungen	29
2.1.3.2. Angesetzte Lösungen.....	31

2.1.4. Antikörper für die Durchflusszytometrie-Färbungen.....	32
2.1.4.1. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe FITC	32
2.1.4.2. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe PerCP-eFluor 710	33
2.1.4.3. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe Pe-Cyanine7..	33
2.1.4.4. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe APC-eFluor 780	33
2.1.4.5. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe APC.....	33
2.1.4.7. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe PE	33
2.1.5. Verbrauchsmaterial	33
2.1.6. Geräte	35
2.1.7. Software	36
2.2. Methoden	37
2.2.1. Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Knochenmark	37
2.2.2. Bestimmung der Zellzahl	38
2.2.2.1. Neubauerzählkammer	38
2.2.2.2. Berechnung der Zellzahl	39
2.2.3. Versuche mit den mononukleären Zellen nach Isolation.....	40
2.2.3.1. Aussaat in Zellkulturflaschen.....	40
2.2.3.2. Passagieren von Zellen aus Zellkulturflaschen	41

2.2.3.3. Fibroblastische Colony forming units/ Koloniebildende Einheiten (CFU-F) und ihre Färbung	41
2.2.4. Färbung von Oberflächenmarkern für die Durchflusszytometrie	42
2.2.5. Durchflusszytometrie	44
2.2.5.1. Färbung der Kompensations-Beads für die Auswertung der Durchflusszytometrie	46
2.2.5.2. Auswertung der Durchflusszytometriedaten/-ergebnisse.....	47
2.2.6. Adipogene Differenzierung	52
2.2.6.1. Kulturbedingungen für die adipogene Differenzierung	52
2.2.6.2. Färbung und Quantifizierung der adipogenen Differenzierung.....	52
2.2.7. Osteogene Differenzierung	54
2.2.7.1. Kulturbedingungen für die osteogene Differenzierung	54
2.2.7.2. Färbung und Quantifizierung der osteogenen Differenzierung	54
2.2.8. Datenerhebung und Auswertung	56
2.2.8.1. Statistische Auswertung	56
2.2.8.2. Grafische Darstellung	56
3. Ergebnisse.....	57
3.1. Bildung von CFU-F in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern.....	57
3.1.1. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom Alter	57

3.1.2. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom BMI	58
3.1.3. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom Geschlecht	59
3.1.4. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score.....	60
3.2. Differenzierungseigenschaften.....	61
3.2.1. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit von Alter	62
3.2.2. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit vom BMI.....	64
3.2.3. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit vom Geschlecht	65
3.2.4. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score.....	66
3.3. Vergleich verschiedener potentieller Oberflächenmarker von MSC	68
3.3.1. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Relation zu den gebildeten CFU-F	69
3.3.2. Untersuchung einer Korrelation von verschiedenen Oberflächenmarkern zur Detektion von gleichen Zellpopulationen	71
3.3.3. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom Alter	74
3.3.4. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom BMI.....	77
3.3.5. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom Geschlecht	79

3.3.6. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score	82
4. Diskussion	86
4.1. Generelle Aspekte des Studiendesigns	86
4.2. Geschlechtsabhängigkeit von CFU-F und Oberflächenmarkern	88
4.2.1. Die CFU-F Kapazität ist geschlechtsabhängig	88
4.2.2. CD271 kommt geschlechtsabhängig auf MNC vor	90
4.3. Untersuchungen zu CFU-F Bildung und der Frequenz von Zellpopulationen in Bezug zu Alter, BMI und Kellgren & Lawrence Score	90
4.3.1. Untersuchungen zum Alter	90
4.3.1.1. Die CFU-F Bildung ist unabhängig vom Alter	90
4.3.1.2. Die untersuchten Zellpopulationen kommen unabhängig vom Alter der Donoren vor	92
4.3.2. Untersuchungen zum BMI	93
4.3.2.1. Die CFU-F Bildung ist unabhängig vom BMI	93
4.3.2.2. CD45- CD13+ CD105 Zellen steigen signifikant in Abhängigkeit vom BMI, die übrigen Zellpopulationen zeigen keine signifikanten Abhängigkeiten vom BMI	94
4.3.3. Untersuchungen zum Kellgren & Lawrence Score	95
4.3.3.1. Die CFU-F Bildung ist unabhängig vom Kellgren & Lawrence Score	95
4.3.3.2. Die untersuchten Zellpopulationen sind unabhängig vom Kellgren & Lawrence Score der Donoren	97

4.4. Die Anzahl an CFU-F korreliert mit keiner untersuchten Zellpopulation.....	98
4.5. Vergleich verschiedener Oberflächenmarkerkombinationen zur Detektion von MSC Populationen	99
4.6. Das Potential von MSC zur adipogenen bzw. osteogenen Differenzierung ist unabhängig vom Alter, BMI, Geschlecht oder Kellgren & Lawrence Score der Donoren.....	100
4.6.1. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom Alter	102
4.6.2. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom BMI.....	104
4.6.3. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	107
4.6.4. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score	107
5. Zusammenfassung.....	110
6. Literaturverzeichnis	112
Appendix.....	
I. Abkürzungsverzeichnis	
II. Abbildungsverzeichnis	
III. Tabellenverzeichnis	
IV. Danksagung	
V. Lebenslauf	
VI. Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen	
VII. Muster der Einwilligungserklärung	

VIII. Ethikanträge

1. Einleitung

1.1. Coxarthrose

Der Begriff Coxarthrose bezeichnet eine Arthrose des Hüftgelenks. Eine Arthrose ist eine degenerative Gelenkerkrankung, bei der Knorpel zu Grunde geht und in Folge dessen auch der darunterliegende Knochen mit angegriffen wird. Die Degeneration führt weiterhin zu einer entzündlichen Komponente. Im englischsprachigen Raum wird eine Arthrose als Osteoarthritis bezeichnet, um ebendiese Entzündungskomponente mit im Namen einzubeziehen [1, 2].

1.1.1. Ursachen, Einteilung und Epidemiologie

Im Allgemeinen entstehen degenerative Knorpelerkrankungen durch ein Ungleichgewicht zwischen Belastung und Belastbarkeit des Gelenkknorpels. Dieses zur Knorpeldegeneration führende Ungleichgewicht kann sogenannte (sog.) primäre und sog. sekundäre Ursachen haben [3, 4].

Die primären Ursachen werden auch als idiopathisch bezeichnet. Bei ihnen ist keine direkte Ursache in Form von Vorerkrankungen für die degenerativen Veränderungen auszumachen [4]. Alterungsprozesse spielen eine Rolle, so dass als Ursache gemeinhin die Alterung und damit die Abnutzung des Gewebes angesehen wird. Etwa ab dem 30. Lebensjahr kann man bereits mittels Röntgen bei Menschen Veränderungen des Binde- und Stützgewebes nachweisen. Diese degenerativen Veränderungen nehmen mit zunehmendem Alter noch weiter zu. Dies führt dazu, dass durch die gesteigerte Lebenserwartung gleichermaßen die Anzahl der Patienten mit einer Coxarthrose zunimmt [2]. So lag die Lebenserwartung laut statistischem Bundesamt für Jungen, die im Jahr 2003 geboren wurden bei etwa 76 Jahren, bei 2019 geborenen Jungen schon bei etwa 78 Jahren. Der gleiche Trend lässt sich bei Mädchen beobachten. So liegt die durchschnittliche Lebenserwartung bei 2003 geborenen Mädchen bei etwa 81 Jahren, bei 2019 geborenen Mädchen bei etwas über 83 Jahren [5]. Im Knorpel äußern sich

diese Alterungsprozesse histologisch unter anderem (u.a.) durch eine Minderung an Mukopolysacchariden beziehungsweise (bzw.) Glykosaminoglykanen und einer verringerten Zellzahl. Dies führt in der Folge zu Erweichungen, Erosionen und Rissen im Knorpel [4]. Im subchondralen Knochen kann man bei fortgeschrittener Arthrose mikroskopisch auch Mikrofrakturen im Knochengewebe beobachten (Abbildung (Abb.) 1) [6].

Die sekundären Ursachen fußen auf nicht ausgeheilten Erkrankungen des Hüftgelenks oder auf ausgeheilten Erkrankungen, die jedoch als Defektheilung sog. präarthrotische Deformitäten hinterlassen haben, welche letztendlich durch die gestörte Biomechanik zum Verschleiß der Hüfte führen. Beispielerkrankungen, die zu sekundären Coxarthrosen führen können, sind unter anderem Morbus Perthes, Epiphysiolysis Capitis Femoris, Hüftdysplasie, rheumatische Arthritis und Infektionen des Hüftgelenks [2, 4].

Das Resultat ist bei allen möglichen Ursachen für die Coxarthrose jedoch gleich. Der Knorpel degeneriert und wird weniger belastbar, Kollagenfasern gelangen in die Gelenkflüssigkeit, der Knorpel wird dünner, was wiederum zu vermehrtem Druck auf den Knochen führt. Dieser sklerosiert daraufhin und bildet Osteophyten, um den gesteigerten Druck abzufangen [2, 4]. Zudem kann sich die Gelenkkapsel durch die akkumulierenden Abriebprodukte des Knorpels entzünden (sog. reaktive Synovialitis oder aktivierte Arthrose) und in Folge dessen auch schrumpfen [2]. Weiterhin können im Rahmen einer Arthrose Bänder und Menisci in einem Gelenk degenerieren [7]. Auf mikroskopischer/ molekularer Basis entstehen im Knorpel anfänglich Mikrorisse am Ort der größten mechanischen Belastung. Diese können bei chronischer Überlastung nicht mehr heilen [8]. Knorpelzellen besitzen wenig Regenerationsfähigkeit und sind metabolisch wenig aktiv, obwohl sie für die Knorpelfunktion und Struktur unerlässlich sind [9]. In frühen Stadien der Arthrose wurde beobachtet, dass die Chondrozyten ein höheres Aktivitätsniveau zeigen und versuchen die entstandenen Schäden durch vermehrte Synthese der Matrixbestandteile zu reparieren [10]. Durch die Schäden am Knorpel werden von den Chondrozyten unter anderem auch katabole Cytokine und

Entzündungsmediatoren ausgeschüttet. Diese führen dazu, dass sowohl durch die Chondrozyten als auch durch die Synovia, knorpel-degenerative Enzyme freigesetzt werden [7, 9, 11]. Es entwickelt sich ein Teufelskreis. Durch den konsekutiven Schaden am Knorpel werden weitere, pro-inflammatorische Mediatoren ausgeschüttet, zum Beispiel (z.B.) reaktive Sauerstoffspezies. Diese überschreiten ab einer gewissen Konzentration ihre antioxidierende Wirkung und erzeugen oxidativen Stress im Gelenk [11]. Im subchondralen Knochen führt die Überbelastung unter anderem dazu, dass auch die Steifheit bzw. Härte des Knochens zunimmt, die Mineraldichte dagegen abnimmt [12, 13]. Darüber hinaus werden die Knochentrabekel dicker, allerdings nimmt ihre Zahl ab [14, 15]. Im osteochondralen Übergang nimmt mit zunehmender Schwere des Knorpelschadens die Zahl an Blutgefäßen im Sinne einer Neovaskularisation zu [16].

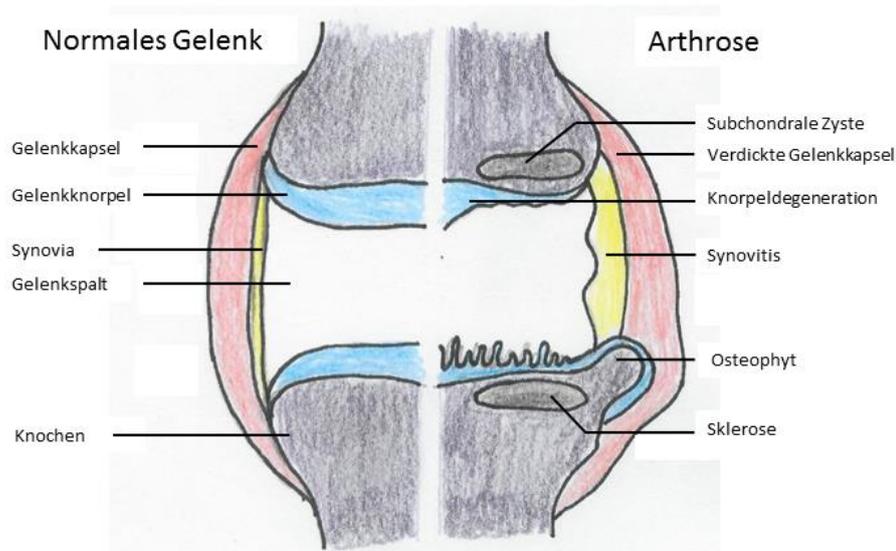


Abbildung 1: Schemazeichnung eines gesunden und eines von Arthrose betroffenen Gelenks mit charakteristischen Strukturen. Die linke Seite der Abbildung zeigt schematisch ein gesundes, die rechte ein arthrotisch verändertes Gelenk. Die bei der Arthrose typischerweise auftretenden Sklerosen, Zysten und Osteophyten und Gelenkspaltverschmälerung sind dargestellt. Modifiziert nach Robinson et al. [6].

1.1.1.1. Die Entzündungskomponente bei der Coxarthrose

Neue Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass die Entzündungskomponente in der Coxarthrose eine größere Rolle spielt als bisher angenommen. So ist nicht nur die

Abnutzung des Knorpels für die degenerativen Prozesse verantwortlich, sondern auch eine Entzündung [6]. Die Entzündung ist bereits nachweisbar, bevor strukturelle Schäden auftreten [17]. In der Frühphase der Arthrose gibt es eine Einwanderung von mononukleären Zellen (MNC) in die Synovia. Durch den Gewebeschaden entsteht zusätzlich die oben angesprochene Überexpression von Entzündungsmediatoren [18]. Durch den Gewebeschaden werden weiterhin sog. Danger associated molecular patterns (DAMPs) freigesetzt, welche als endogene Startmoleküle eine Entzündungsantwort – z.B. durch Makrophagen und Mastzellen – verursachen. Es wurde weiterhin beobachtet, dass mit einer erhöhten Anzahl an aktivierten Mastzellen im betroffenen Gelenk, die Synovitis und der Gelenkschaden ebenfalls zunehmen [19]. Mastzellen und Makrophagen erkennen die DAMPs durch ihre sog. Pattern-recognition receptors (PRRs). Eine Unterklasse dieser PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) [6, 20]. Eine prolongierte Aktivierung der TLRs und der assoziierten Signalkaskaden wird mit einer möglichen chronischen Entzündung bei Arthrose in Verbindung gebracht [17]. Die DAMPs, die bei der Arthrose mitwirken sind z.B. Produkte, die bei der Degradation der extrazellulären Matrix freigesetzt werden, intrazelluläre Alarmine, freigesetzt durch gestresste bzw. nekrotische Zellen, und abgelagerte Kristalle, die ebenfalls aus Stoffen entstehen, die durch den Schaden am Knorpel freigesetzt werden. Einige dieser Moleküle können auch das Komplementsystem aktivieren [6, 21, 22]. Nicht nur die lokale, auch eine systemische Entzündung spielt bei der Arthrose eine Rolle. So ist z.B. Adipositas ein Risikofaktor für Arthrose. Zum einen durch die erhöhte Belastung für die Gelenke, zum anderen auch durch vom Fettgewebe freigesetzte Entzündungsmediatoren, die sog. Adipokine [6, 23]. Diese sind eine Untergruppe der Zytokine, haben immunmodulatorische Fähigkeiten und sind beteiligt an einer systemischen Entzündungsreaktion im Körper. Es ist durchaus möglich, dass diese systemische Entzündung die lokale Entzündung bei der Arthrose beeinflusst, da Adipokine auch im betroffenen Gelenk z.B. von Chondrozyten und Osteoblasten produziert werden können [24]. So könnte eine Gewichtsreduktion ein möglicher Schutzfaktor sein, da nicht nur die mechanische Beanspruchung der Gelenke sinkt, sondern auch die Konzentration zirkulierender Adipokine [6].

1.1.1.2. Epidemiologie

Die Arthrose ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung, ihr Auftreten nimmt mit steigendem Alter zu [25]. 2010 waren 39 % der Krankenhausaufenthalte wegen Arthrose durch eine Coxarthrose bedingt. Damit liegt sie an zweiter Stelle hinter den Krankenhausaufhalten wegen Arthrose des Kniegelenkes (Gonarthrose) mit 48,8 %. Frauen waren dabei etwas häufiger in stationärer Behandlung. Laut der Fallpauschalen Statistik der Krankenhäuser (DRG-Statistik) aus dem Jahr 2010 wurden in diesem Jahr 213614 Erstimplantationen einer Hüft-Totalendoprothese (Hüft-TEP) gezählt (allerdings auch durch andere Indikationen bedingt, wie z.B. Femurfrakturen). Davon entfielen etwa 16,7 % auf unter 60-jährige Patienten/-innen, 58,4 % auf die Patientengruppe zwischen 60 und 79 Jahren, die restlichen 24,9 % der Patienten/-innen waren 80 Jahre oder älter [26]. Ein interessanter epidemiologischer Fakt zur Coxarthrose ist, dass sie bei der schwarz-afrikanischen und asiatischen Bevölkerung seltener auftritt [27].

1.1.1.3. Risikofaktoren der Coxarthrose

Allgemein gilt für die Coxarthrose – wie für alle anderen degenerativen Erkrankungen auch – das Alter als großer Risikofaktor. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Frauen häufiger Arthrosen entwickeln als Männer, so dass das weibliche Geschlecht dementsprechend ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Arthrose darstellt [26]. Für die Coxarthrose konnte durch Zwillingsstudien gezeigt werden, dass es einen genetischen Einfluss auf die Entwicklung einer Coxarthrose gibt und sie somit genetische Risikofaktoren aufweist. Welche Gene dies genau sind, ist Gegenstand aktueller Forschungen [28]. Gelenkspezifische Risikofaktoren sind wiederholte Überlastung (z.B. beruflicher Natur), nicht ausgeheilte Frakturen oder Verletzungen am betreffenden Gelenk (siehe 1.1.1. Ursachen für sekundäre Coxarthrosen). Weiterhin gilt, wie bereits oben erwähnt, Adipositas bzw. Übergewicht als starker Risikofaktor, da durch das erhöhte Gewicht die Belastung des Gelenks bzw. seiner Strukturen zunimmt. Dies gilt jedoch für die Hüfte nicht in ganz so großem Maße wie für das Knie [26].

Weiterhin ist Immobilisation ein Risikofaktor für die Coxarthrose, da hier der Gelenkstoffwechsel reduziert wird [2, 3].

1.1.2. Symptome der Coxarthrose

Hauptsymptom der Hüftgelenksarthrose ist der Schmerz. Er tritt zuerst bei der Innenrotation des Gelenks und bei Belastung auf. Wie bei anderen Hüfterkrankungen auch, kann der Schmerz von der Leiste bis ins Knie ausstrahlen [4]. Je weiter die Erkrankung fortschreitet, desto mehr Bewegungen sind schmerzhaft. Dadurch kann es sowohl zu sog. Anlaufschmerzen als auch zu Ruhe- und Nachtschmerzen kommen [2, 4]. Es entwickeln sich im Laufe der Zeit Kontrakturen der Hüftgelenksmuskeln, was in der Folge zu einem veränderten Gangbild und zu Problemen bei Alltagstätigkeiten führen kann, da das aufrechte Stehen auf Grund der Schmerzen und durch die Kontrakturen nur noch eingeschränkt möglich ist. Der Oberkörper wird zur Schmerzreduktion auf die erkrankte Seite verlagert, das sog. Trendelenburg-Duchenne Entlastungshinken ist die Folge [4, 27]. Die Stärke der Schmerzen ist jedoch abhängig von der Reizung bzw. Entzündung der Synovia und nicht von der tatsächlichen Destruktion des Hüftgelenks [4].

1.1.3. Diagnostik

1.1.3.1. Klinische Untersuchung

Neben einer gründlichen Anamnese über die Symptome werden in der klinischen Untersuchung das Gangbild, Druckschmerzen in der Leiste und am Trochanter Major und die Bewegungen des Hüftgelenks geprüft und erfasst: Abduktion/ Adduktion, Innen-/Außenrotation und Extension/ Flexion [2, 27]. Normwerte für diese Bewegungen sind: Abduktion 45°, Adduktion 25°, Innenrotation 35°, Außenrotation 45°, Extension 15°, Flexion 140°. Weiterhin sollte die Lendenwirbelsäule mit untersucht werden, da sich Kontrakturen der Muskulatur bilden können und sich so eine Hyperlordose entwickeln kann [2].

1.1.3.2. Radiologie

Meist wird in der ersten Diagnostik ein anterior-posterior Röntgenbild der Hüftgelenke angefertigt. Es sollten dabei beide Hüftgelenke im Seitenvergleich betrachtet werden. Weitere Aufnahmen oder bildgebende Verfahren werden je nach Klinik und Anamnese angefertigt [2, 4]. Die Stärke der Symptome korreliert in der Regel nicht mit den im Röntgen sichtbaren Veränderungen - trotz auffälliger Röntgenbefunde kann der Patient schmerz- bzw. beschwerdefrei sein [2]. Typische radiologische Zeichen für eine Coxarthrose im Röntgenbild sind: Verschmälerung des Gelenkspaltes, Sklerosen in der Nähe des Gelenks, Zysten und osteophytäre Anbauten sowohl an der Hüftpfanne als auch am Hüftkopf [2]. Zur Klassifizierung der Coxarthrose wird von der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie die Klassifikation nach Kellgren & Lawrence empfohlen (siehe 1.1.3.3.) [4].

1.1.3.3. Kellgren & Lawrence Score

Der Kellgren & Lawrence Score (K&L Score) für die Coxarthrose beurteilt die Schwere der Arthrose im Hüftgelenk anhand von radiologischen Zeichen. Die Einteilung erfolgt in vier Schweregrade [4, 27]:

1. Das Gelenk ist weitestgehend normal. Es gibt eine geringe subchondrale Sklerosierung, die anderen oben genannten radiologischen Zeichen sind nicht vorhanden.
2. Der Gelenkspalt ist geringfügig verschmälert, es bilden sich Osteophyten. Die Gelenkfläche beginnt unregelmäßig zu werden.
3. Deutlich sichtbare Osteophyten, Gelenkspaltverschmälerung und Unregelmäßigkeiten der Gelenkfläche.
4. Markante Verringerung des Gelenkspaltes, deutliche Osteophyten/ Zysten. Zum Teil (z.T.) klare knöcherne Deformationen des Hüftgelenks oder sogar Hüftkopfnekrosen.

1.1.4. Therapie

Es gibt bei der Behandlung der Coxarthrose zwei große Säulen der Therapie. Die eine dieser Säulen stellt die konservative Therapie dar. Sie dient der Verbesserung des Bewegungsausmaßes des Hüftgelenks (z.B. durch Physiotherapie, Bewegung bei moderater Belastung (z.B. Schwimmen, Radfahren) und Bewegungsbäder). Ferner kann physikalische Therapie mit Infrarotbehandlung und Elektrotherapie indiziert sein. Medikamentös können orale nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) und intraartikuläre Injektionen eingesetzt werden. Der Einsatz der NSAR ist allerdings durch ihre Nebenwirkungen begrenzt. Intraartikulär können Cortison oder Lokalanästhetika injiziert werden. Cortison lindert vor allem (v.a.) bei aktivierten Coxarthrosen die Symptome [2, 4, 27].

Die andere Säule der Behandlung stellt die operative Therapie dar. Sie kann grundsätzlich unterteilt werden in gelenkerhaltende und gelenkersetzende Operationen. Bei den gelenkerhaltenden Operationen gibt es z.B. Umstellungsoperationen am Becken/ Oberschenkel, arthroskopische Eingriffe und arthroplastische Umformungen. Sie zielen darauf ab, die gestörte Mechanik des Gelenks dauerhaft zu verbessern und so einem weiteren voranschreiten der Arthrose vorzubeugen (z.B. bei einer präarthrotischen Deformität). Die andere operative Therapie ist der Gelenkersatz mittels Totalendoprothese (TEP). Dabei werden in der Regel beide Anteile des Gelenks – Hüftkopf und Acetabulum – ersetzt (Abb. 2). Die Implantate können sowohl mit als auch ohne Knochenzement im Patienten verankert werden. Die Entscheidung, welche Befestigung gewählt wird, hängt v.a. von der Knochenqualität und nicht so sehr vom Alter des Patienten ab. Weitere Methoden, wie nur eine Komponente des Gelenks zu ersetzen, haben heutzutage in der Arthrosetherapie nur nachrangige Bedeutung. Diese Hemiprothese wird v.a. in der Alterstraumatologie verwendet [2, 4, 27].

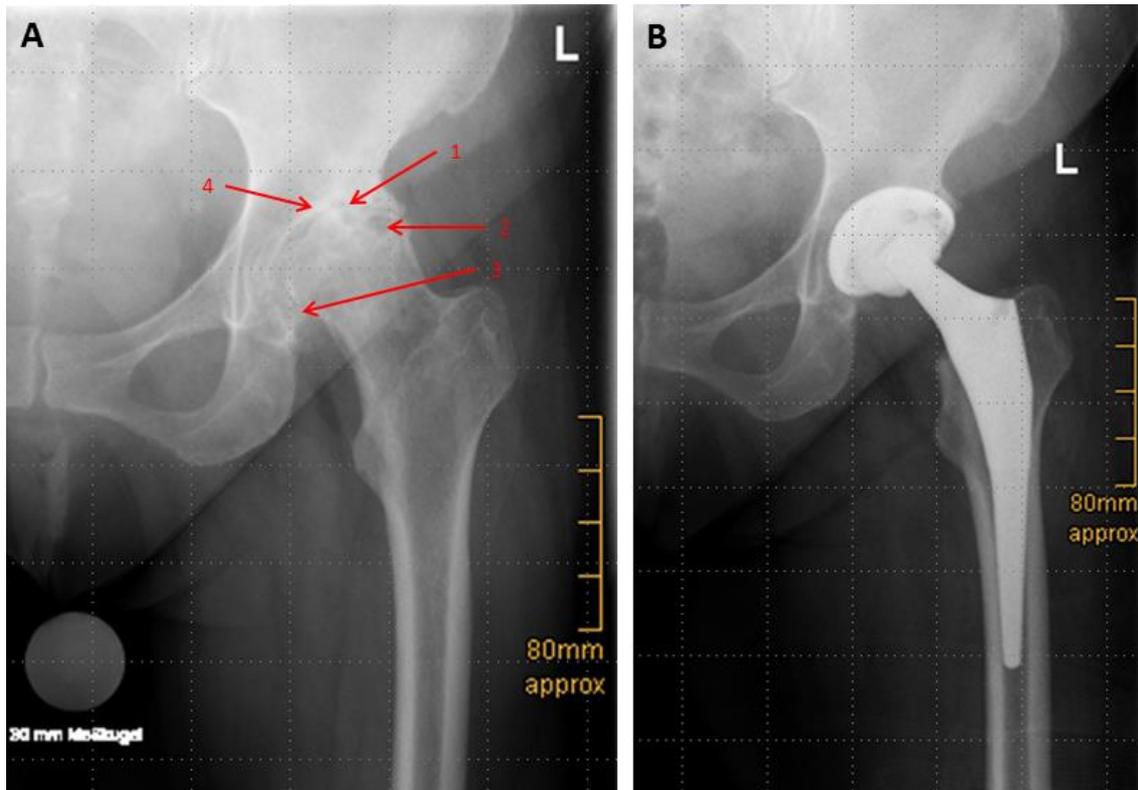


Abbildung 2: Ein von Arthrose betroffenes, linkes Hüftgelenk vor und nach einer totalendoprothetischen Versorgung. In Bildteil (A) ist das linke Hüftgelenk einer der Donorinnen der Studie zu sehen. Die Pfeile markieren radiologisch sichtbare Arthrosezeichen. 1: Verschmälerung des Gelenkspaltes, 2: Zyste, 3: beginnende osteophytäre Anbauten, 4: subchondrale Sklerosierung des Knochens. Nach dem K&L Score liegt hier ein Stadium 4 vor. Bildteil (B) zeigt das linke Hüftgelenk derselben Patientin nach einem zementfreien, totalendoprothetischen Hüftgelenkersatz. Röntgenbilder entstammen dem Patientendatenmanagement Orbis des König-Ludwig-Hauses.

Regenerative Therapien sind, trotz intensiver Forschungen, bisher in der klinischen Anwendung nicht etabliert. Forschungsansätze haben dabei unter anderem die Regeneration des geschädigten Gelenkknorpels adressiert und in den Fokus gesetzt. Dabei untersuchte einer der Ansätze, ob es möglich ist, den Gelenkknorpel mittels der Transplantation von autologen Chondrozyten zu regenerieren. Bei Experimenten zu dieser These zeigte sich jedoch, dass die Chondrozyten bei der Expansion in vitro ihre knorpelspezifischen Eigenschaften verloren und so nicht als vollständiger Knorpelersatz dienen konnten [29]. Aktuelle Forschungsansätze rücken daher die

multipotente mesenchymale Stammzelle (MSC) in den Fokus, die die Fähigkeit besitzt, unter bestimmten Umständen zu Chondrozyten zu differenzieren [30]. Es gibt generell zwei Ansätze bei der Chondrozytenregeneration. Entweder wird ein komplett ausgereiftes Produkt (die Zellen werden mit einer kompletten extrazellulären Matrix (EZM) gezüchtet und transplantiert) verwendet oder die Zellen werden so gezüchtet, dass sie eine inkomplette EZM aufweisen, die sich in vivo komplettieren soll [29]. Ein entscheidender Aspekt kommt dabei der Umgebung der Chondrozyten zu: sie benötigen bestimmte Strukturen und dreidimensionale Verhältnisse, um mechanisch belastbaren, dem natürlichen Vorbild ähnlichen, Knorpel bilden zu können [31]. Zudem versucht man mittels MSC neue Behandlungsoptionen – nicht nur für die subchondralen Knochendefekte der Arthrose – zu entwickeln. So sind bei der Arthrose die Zysten ein mögliches Ziel dieser Forschung. Allerdings sind diese Behandlungsmethoden noch nicht ausgereift, da es noch Optimierungsbedarf beim Einsatz der MSC an sich bzw. ungeklärte Forschungsfragen in Bezug auf den Auf- und Umbau im Knochen, die Integration des Transplantats in den bestehenden Knochen und die Imitation lokaler, osteoinduktiver oder angiogenetischer Faktoren gibt [32]. Neben diesen Hürden auf dem Weg zu Knorpel-/Knochen-/Gewebeersatz steht auch noch das Problem, dass besagte MSC noch nicht einheitlich charakterisiert sind (zu den MSC siehe 1.3.2.).

1.2. Der menschliche Knochen

1.2.1. Einleitung

Da der subchondrale Knochen bei Gelenken häufig ebenfalls von der Arthrose betroffen ist, soll in diesem Abschnitt kurz auf den menschlichen Knochen eingegangen werden. Die Knochen im Skelett des Menschen an sich haben verschiedene Funktionen. Sie dienen als mechanische Stütze, Ort der Blutbildung, als Schutz der Organe und auch als Calcium-Reservoir für den Stoffwechsel. Insgesamt besteht das Skelett des Menschen aus 223 Knochen. Eine mögliche Einteilung der Knochen kann

anhand ihrer Morphologie erfolgen. Der Knochen besteht sowohl aus zellulären als auch aus azellulären Bestandteilen [3].

1.2.2. Aufbau

1.2.2.1. Azelluläre Bestandteile des menschlichen Knochens

Die EZM des Knochens besteht u.a. aus Kollagenfasern (v.a. vom Typ 1), anorganischen Mineralien (z.B. Hydroxyapatit-Kristallen), Glykoproteinen und Proteoglykanen. Sie zusammen sind für die speziellen Eigenschaften des Knochens – die Härte bzw. Druck- und Zugfestigkeit – verantwortlich. Die mineralischen Hydroxyapatit-Kristalle lagern sich an die Kollagenfasern vom Typ 1 an und bilden so mineralisierte Kollagenfibrillen, welche zusammen mit dem Rest der EZM sog. Lamellen ausbilden. Die Lamellen können unterschiedliche geometrische Anordnungen haben - dadurch ist eine morphologische Einteilung in zwei Typen von Knochen beim Erwachsenen möglich. Einer dieser Knochentypen ist der Geflechtknochen. Er entsteht bei der Bildung der Knochen in der Embryonalentwicklung bzw. bei Heilungsprozessen nach Frakturen und wird dann im Laufe des Lebens oder im Rahmen der Frakturheilung in den zweiten Knochentypen, der biomechanisch deutlich stabiler ist, umgewandelt - den Lamellenknochen. Der Lamellenknochen gliedert sich in eine sog. „Compacta“, welche die äußere Abgrenzung des Knochens bildet und eine sog. „Spongiosa“, die im Inneren des Knochens liegt, aus dünnen Knochenbälkchen besteht und das Knochenmark umschließt. Die Knochenbälkchen der Spongiosa sind gefäßlos. Die Compacta wird – mit Ausnahme der Gelenkflächen – vom sog. Periost umschlossen. Das Periost ist in zwei Schichten unterteilt. Eine Schicht enthält Zellen und liegt dem Knochen direkt an (Stratum Osteogenicum), die darüberliegende Schicht enthält straffes Bindegewebe und elastische Fasern (Stratum Fibrosum). Die Spongiosa, inklusive der einzelnen Spongiosabälkchen, wird vom Endost ausgekleidet. Dabei handelt es sich um einige nicht-mineralisierte Kollagenfibrillen und vereinzelte Zellen [3, 33-35].

1.2.2.2. Zelluläre Bestandteile des menschlichen Knochens

Die gewebespezifischen Zellen des Knochens sind: Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten. Der Knochen enthält neben diesen Zellen zusätzlich noch weitere, nicht gewebespezifische Zellen, wie z.B. Endothelzellen der Blutgefäße, hämatopoetische Stammzellen (HSC) und ihre Abkömmlinge, weitere nicht-hämatopoetische Stammzellen, so wie viele verschiedene weitere Zelltypen [33-35]. Die spezifischen Knochenzellen haben spezielle Funktionen. Osteoblasten, die sich von mesenchymalen Stammzellen ableiten, bauen den Knochen auf. Die mehrkernigen Osteoklasten bauen ihn ab bzw. resorbieren ihn wieder. Sie entstehen durch Fusion von einkernigen (mononukleären) Vorläuferzellen. Diese beiden Zelltypen sind u.a. beteiligt am Vorgang des Knochenumbaus, der zeitlebens stattfindet. Ziel dieses Umbauvorganges ist es, alten und spröden bzw. geschädigten Knochen durch neuen zu ersetzen. Durch diese Vorgänge ist es dem Knochen möglich, sich an veränderte mechanische Belastungen zu adaptieren [35, 36]. Etwa 5-10 % der Knochensubstanz eines Menschen werden pro Jahr auf diese Weise umgebaut, so dass das komplette Skelett etwa alle 10 Jahre einmal erneuert wird. Die Regulation dieses Prozesses ist sehr komplex und hängt unter anderem eng mit der Calcium-Homöostase zusammen [36]. Die Osteozyten liegen in kleinen Kanälchen zwischen den einzelnen Lamellen der Osteone. Diese Kanäle durchziehen die komplette mineralisierte EZM. Die Osteozyten haben lange Ausläufer und sind untereinander durch Zell-Zell-Kanäle, sog. Gap junctions, verbunden. So entsteht ein System von Kanälen und zugehörigen Zellen, das den gesamten Knochen durchzieht. Sie sind essentieller Bestandteil des Knochens [34].

1.2.2.3. Knochenmarksraum/-höhle

Die Spongiosa mit ihrer gitterartigen Architektur umgibt das Knochenmark. Es gibt zwei verschiedene Typen von Knochenmark: gelbes und rotes. Das gelbe Knochenmark enthält überwiegend Fettzellen und ähnelt in seinem histologischen Aufbau dem Fettgewebe. In einigen Regionen des Körpers herrscht diese Form des Knochenmarks bereits früh in der Entwicklung vor (z.B. in Apophysen der langen Röhrenknochen und kurzen Knochen). Die andere Form des Knochenmarks ist das hämatopoetisch aktive,

rote Knochenmark. Beim gesunden Erwachsenen ist es u.a. im Brustbein, den Wirbelkörpern, im Beckenkamm und an den proximalen Enden von Humerus und Femur zu finden. Es enthält anfänglich wenige bis gar keine Fettzellen. Jedoch wandelt sich im Laufe des Lebens immer mehr rotes in gelbes Knochenmark um, die Zahl an Fettzellen im roten Knochenmark nimmt zu. Diese Umwandlung ist sehr komplex reguliert und orientiert sich auch an den Bedürfnissen des Körpers [3, 34, 37]. Allerdings haben die Fettzellen im Knochenmark einen negativen Effekt auf die Blutbildung [38]. In den Fokus der Forschungen ist bei diesen komplexen Vorgängen im Knochenmark die Population der MSC gerückt. Sie kann Adipozyten und Osteoblasten bilden und ist auch an der Regulation der HSC und deren Umgebung beteiligt [30, 39]. Bei in vitro Experimenten konnte jedoch bei MSC kein Unterschied in ihrer Fähigkeit zur adipogenen oder osteogenen Differenzierung mit dem Alter nachgewiesen werden [40], so dass hier noch die Fragen der genauen Regulation unklar sind. Für tiefergehende Informationen zu MSC siehe 1.3.2.

1.3. Zellpopulationen und Stammzellnischen im menschlichen Knochenmark

1.3.1. Mononukleäre Zellen im humanen Knochenmark

Als mononukleäre Zellen werden diejenigen Zellen im Knochenmark beschrieben, die einen Kern und keine cytoplasmatischen Granula haben. Die Form des Kernes ist dabei zu vernachlässigen, er kann rund oder einlappig sein. Der Begriff MNC steht für eine sehr heterogene Zellpopulation, die neben verschiedenen Zelltypen auch sehr unterschiedliche Reifestadien dieser Zellen enthält. So gehören zu den MNC hämatopoetische Stammzellen und einige ihrer Nachkommen, diverse lymphatische, (Vorläufer-)Zellen, Monozyten und auch nicht-hämatopoetische Zelllinien wie z.B. MSC. Es gibt jedoch keine klare Definition, welche Zellen genau zur mononukleären Fraktion gehören. Möchte man einen der eben genannten Zelltypen isolieren, bietet die Fraktion der MNC den Vorteil, dass sie sich hinsichtlich ihrer Dichte und Größe von anderen Bestandteilen des Knochenmarks (z.B. Erythrozyten oder Adipozyten) unterscheidet. Dies macht man sich mittels physikalischer Methoden, z.B. bei einer

Dichtegradientenzentrifugation zu Nutze, um MNC zu isolieren. Allerdings kann es dabei auch zum Verlust einiger Zellen kommen [41, 42].

1.3.2. Mesenchymale Stammzellen

Im Jahr 1966 beschrieben Friedenstein et al. eine Zellpopulation aus dem Knochenmark, die bei Kultur einen fibroblastischen Phänotypen entwickelte und knochenähnliche Strukturen bilden konnte. Im weiteren Verlauf der Forschungen stellte sich heraus, dass diese fibroblastischen Zellen überdies Kolonien bilden konnten. Daraufhin wurden sie als koloniebildende Einheiten (engl. Colony forming units fibroblasts (CFU-F)) bezeichnet [43, 44]. Als Resultat weiterer Forschungen sind diese Zellen heutzutage als eine Population von multipotenten Stammzellen bekannt, sie werden als mesenchymale Stammzellen bezeichnet [30]. MSC charakterisieren sich unter anderem dadurch, dass sie sich in vivo in frühen Stadien in alle Gewebe mesodermalen Ursprungs entwickeln können [45]. Humane MSC können in vitro unter anderem Knorpel-, Knochen-, Muskel- und Fettgewebe bilden bzw. deren gewebsspezifische Zellen. Dazu siehe Abb. 3 [30, 46, 47]. MSC haben weiterhin einen positiven Effekt auf die Wundheilung [48].

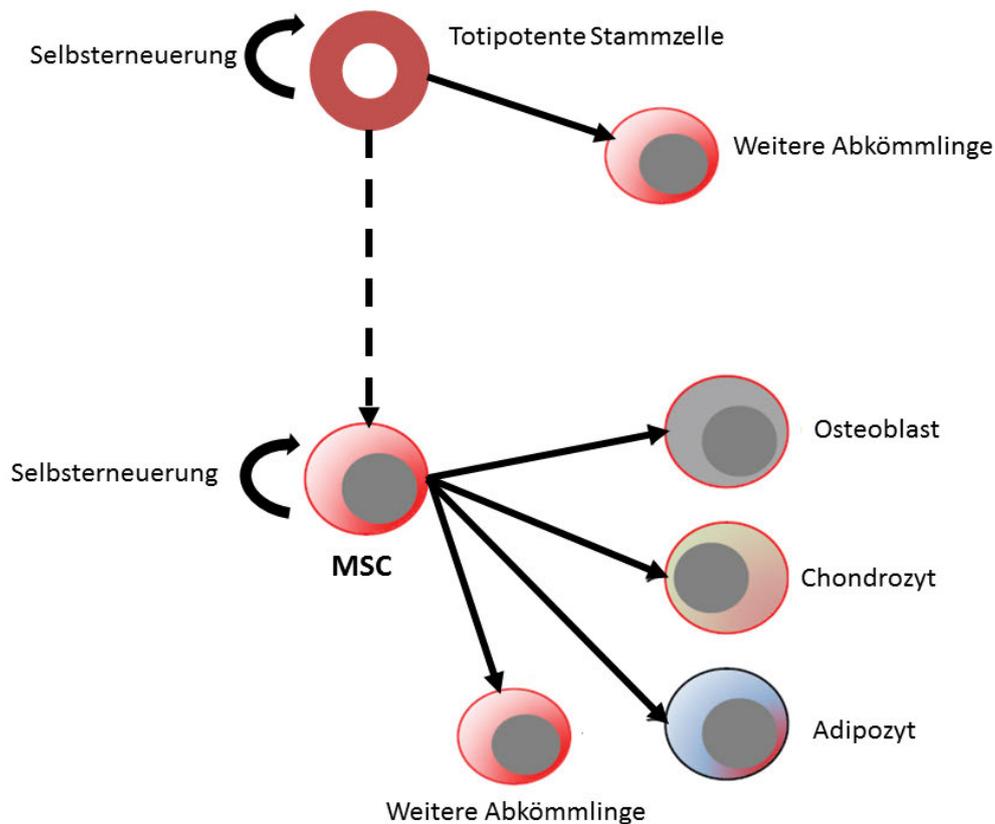


Abbildung 3: MSC und ihre Abkömmlinge im Kontext ihres hierarchischen Levels. Die Stammzelle mit dem höchsten Differenzierungspotential ist die totipotente Stammzelle, sie kann alle Gewebe des Körpers bilden. Von ihr stammt auch die mesenchymale Stammzelle ab. Diese kann sich in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren. Vereinzelt berichten Studien sogar über Differenzierungen in weitere, sehr verschiedene Zellen. Dies ist insgesamt aber wissenschaftlich nicht eindeutig belegt. Diese sind als weitere Abkömmlinge zusammengefasst. Abb. modifiziert nach Elahi [49].

Neben diesen Funktionen, die als potentieller Ansatz zur Geweberegeneration genutzt werden können, haben MSC auch einen Einfluss auf das Immunsystem bzw. die Wundheilung [50]. MSC können, wie in vitro Studien gezeigt haben, sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken. Dies hängt höchstwahrscheinlich mit dem die MSC umgebenden Milieu zusammen und der damit verbundenen Konzentration von Entzündungsmediatoren wie z.B. Interferon Gamma oder Tumornekrosefaktor Alpha. Die jeweiligen Effekte wirken sich dann konsekutiv auf Makrophagen, T-Zellen und die Immunantwort aus. Neben den Effekten von löslichen Molekülen, spielt auch die Aktivierung über Subtypen der TLRs eine Rolle in Bezug auf die pro- oder anti-

inflammatorische Differenzierung der MSC [50-53]. Sogar im Tumorstroma von einigen Tumoren wurden MSC nachgewiesen. Sie werden u.a. durch lösliche Faktoren, die vom Tumor ausgeschüttet werden, zum Tumor gelockt. Dort können sie immunsuppressiv auf die körpereigene Immunantwort gegen den Tumor wirken. In Mausmodellen wurde durch Ren et al. nachgewiesen, dass bestimmte MSC auch das Tumorwachstum fördern können [54].

Vor allem aber auf Grund der möglichen weitreichenden Fähigkeiten in Bezug auf das Tissue Engineering und Geweberegeneration und in diesem Zusammenhang auch auf Grund von ihren multiplen Differenzierungseigenschaften bzw. sekretorischen Eigenschaften ruhen auf den MSC große Hoffnungen im Bereich der regenerativen Medizin [49]. Die aktuelle klinische Forschung untersucht unter anderem einen Einsatz für MSC bei Knochen- und Herzkrankheiten, so wie bei neurologischen Erkrankungen [47]. Im Jahr 2015 waren mehr als 350 klinische Studien zum Einsatz von MSC registriert [49].

Humane MSC können aus den verschiedensten Geweben isoliert werden. Dazu gehören nicht nur Gewebe wie das Knochenmark, das Fettgewebe, die Nabelschnur oder das vordere Kreuzband, sondern embryonal auch die Neuralleiste und viele weitere. Durch ihren Ursprung in der Neuralleiste können sie sogar aus der Pulpa von Zähnen isoliert werden [55-59].

Jedoch unterscheiden sich die MSC abhängig davon, aus welchem Gewebe sie isoliert wurden in gewissen Punkten [60], wie z.B. ihrem Proteom, den Oberflächenmarkern [47] und dem Transkriptom [49]. Weiterhin können nicht alle Zellen, die MSC genannt werden, in alle drei Linien differenzieren. So können MSC aus der Neuralleiste keine Chondrozyten bilden, sind dafür aber entscheidend am Aufbau der HSC-Nische beteiligt [57]. Bei einem Vergleich aus mehreren Quellen von MSC waren Gene für die Unterstützung der HSC in MSC aus dem Knochenmark am höchsten exprimiert. Ebenso zeigte sich, dass im Tiermodell nach einer Transplantation von MSC aus Muskeln diese keinen Knochen bilden konnten, MSC aus der Nabelschnur jedoch konnten dies [60].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass humane MSC aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe sich hinsichtlich ihres Transkriptoms bei ungefähr 1 % der Gene hochsignifikant unterscheiden. Allerdings zeigten die MSC in vitro aus beiden Quellen die Fähigkeit sich in alle drei Linien (adipogen, osteogen, chondrogen) zu differenzieren [55]. Aber auch, wenn die MSC aus derselben Quelle, z.B. dem Knochenmark, isoliert werden, unterscheiden sie sich. So konnte eine isolierte MSC-Population über die Expression eines weiteren Markers (Cluster of Differentiation (CD) 56) untersucht werden und es zeigte sich, dass die Population, die CD56 auf ihrer Oberfläche trägt, sich deutlich besser in Richtung Chondrozyten differenzieren lässt, als CD56 negative Zellen. Umgekehrt zeigten diese CD56 negativen Zellen jedoch eine bessere adipogene Differenzierung als CD56 positive Zellen [61].

Weiterhin konnte in in vivo Experimenten ebenfalls gezeigt werden, dass MSC nach mehrmaliger heterotropher Transplantation zwar noch spontan Knochen, jedoch keinen Knorpel bzw. Fettgewebe mehr bilden können [49]. Außerdem unterscheiden sie sich offenbar in ihrem Potential zur Proliferation. MSC aus dem Fettgewebe haben vermutlich eine höhere Proliferationsrate als MSC aus dem Knochenmark [55].

Unter anderem diese Tatsachen führen dazu, dass in der aktuellen Literatur verschiedene Bezeichnungen für MSC geläufig sind und sich die Wissenschaftler/-innen nicht einig darüber sind, wie genau man MSC definiert. Häufig wird gleichwertig zu mesenchymale Stammzelle auch der Begriff mesenchymale Stromazelle verwendet [45, 62]. Weitere in der Literatur verwendete Begriffe für MSC sind unter anderem: multipotente Stromazellen, mesenchymale Vorläuferzellen, mesodermale Stammzellen [47, 63] und Skelettstammzellen [37]. Shiozawa bezeichnete 2008 mesenchymale Stromazellen als Abkömmlinge von mesenchymalen Stammzellen [46]. Seit 2017 gibt es überdies einen – kontrovers diskutierten – Vorschlag von Caplan die MSC in Medizinische Signalzellen umzubenennen [63].

Ein methodisches Problem, welches sich hinsichtlich MSC ergibt ist, dass zwischen den verschiedenen Forschungsgruppen keine Einigkeit über die Isolationsmethoden oder

die Kulturbedingungen für MSC herrscht. Es werden verschiedene Protokolle verwendet [41], die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen [45]. Diese Uneinigkeit spielt auch in Bezug auf einen möglichen Einsatz in der Zelltherapie (siehe oben) eine große Rolle [30].

Um wenigstens ein Mindestmaß an Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Zellen mit ihren oben genannten verschiedenen Fähigkeiten herzustellen, postulierte Dominici im Jahr 2006 minimale Kriterien, die Zellen in vitro erfüllen müssen, um als MSC zu gelten. Neuere Arbeiten lassen aber – gerade in Hinsicht auf die Oberflächenmarker – den Schluss zu, dass die Kriterien keine Aussagekraft in Bezug auf die Eigenschaften der Zellen in vivo haben. Diese Kriterien umfassen [30, 64]:

1. Adhärenz an Plastik unter Standardzellkulturbedingungen.
2. Die Fähigkeit sich in vitro in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren.
3. Sie sollen positiv sein für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 und gleichzeitig negativ für folgende Oberflächenmarker: CD45, CD34, CD11b oder CD14, CD19 oder CD79 α und HLA-DR. Dabei handelt es sich unter anderem um hämatopoetische oder endotheliale Marker.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit finden sich nähergehende Erläuterungen zu Oberflächenmarkern in Abschnitt 1.4. - Oberflächenmarker.

Im Knochenmark wird die Anzahl von MSC als relativ gering beschrieben, ihre Häufigkeit wird mit etwa 1:10000 bis 1:100000 der Knochenmarkszellen angegeben [50, 65]. Bei der Extraktion mittels Ficoll-Dichtezentrifugation aus dem Knochenmark sind sie in der Phase der mononukleären Zellen zu finden [42].

1.3.3. Perizyten

Perizyten sind Zellen, die sich an der Wand von Mikrogefäßen befinden. Zwischen den Endothelzellen, die die innere Wand der Blutgefäße bilden, und den Perizyten befindet sich eine Basalmembran. Das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen variiert in verschiedenen Geweben [66]. Perizyten haben einen Einfluss auf die Barrierefunktion der Endothelzellen, in dem sie Einfluss auf die Tight-Junctions der Endothelzellen nehmen können und somit die Durchlässigkeit regulieren können [66-68]. Weiterhin besteht ihre Aufgabe unter anderem darin, die Gefäße zu stabilisieren und die Endothelzellen in Position zu halten. Es konnte gezeigt werden, dass sich Perizyten *in vitro* bei Versuchen zur Angiogenese v.a. an den Abzweigungen der Blutgefäße befinden. Weiterhin wurde *in vitro* gezeigt, dass künstlich erzeugte Gefäßstrukturen in Anwesenheit von Perizyten (oder z.T. auch MSC) länger stabil bleiben. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sie eine stabilisierende Funktion haben [67, 69]. Im entzündeten Gewebe können sie die Durchlässigkeit der Arteriolen und Kapillaren für die Leukozyten bei deren Extravasation regulieren und mit den Immunzellen interagieren [70]. Eine weitere wichtige Funktion der Perizyten konnte in der Aufrechterhaltung und Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden [71]. Perizyten weisen, je nach Herkunft bzw. Isolationsort, unterschiedliche Oberflächenmarker auf. Dies macht es schwierig, sie genau zu charakterisieren [72, 73]. Eine weitere Unklarheit ist ihr Ursprung. Perizyten exprimieren oftmals die gleichen bzw. ähnliche Oberflächenmarker wie MSC aus dem Knochenmark (z.B. CD146) [74]. Weiterhin haben diese Zellen mit den ähnlichen Oberflächenmarkern, je nach Herkunft, *in vitro* die Fähigkeit, sich in bestimmte Linien zu differenzieren. Möglich sind z.B. eine Differenzierung in die adipogene, chondrogene und osteogene Zelllinie [67]. Diese Tatsache rückt sie sehr nah an die MSC und es wurde die These aufgestellt, dass alle MSC Perizyten sind [75]. Ob Perizyten Abkömmlinge von MSC sind, oder Perizyten eine spezialisierte MSC-Population darstellen oder MSC Abkömmlinge von Perizyten sind, bleibt unklar. In einer Arbeit von Crisan et al. wurde gezeigt, dass Perizyten nach längerer Kultur zu MSC ähnliche Oberflächenmarker exprimieren, was die Schlussfolgerung zulässt, dass beide Zelltypen in irgendeiner Weise voneinander

abstammen [76]. Ein weiteres Experiment hat gezeigt, dass perisinusoidale CD146+ Zellen MSC-Eigenschaften aufweisen und im Tiermodell Vorläufer eines markenthaltenden Knochens nach Transplantation aufbauen können [60]. Jedoch gibt es wie bereits erwähnt eine Diskrepanz zwischen in vitro und in vivo Funktionen der MSC und in vitro erzielte Ergebnisse lassen sich nicht uneingeschränkt auf in vivo Studien übertragen [60].

1.3.4. Stammzellnischen

Sog. Nischen bilden innerhalb von Geweben funktionelle Kompartimente. Sie können als ein Netzwerk von verschiedenen Mikroumgebungen angesehen werden. Die Mikroumgebungen entstehen als ein Resultat von Interaktionen zwischen Zellen, Matrix, biophysikalischen Kräften und metabolischen Substraten [77]. Die Nischen in den Geweben sind dynamisch. Durch ihre Fähigkeit Informationen zu integrieren, ist es den Nischen möglich, sich Bedürfnissen anzupassen. Eine Stammzellnische kann z.B. die Stammzellen durch Signale kontrollieren und regulieren und so die Stammzeleigenschaften der Stammzellen aufrechterhalten und Proliferation bzw. Reifung verhindern. Auf der anderen Seite kann sie die Stammzellen auch zur Proliferation anregen und hat somit die Fähigkeit, z.B. auf Verletzungen oder auf Infektionen zu reagieren [39, 45, 59, 77, 78]. Systemische Faktoren können die Anzahl an Stammzellnischen beeinflussen, z.B. durch die Induktion zur Bildung neuer Nischen [45]. Eine Nische kann jedoch auch von Erkrankungen betroffen sein. Die Nische für die HSC im Knochenmark – die am besten beschriebene und untersuchte Stammzellnische des Menschen – kann auch von malignen Erkrankungen betroffen sein. So können metastatische Zellen eines Tumors entweder durch passives Besetzen der Nische oder aktives Verdrängen der Stammzellen einen Einfluss auf die Nische der HSC ausüben [45, 46]. Das menschliche Knochenmark enthält Stammzellnischen für verschiedene Arten von Stammzellen [62]. Es beherbergt – unter anderem – MSC und HSC, beide können aus dem Knochenmark isoliert werden [46, 77, 79].

1.3.5. MSC Nische

Um als Stammzellnische für MSC fungieren zu können, sind an die lokalen Mikroumgebungen keine strikten Voraussetzungen geknüpft [49]. Es ist insgesamt noch nicht geklärt, welche löslichen Faktoren, EZM-Bestandteile oder Zellen zur Etablierung einer MSC-Nische benötigt werden oder diese definieren [80].

Durch die komplexen Vorgänge während der Embryonalentwicklung können MSC-Nischen an vielen Orten im Körper gefunden werden. Eine der potentiellen Nischen für MSC liegt perisinusoidal [62, 80]. Dort können sie auch strukturelle Unterstützung für die Blutgefäße leisten. Weiterhin ist es ihnen möglich in Zellen zu differenzieren, die das Knochenmarksstroma bilden und auch direkt mit HSC interagieren können [77]. Es wird vermutet, dass MSC und HSC im Knochenmark symbiotisch als Partner in einer Nische zu finden sind und dass MSC die Hämatopoese durch Sekretion spezifischer Faktoren, unterstützen [45, 78].

Ferner sind MSC und ihre Vorläufer an kleinen Arteriolen des Endosts und an Kapillaren zu finden. Dabei gibt es im Knochenmark eine endosteale, eine perivaskuläre und eine Stroma Nische [81].

1.4. Oberflächenmarker

Für frisch isolierte MSC sind bisher noch keine Oberflächenmarker identifiziert worden, die diese Population von MSC genau definieren bzw. identifizieren können. In dieser Arbeit wurden für frisch isolierte MSC einige Kombinationen putativer Oberflächenmarker untersucht, die im Folgenden erläutert werden - es gibt jedoch noch viele weitere Marker auf MSC [80, 82]. Die bisher gefundenen Oberflächenmarker auf MSC unterscheiden sich je nach Umgebung in der sich die MSC befinden: in vitro, in vivo und ex vivo (und auch hier unterscheiden sie sich je nach Gewebe). Während der Kultur können sich die exprimierten Marker verändern, so wird z.B. CD271 ex vivo noch exprimiert, jedoch verlieren die Zellen diesen Marker, wenn sie in Kultur vermehrt werden [61, 83].

Oberflächenmarker, die entweder in den Leitlinien für kultivierte Zellen als positiv auf den MSC gefordert werden [30] oder die bisher hoffnungsvolle Ergebnisse (auch in Verbindung miteinander) lieferten sind: CD13, CD73, CD90, CD105, CD146 und CD271 [30, 84-86]. Es gibt viele unterschiedliche Kombinationen dieser Marker, die untersucht wurden, so z.B.: CD45-, CD13+ und CD105+ durch Muniz et al. [84], CD45- und CD271+ [87], CD34-, CD45- und CD146+, oder CD34-, CD45- und CD73+ [67, 88], um nur eine kleine Auswahl zu nennen. Die aktuelle Forschung greift inzwischen immer weitere mögliche MSC-Marker auf und versucht mittels Kombinationen dieser Marker die MSC möglichst genau zu charakterisieren. Dabei spielt jedes Mal die Herkunft der MSC eine Rolle [80, 89]. Die laut aktuellen Leitlinien festgelegten in vitro Oberflächenmarker sind sehr unspezifische Marker [30, 80]. Es gibt bisher keinen gesonderten Marker, der exklusiv für MSC ist [83]. Die Selektion von Zellen, die CD45 und CD34 negativ sind, erfolgt, um Zellen der hämatopoetischen Linie auszuschließen. Dieses Vorgehen steht in Einklang mit den Richtlinien für in vitro expandierte MSC [30]. Ein Markerprofil, das aktuell genutzt wird, um Perizyten aus dem Knochenmark zu isolieren, ist CD45- CD43- CD146+ - diese Zellen zeigten ein gleiches Oberflächenprofil wie einige MSC [67]. Tormin et al. stellten, nachdem sie frisch isolierte MSC aus dem Knochenmark mittels CD271+ CD146+ und CD45- detektiert hatten fest, dass diese Zellpopulationen sich in ihrer Fähigkeit zu differenzieren unterscheiden, so dass diese Kombination nicht allein als Markerkombination für MSC gelten kann, ihr aber wahrscheinlich nahe kommt [90]. Für eine Zellpopulation, die durch CD45- CD13+ CD105+ charakterisiert wurde, konnte von Muniz et al. gezeigt werden, dass sie ex vivo ebenfalls MSC Eigenschaften zeigen [84].

1.4.1. (Putative) positive Oberflächenmarker für MSC

Im Folgenden sollen alle in dieser Studie untersuchten Oberflächenmarker kurz vorgestellt werden. Diese sind oftmals nach dem Ort der ersten Isolation/ Entdeckung und der dortigen Funktion benannt. Die Funktionen auf den MSC bzw. der Zusammenhang von der Funktion der MSC mit den Markern sind weitestgehend noch nicht verstanden [89, 91].

CD13: wird auch als Aminopeptidase N bezeichnet. Bei CD13 handelt es sich um eine in der Membran verankerte Ektoprotease, die an der Differenzierung und Proliferation von verschiedensten Geweben beteiligt ist. In einigen Krebs-Entitäten ist dieser Oberflächenmarker verstärkt exprimiert und spielt ebenso bei der Metastasierung eine Rolle [92]. CD13 wurde in verschiedenen Reviews als möglicher MSC Marker diskutiert, jedoch lieferten die zu Grunde liegenden Studien inkonsistente Ergebnisse. Daneben ist CD13 nicht in der Lage MSC alleine zu definieren. Es bedarf immer einer Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Bei der in vitro Expansion von MSC wird CD13 runterreguliert [80, 82, 84].

CD73: ist auch bekannt als Ekto-5'-Nukleotidase. CD73 ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Zelloberfläche verankert und hat verschiedene Funktionen entweder als Enzym oder Signalmolekül. Es spielt z.B. bei der Interaktion von Zellen mit der EZM eine Rolle und ist in einigen Tumoren überexprimiert [93]. Es konnte belegt werden, dass CD73 während der in vitro Kultur von MSC weiterhin exprimiert wird, daher wird CD73 als ein günstiger Marker zur MSC-Charakterisierung angesehen. In den minimalen Kriterien von Dominici wird das Vorhandensein von CD73 in vitro gefordert [30, 80].

CD90: ist ebenso als Thymuszellen Antigen (engl. Thymus cell antigen-1 (Thy-1)) bekannt. CD90 ist ein durch einen GPI-Anker auf der Zelloberfläche befestigtes Glykoprotein. Es kommt auf vielen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Neuronen, HSC und Endothelzellen vor. Das Protein reguliert unter anderem Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Bei der Entstehung von vielen malignen Krebserkrankungen spielt es eine Rolle, es wird sogar als potentieller Krebs-Stammzellmarker diskutiert [94]. In vitro müssen Zellen CD90 exprimieren, um laut den Leitlinien als MSC gelten zu können [30].

CD105 (Endoglin): ist ein Teil des TGF-Beta Rezeptor Komplexes und ein Transmembran-Glykoprotein. CD105 wird auf Endothelzellen exprimiert und ist bei der Angiogenese von entscheidender Bedeutung. In einigen Tumoren exprimieren die

Endothelzellen vermehrt CD105 [95]. Laut den Leitlinien ist CD105 in vitro ein essentieller Marker für MSC [30].

CD146: wird auch als Melanom Zelladhäsionsmolekül (engl. Melanoma cell adhesion molecule (MCAM)) bezeichnet. Der Name leitet sich aus der Funktion als Zelladhäsionsmolekül und der ersten Entdeckung als Marker für Melanome ab. Bei CD146 handelt es sich um ein Membranglykoprotein, das auch als Korezeptor des Rezeptors für den vaskulären Endothelwachstumsfaktor (engl. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor (VEGFR2)) fungiert. CD146 kommt weiterhin auch auf Endothelzellen vor und ist dort mitverantwortlich für die Endothelfunktion, wie z.B. der Gefäßpermeabilität. Weiterhin ist CD146 bei der Neovaskularisierung und Angiogenese beteiligt, was es deshalb zu einem möglichen Therapieziel bei Krebserkrankungen macht. In einigen Tumoren wird es überexprimiert [96, 97]. In Bezug auf MSC ist CD146 ein potentieller Marker, der bereits von einigen Arbeitsgruppen in Kombination mit anderen Markern genutzt wird, um MSC bzw. Perizyten zu charakterisieren [60, 76, 88]. Ein interessanter und noch nicht ausreichend erforschter Aspekt ist, dass MSC mit höherem Differenzierungspotential mehr CD146 an ihrer Oberfläche exprimieren [98].

CD271: der als Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors (engl. Nerve growth factor receptor (NGFR)) als Oberflächenmarker bekannt ist, ist ein Transmembran-Glykoprotein und wird auf vielen, v.a. auch neuronalen Zellen, wie z.B. Schwann-Zellen oder Neuronen, exprimiert [49, 99]. Ex vivo wird CD271 auf MSC exprimiert, während der in vitro Kultur verlieren die Zellen jedoch CD271 [49]. CD271 wird als ein vergleichsweise sehr spezifischer Marker für MSC aus dem Knochenmark angesehen [86]. Jedoch kann auch CD271 nicht als alleiniger Marker herangezogen werden, um MSC aus dem Knochenmark zu identifizieren [89]. Eine vorgeschlagene Kombination, um MSC aus dem Knochenmark zu identifizieren, ist die Kombination von Stro-1, SSEA-4, CD146 und CD271 [45]. Daneben existieren noch viele weitere Kombinationen [89], siehe oben.

1.4.2. Negative MSC-Marker

CD34: ist ein transmembranäres Phosphoglykoprotein. Über seine genaue Funktion herrscht noch keine Klarheit. Es wird angenommen, dass CD34 eine Rolle bei der Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen spielt. Es wird vermutet, dass CD34 ein Marker für wenig differenzierte Vorläuferzellen ist. CD34 wird traditionell als Marker für HSC herangezogen, jedoch zeigte sich, dass auch andere Zellpopulationen – z.B. unter bestimmten Umständen auch MSC – den Marker tragen können [64]. Dies steht jedoch im Gegensatz zur allgemeinen Definition von Dominici aus dem Jahre 2006, die besagt, dass MSC in vitro negativ für CD34 sein müssen [30].

CD45: wird weiterhin gemeinsames Leukozytenantigen (engl. Leukocyte common antigen (LCA)) genannt und ist ein rezeptorähnliches Transmembranprotein mit enzymatischer Aktivität, welches auf allen Leukozyten und ihren Vorläufern vorkommt. Es gibt mehrere Unterformen, die durch alternatives Splicing entstehen und spezifisch für bestimmte Immunzellen und deren Reifungsstadien sind - wie z.B. Untergruppen von T- und B-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Aus diesem Grund wird CD45 gemeinhin als Marker für Zellen hämatopoetischen Ursprungs angesehen und verwendet [80, 100-102]. MSC und Perizyten sind charakteristisch negativ für CD45 [30, 76].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Da degenerative Erkrankungen mit dem Alter zunehmen und die Lebenserwartung der Menschen in Deutschland aktuell stetig steigt, stellen degenerative Erkrankungen das Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung. Aktuell gibt es noch keine regenerativen Therapien für den geschädigten Knorpel. Therapieoptionen für die Arthrose sind aktuell nur die symptomatische Therapie oder die endoprothetische Versorgung des betroffenen Gelenkes. Eine vielversprechende Therapiemöglichkeit zur regenerativen Therapie stellen aktuell MSC dar. Sie werden als eine mögliche Zellquelle für regenerative Therapien betrachtet. Da MSC lokal im Knochenmark zu finden sind, spielen sie aktuell auch bei der (Ein-)Heilung nach einer

Totalendoprothese eines Gelenkes eine Rolle. Durch ihre Lage im Knochenmark sind die MSC den lokalen (z.B. der Entzündung) und den systemischen Einflüssen im Körper ausgesetzt. Dies könnten z.B. das Alter, Co-Morbiditäten oder der Body-Mass-Index (BMI) sein. Durch diese Faktoren können sowohl die Frequenz der MSC, bzw. MSC Subpopulationen als auch deren funktionelle Eigenschaften affektiert sein.

Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten für MSC und damit auch mögliche Therapieansätze finden aktuell jedoch unter nicht einheitlichen Bedingungen statt. Es herrscht Uneinigkeit bzgl. der genauen Definition, der Isolationsmethoden und des Isolationsortes. Daher wurden in dieser Arbeit entweder hoffnungsvolle, bereits bestehende Kombinationen von Oberflächenmarkern untersucht oder eine Kombination aus verschiedenen hoffnungsvollen Markern, um mehr über die zelluläre Signatur von Knochenmarks-MSK und ihren Subpopulationen herauszufinden und ob diese so isolierten Zellpopulationen mit personenbezogenen Eigenschaften der Donoren korrelieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Klinisches Material

2.1.1.1. Ethikvotum

Für alle im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche lag ein gültiges Ethikvotum der Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vor. Die Aktenzeichen sind 186/18 und 187/18. Dabei ging es v.a. um die Verwendung des Primärmaterials - auch Reaming genannt („Rest-Gewebematerial“). Dieses fällt beim Einsetzen einer Hüft-TEP als chirurgischer Gewebeabfall an und würde entsorgt werden. Weiterhin deckt der Ethikantrag die Verwendung von pseudonymisierten patientenbezogenen Daten wie z.B. Alter und Körpergewicht ab. Bei allen Patienten wurde die Indikation zur Implantation einer Hüft-TEP aus rein medizinischen Gründen gestellt. Die Ethikanträge und ein Muster des Einwilligungsfomulars befinden sich im Anhang.

2.1.1.2. Einverständniserklärung

Die Patienten wurden vor der OP im Rahmen der chirurgischen Aufklärung über die Spende des Gewebematerials aufgeklärt. Sie erteilten ihre Einwilligung schriftlich auf der dafür vorgesehenen Einwilligungserklärung.

2.1.1.3. Patientendaten und Röntgenbilder

Die Patientendaten und Röntgenbilder wurden aus dem Patientendatenmanagement (Orbis) des König-Ludwig-Hauses in Würzburg entnommen und sofort für die weitere Verwendung pseudonymisiert. Einige dieser pseudonymisierten Daten (z.B. das Alter, das Gewicht, die Größe und das Geschlecht der Donoren) und Röntgenbilder wurden zur Überprüfung von möglichen Korrelationen verwendet. Durch Verwendung dieser Daten konnten der BMI und der Kellgren & Lawrence Score erhoben werden.

2.1.1.4. Primärmaterial (Reaming)

Das Probenmaterial (Reaming, s. auch Abb. 4) wurde als Primärmaterial im Rahmen der OP entnommen. Es fällt beim Einsetzen von Hüft-TEPs als chirurgischer Abfall an, bedeutet somit für den Patienten keinen zusätzlichen Schaden/ Verlust von Gewebe. Während der OP wird das Acetabulum (Hüftgelenkspfanne) ausgefräst, um Platz für die künstliche Hüftpfanne zu schaffen. Dabei fällt als Abfallprodukt das verwendete Probenmaterial an. Das Reaming enthält deshalb möglicherweise neben Knochen/ Knochenmark auch noch Reste des Gelenkknorpels, des Ligamentum Capitis Femoris und in diesem möglicherweise auch Reste der Arteria Capitis Femoris, sowie in begrenztem Maße auch Zellen des Fettkörpers (Pulvinar) im Hüftgelenk. Das Reaming wurde nach der Entnahme steril in einem Transportbehältnis verpackt und im CO₂-Inkubator bei 37° C bis zur Isolation der Zellen gelagert. Diese erfolgte maximal 24 h nach der Operation/ Materialgewinnung.



Abbildung 4: Reaming im Transportbehältnis. Dargestellt ist das Reaming im Transportgefäß unter einer Sterilwerkbank nach Ankunft im Labor, direkt bevor mit der Isolation der MNC begonnen wurde.

2.1.2. Chemikalien (Feststoffe)

In der Tabelle 1 sind alle verwendeten Feststoffe aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien (Feststoffe).

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikelnummer</u>
Alizarin-Rot S	Sigma-Aldrich, USA	A-3757
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, USA	G9422
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, USA	C0732
Dexamethason	Sigma-Aldrich, USA	D4902
Indomethacin	Sigma-Aldrich, USA	I7378
Kristallviolett	Serva, Deutschland	27335.01
L-Ascorbinsäure-2 Phosphat	Sigma-Aldrich, USA	A8960
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, USA	S092
Öl-Rot-O	Sigma-Aldrich, USA	O0625
PBS Pulver	AppliChem, Deutschland	A0964.1000
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich, USA	P4417-100Tab

2.1.3. Flüssigkeiten/ Lösungen

2.1.3.1. Kommerziell erhältliche Lösungen

Eine Übersicht über die verwendeten, kommerziell erhältlichen Lösungen ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten, kommerziell erhältlichen Lösungen.

<u>Lösung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikelnummer</u>
Ammoniumhydroxid (14,8 M)	Sigma-Aldrich, USA	22.122-8

Doppelt destilliertes Wasser	Roth, Deutschland	3478
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA	D8418
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) Grundmedium, 500 ml	Gibco (ThermoFisher), USA	31331028
DMEM, hohe Glucose (4,5 g/ L), 500 ml	Gibco (ThermoFisher), USA	41965062
DMEM, niedrige Glucose (1 g/ L), 500 ml	Sigma-Aldrich, USA	D6046
Ethanol (70 %)	Roth, Deutschland	T913.3
Ethanol (100 %)	Roth, Deutschland	K928.4
Färbepuffer für Kompensations-Beads	BD Pharmingen, USA	554656
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&Sell, Deutschland	BS.FCS 0.500 EUA
Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF)	R&D Systems, USA	233-FB-500
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich, USA	10771
Insulin (10 mg/ ml)	Sigma-Aldrich, USA	I9278
Isopropanol (100 %)	Roth, Deutschland	CP41.3
Kompensations-Beads	BD BioSciences, USA	552843
Lebendfarbstoff (Viability Dye), eFlour 506	Invitrogen(ThermoFisher), USA	65-0866-14
Methanol (100 %)	Roth, Deutschland	8388.6
Milli-Q®-Wasser (Reinstwasser)	Merck, Deutschland	Z00Q0V0WW
Paraformaldehyd (PFA) 4 % (in PBS)	Affymetrix USB, USA	12777847
Penicillin/ Streptomycin (100x)	Gibco (ThermoFisher), USA	15140-122
Terralin® protect	Schülke, Deutschland	181604

Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich/ Merck, Deutschland	T8154
Trypsin-EDTA (0.5 %)	Gibco (ThermoFisher), USA	15400054
Türks-Lösung	Merck, Deutschland	1092770100

2.1.3.2. Angesetzte Lösungen

In Tabelle 3 befindet sich eine Übersicht über die für die Versuche angesetzten Lösungen.

Tabelle 3: Angesetzte Lösungen für die Versuchsreihen.

Lösung	Zubereitung
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (500 mM)	0,5555 g IBMX in 5 ml DMSO. Lagerung bei -20° C.
Alizarin-Rot-Färbelösung (2 %)	0,3 g Alizarin-Rot S in 15 ml Reinstwasser auflösen, Einstellung des pH-Wertes auf 4,2 mit 10 %igem Ammoniumhydroxid. Vor Gebrauch mittels Sterilfilter (0,2 µm) filtrieren.
L-Ascorbinsäure-2 Phosphat-Lösung (50 mg/ ml)	Lösen von 2,5 g L-Ascorbinsäure-2 Phosphat in 50 ml Reinstwasser. Vor Gebrauch steril filtrieren. Lagerung bei -20° C.
Basalmedium DMEM/F-12	500 ml DMEM/F-12 Grundmedium, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin (100x), 500 µl L-Ascorbinsäure-2 Phosphat-Lösung.
Basalmedium adipogene Differenzierung, DMEM, hohe Glucose (4,5 g/ L)	500 ml DMEM hohe Glucose (4,5 g/ L), 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin (100x).
Basalmedium osteogene Differenzierung, DMEM, niedrige Glucose (1 g/ L)	500 ml DMEM niedrige Glucose (1 g/ L), 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin (100x).
β-Glycerophosphat (1 M)	2,16 g β-Glycerophosphat in 10 ml doppelt destilliertem Wasser. Lagerung bei -20° C.

Cetylpyridiniumchlorid (10 %)	10 g Cetylpyridiniumchlorid in 100 ml Natriumphosphat-Lösung auflösen.
Dexamethason-Vorratslösung (10 mM)	0,0393 g Dexamethason in 10 ml 100 % Ethanol. Lagerung bei -80° C.
Dexamethason-Arbeitslösung (1 mM)	Ein Teil der Dexamethason-Vorratslösung und neun Teile PBS. Lagerung bei -20° C.
Indomethacin (100 mM)	0,03578 g Indomethacin in 1 ml DMSO. Lagerung bei -20° C.
Lebendfarbstoff-Lösung (0,1 %)	1 Teil Lebendfarbstoff gelöst in 1000 Teilen PBS/ 1 % FCS.
Natriumphosphat-Lösung	0,142 g Natriumphosphat in 100 ml doppelt destilliertes Wasser.
Öl-Rot-O-Färbelösung	6 ml der Öl-Rot-O -Vorratslösung und 4 ml doppelt destilliertes Wasser. Vor Verwendung mit Sterilfilter (0,2 µm) filtrieren.
Öl-Rot-O-Vorratslösung	0,5 g Öl-Rot-O in 100 ml Isopropanol (100 %).
PBS aus Tabletten (PBS-Tab)	2 Tabletten PBS, 400 ml doppelt destilliertes Wasser.
Kristallviolett-Färbelösung	0,5 % Kristallviolett in 25 % Methanol.

2.1.4. Antikörper für die Durchflusszytometrie-Färbungen

Die verwendeten Antikörper waren monoklonale Maus Antikörper von der Firma Invitrogen (ThermoFisher), USA. Als erstes ist das Antigen des Antikörpers genannt, in Klammern folgt der Antikörperklon, danach die Bestellnummer. Die Antikörper sind nach dem Farbstoff gruppiert, den sie tragen. Es handelt sich bei allen verwendeten Antikörpern um Antikörper vom Typ IgG1.

2.1.4.1. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe FITC

CD34 (4H11)

11-0349-41

CD90 (Thy-1) 11-0909-41

2.1.4.2. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe PerCP-eFluor 710

CD73 (AD2) 46-0739-41

2.1.4.3. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe Pe-Cyanine7

CD13 (WM-15 (WM15)) 25-0138-41

2.1.4.4. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe APC-eFluor 780

CD45 (HI30) 47-0459-42

2.1.4.5. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe APC

CD13 (WM-15 (WM15)) 17-0138-41

CD105 (Endoglin, SN6) 17-1057-41

2.1.4.7. Antikörper gekoppelt mit einem Farbstoff in der Farbe PE

CD146 (P1H12) 12-1469-41

CD271 (ME20.4) 12-9400-41

2.1.5. Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Artikelnummer</u>
24-Well-Platten	TRP, Schweiz	92024
96-Well-Platten	TRP, Schweiz	92096

Durchflusszytometer-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Deutschland	55.157
Glaspipetten, 10 ml	Brand, Deutschland	27729
Glaspipetten, 25 ml	Brand, Deutschland	27731
Handschuhe, Micro-Touch	Ansell, Belgien	700154
Pasteur-Pipetten, 230 mm	DWK Life Sciences, USA	233302303
Petrischalen „Nunclon Delta Surface“	Thermo Scientific, USA	150350
Pipettenspitzen, 10 µl	Biozym, Deutschland	VT0100X
Pipettenspitzen, 200 µl	Greiner bio-one, Deutschland	685290
Pipettenspitzen, 1000 µl	Greiner bio-one, Deutschland	686290
Plastikpipetten, 10 ml	Greiner bio-one, Deutschland	607180
Plastikpipetten, 25 ml	Greiner bio-one, Deutschland	760180
Reaktionsgefäß, 2 ml	Greiner bio-one, Deutschland	623201
Röhrchen, 15 ml	Greiner bio-one, Deutschland	188271
Röhrchen, 50 ml	Greiner bio-one, Deutschland	227261
Sterilfilter, 0,2 µm	Sarstedt, Deutschland	83.1826.001
Sterile Handschuhe	Ansell, Belgien	330101075
Transportbehälter (für Reaming)	Thermo Scientific, USA	13577300
Universalstopfen	Sarstedt, Deutschland	65.1379
Zellkulturflasche, 175 cm ² Cellstar®	Greiner bio-one, Deutschland	661175
Zellsieb, 40 µm	Greiner bio-one, Deutschland	542040
Zellsieb, 70 µm	Greiner bio-one, Deutschland	542070

2.1.6. Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Für die Versuche verwendete Geräte.

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Bezeichnung/ Artikelnummer</u>
Autoklav	Systemec, Deutschland	VX-65
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Deutschland	Heracell 240
Durchflusszytometer	BD BioSciences, USA	BD LSR II
Feinwaage	Ohaus, USA	Scout II
Gefrierschrank	Liebherr, Deutschland	MediLine
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland	MediLine
Mikroskop	Leica, Deutschland	CTR advanced
Mikroskop für Zellkultur	Hund, Deutschland	Wilovert®
Mini-Membran- Vakuumpumpe	KNF Neuberger, USA	N86 KN.18
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Deutschland	0640010
Photometer	Tecan, Schweiz	Infinite M200
Pipette, 0,5-10 µl	Brand, Deutschland	Transferpette S
Pipette, 100-1000 µl	Brand, Deutschland	Transferpette S
Pipette, 10-100 µl	Brand, Deutschland	Transferpette S
Pipette, 2-20 µl	Brand, Deutschland	Transferpette S
Pipettierhelfer	Brand, Deutschland	accu-jet pro
Schüttler	Grant Instruments, England	PSU-10i
Sterilwerkbank	ThermoFisher, USA	HerasafeKS12

Vortex	IKA, Deutschland	MS2 Minishaker
Wasserbad	GFL, Deutschland	1083
Zentrifuge	Thermo Scientific, USA	Multifuge X1R

2.1.7. Software

Die verwendete Software ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete Software.

<u>Programm</u>	<u>Hersteller/ Entwickler</u>
Endnote	Clarivate, USA
Excel (2010)	Microsoft, USA
FlowJo (Version 10)	FlowJo, LLC, USA
GraphPad Prism (Version 7)	GraphPad Software, USA
ImageJ	NIH, USA
Orbis (Patientendatenmanagement)	Agfa HealthCare, Deutschland
Paint	Microsoft, USA
PowerPoint (2010)	Microsoft, USA
Snipping Tool	Microsoft, USA
Word (2010)	Microsoft, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Knochenmark

Für die Isolation von mononukleären Zellen wurde das in 2.1.1.4. beschriebene Reaming verwendet. Vor dem Start der eigentlichen Zellisolation wurden das Basalmedium (DMEM/F-12, mit den entsprechenden Zusätzen - siehe 2.1.3.2.) und PBS-Tab im Wasserbad auf 37° C, sowie das Histopaque auf Raumtemperatur aufgewärmt. Alle nachfolgenden Schritte bis auf die Zentrifugationen fanden unter einer Sterilwerkbank statt. Zu Beginn der Isolation wurde das Reaming unter sterilen Bedingungen (inklusive steriler Handschuhe) aus der Transportbox in 50 ml Röhrchen überführt und gewogen. Anschließend wurden die 50 ml Röhrchen mit PBS-Tab auf 50 ml aufgefüllt und leicht geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation mit 270 G für fünf Minuten. Der unter anderem Fett enthaltende Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das so abgenommene Volumen wurde mit PBS-Tab ersetzt (meist etwa 10-15 ml). Danach wurde das Röhrchen erneut geschüttelt und für einige Minuten stehen gelassen, bis sich freie Partikel abgesenkt hatten. Der die Zellen enthaltende Überstand wurde anschließend in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Das durch diesen Vorgang abgenommene Volumen im „ursprünglichen“ 50 ml Röhrchen wurde durch PBS-Tab ersetzt, erneut geschüttelt und ruhen gelassen. Anschließend wurde erneut der Überstand abgenommen und in das 50 ml Röhrchen überführt, in dem schon der Überstand aus dem vorherigen Schritt war (bzw. wurde der Überstand auf mehrere 50 ml Röhrchen übertragen). Dieser Schritt wurde anschließend noch ein drittes Mal durchgeführt. Das so gewonnene, die Zellen enthaltende, Volumen wurde anschließend zunächst über ein 70 µm Zellsieb filtriert, aufgefangen und direkt im Anschluss über ein 40 µm Zellsieb laufen gelassen. Die auf diese Weise entstandenen Filtrate wurden für fünf Minuten bei 270 G zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und verworfen, das entstandene Zellpellet in einer geringen Menge PBS-Tab resuspendiert. Am Ende wurden die Zellsuspensionen in einem 50 ml Röhrchen vereinigt und mit PBS-Tab auf 40 ml verdünnt. In der Folge wurde in zwei 50 ml Röhrchen jeweils 13 ml Histopaque vorgelegt (0,65 ml Histopaque pro ml

Zellsuspension) und vorsichtig jeweils 20 ml der in PBS-Tab resuspendierten Zellen hinzugegeben. Dann folgte eine Zentrifugation bei 800 G für 25 Minuten bei Raumtemperatur (Beschleunigung und Bremse jeweils auf den niedrigsten Stufen). Von den entstandenen Schichten wurde jeweils die mittlere (enthält die mononukleären Zellen), inklusive ein bis zwei Millimeter darüber und darunter, entnommen und in einem neuen 50 ml Röhrchen zusammengeführt. In diesem wurden 10 ml Basalmedium (DMEM/F-12) zugegeben und erneut zentrifugiert (800 G, 20 Minuten, Raumtemperatur, Beschleunigung und Bremse auf höchster Stufe). Der Überstand wurde verworfen, anschließend wurde erneut mit 10 ml Basalmedium (DMEM/F-12) aufgefüllt und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach dieser zweiten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgenommen und verworfen, wohingegen das Zellpellet in 3 ml Basalmedium (DMEM/F-12) aufgenommen und resuspendiert wurde. Für die weiteren Schritte wurde die Anzahl der isolierten Zellen bestimmt (siehe 2.2.2.).

Der verworfene Flüssigabfall kam jeweils in eine Glasflasche in der Terralin vorgelegt war (5 ml/ L). Anfallender Festabfall wurde autoklaviert und dann entsorgt. Es wurde ausschließlich mit sterilen Plastikpipetten gearbeitet.

2.2.2. Bestimmung der Zellzahl

2.2.2.1. Neubauerzählkammer

Die Auszählung von Zellen erfolgte mittels einer handelsüblichen Neubauerzählkammer (Tiefe: 0,1 mm, Volumen: 0,0025 mm³). Bei jeder Zählung der Zellen wurden vier große Quadrate (die aus jeweils 16 kleinen Quadraten bestanden) ausgezählt und die Zellzahlen der Quadrate addiert. Um mit Zellen umzugehen, die auf dem Rand lagen, wurden nur diejenigen Zellen, die auf den äußeren Linien der großen Quadrate lagen, mitgezählt. Die Zellen auf den inneren Linien wurden nicht berücksichtigt (siehe Abb. 5).

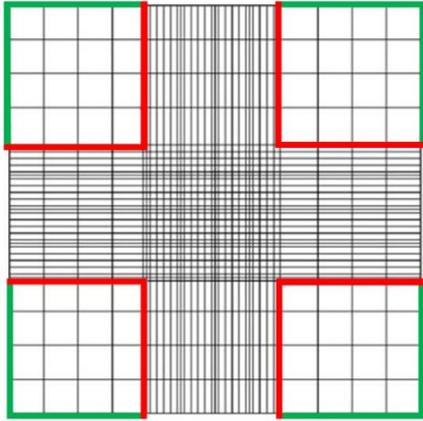


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Neubauerzählkammer. Die Zellen, die jeweils innerhalb der farbigen Ränder der 16 Quadrate liegen, wurden ausgezählt. Zellen, die auf den Rändern der Quadrate lagen wurden, wenn sie auf den grünen Rändern lagen, mitgezählt. Lagen sie auf den roten Rändern, wurden sie nicht mit ausgezählt. Abbildung modifiziert nach: <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.html>

Wurden mononukleäre Zellen direkt nach ihrer Isolation (siehe 2.2.1.) ausgezählt, so wurde ein Aliquot von 10 µl der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung in 190 µl Türk-Lösung (zur Lyse verbliebener Erythrozyten) verdünnt. Davon wurden anschließend 10 µl in eine Neubauerzählkammer gegeben und in dieser ausgezählt. In allen anderen Fällen, z.B. während der Zellkultur oder für die Färbung für die Durchflusszytometrie, wurde zur Zellzählung ein Aliquot von 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,4 %) in einem 2 ml Reaktionsgefäß vermischt und davon anschließend 10 µl in die Neubauerzählkammer gegeben und ausgezählt. Das Trypanblau diente dazu, abgestorbene Zellen anzufärben, so dass nur die lebendigen Zellen gezählt wurden.

2.2.2.2. Berechnung der Zellzahl

Die Berechnung der Gesamtzellzahl nach Auszählung in der Neubauerzählkammer (siehe 2.2.2.1.) erfolgte mittels folgender Formeln:

a) $\text{Summe der Zellen in allen vier Quadranten} \div 4 \times 20 \times 10000 = \text{Zellen pro ml}$

b) $\text{Summe der Zellen in allen vier Quadranten} \div 4 \times 2 \times 10000 = \text{Zellen pro ml}$

Bei frisch isolierten MSC wurde Formel a) verwendet. Die Division durch 4 errechnete den Mittelwert für die vier Quadrate. Der Faktor 20 musste einberechnet werden, da durch die Türks-Lösung eine 1:20 Verdünnung erfolgte. Der Kammerfaktor der Neubauerzählkammer war mit 10000 angegeben. Analog dazu wurden Zellen, die in anderen Versuchen gezählt werden mussten, mit der in b) angegebenen Formel ausgezählt. Da hier nur eine 1:2 Verdünnung aus 10 µl Zellen und 10 µl Trypanblau erfolgte, wurde nur mit dem Faktor 2 multipliziert. Für alle weiteren Versuchsteile konnte so mittels einfachen Dreisatzes das benötigte, die Zellen enthaltene, Volumen berechnet werden.

2.2.3. Versuche mit den mononukleären Zellen nach Isolation

2.2.3.1. Aussaat in Zellkulturflaschen

Nach der Isolation von mononukleären Zellen (siehe 2.2.1.) wurden diese gezählt (siehe 2.2.2.). Für die Aussaat in Zellkulturflaschen der Größe T175 (entspricht einer Wachstumsfläche von 175 cm²) wurden 9 Millionen mononukleäre Zellen verwendet. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde vom Gesamt-Isolat abgenommen, in eine T175 Zellkulturflasche gegeben, mit 27 ml Basalmedium (DMEM/F-12) aufgefüllt, mit 2,7 µl bFGF (5 ng/ ml, entspricht 0,01 %) versetzt und bei 37° C bis zum Mediumwechsel im CO₂-Inkubator inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte drei Mal wöchentlich. Der erste Mediumwechsel erfolgte jedoch erst vier Tage nach Aussaat. Für den Wechsel des Mediums wurde das alte Medium mittels Pasteurpipetten abgesaugt und durch 27 ml frisches Basalmedium (DMEM/F-12) ersetzt. Zusätzlich wurden erneut bFGF (5 ng/ ml) in einer Konzentration von 0,01 % hinzugegeben (entspricht hier 2,7 µl bFGF). Anschließend wurden die Zellkulturflaschen wieder in den Inkubator gebracht und bei 37° C bis zum nächsten Mediumwechsel oder anderen Versuchsteilen gelagert.

2.2.3.2. Passagieren von Zellen aus Zellkulturflaschen

Während der Kultivierung der mononukleären Zellen in den Zellkulturflaschen selektierten sich aus diesen Zellen die MSC durch ihre Plastikadhärenz am Boden der Zellkulturflaschen. Dort bildeten sie Kolonien. Ungefähr zwei Wochen nach Aussaat waren die MSC Kolonien konfluent, was man unter dem Lichtmikroskop beobachten konnte. Sie wurden dann von der Zellkulturflasche abgelöst und auf neue Flaschen verteilt oder für die Differenzierungsversuche verwendet (siehe 2.2.6. und 2.2.7.).

Dazu wurde das Medium abgesaugt, 10 ml PBS-Tab hinzugegeben und ebenfalls abgesaugt. Um die adhärennten Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen, wurden 3 ml der Trypsin-EDTA Lösung hinzugegeben. Anschließend kamen die Zellkulturflaschen für 5 Minuten bei 37° C in den Inkubator. Danach wurden die Zellen in 7 ml des Basalmediums (DMEM/F-12) resuspendiert und in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 270 G, anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde in 3 ml Basalmedium (DMEM/F-12) resuspendiert, davon wurden 10 µl abgenommen, um die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer zu zählen (siehe 2.2.2.). Dann konnte mit den Zellen weiterverfahren werden.

2.2.3.3. Fibroblastische Colony forming units/ Koloniebildende Einheiten (CFU-F) und ihre Färbung

Um die Anzahl an fibroblastischen, koloniebildenden Zellen aus den isolierten mononukleären Zellen (siehe 2.2.1.) zu bestimmen, wurde ein sog. CFU-F-Assay durchgeführt. Dabei wurden jeweils 250000 der isolierten mononukleären Zellen in drei Petrischalen (100 x 17 mm; 12,5 ml) ausgesät. Die Zellen wurden zusammen mit 10 ml Basalmedium (DMEM/F-12) in Petrischalen gegeben und bei 37° C inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach vier Tagen, danach drei Mal pro Woche. Dabei wurde das alte Medium mittels Pasteurpipetten abgesaugt und durch 10 ml frisches Basalmedium (DMEM/F-12) pro Petrischale ersetzt. Anschließend wurden die Petrischalen zurück in den Inkubator gebracht und bei 37° C bis zum nächsten

Mediumwechsel oder der Färbung gelagert. Die Dauer der Kultivierung betrug mindestens 14 Tage, falls die Zellen lichtmikroskopisch noch nicht dicht genug erschienen wurde die Kultivierung für einige Tage fortgesetzt. Waren die Kolonien optisch dicht genug, wurden sie gefärbt. Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt, 10 ml PBS hinzugegeben und erneut abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 70 %igem Methanol für 10 Minuten im Kühlschrank fixiert. Das Methanol wurde nachfolgend abgenommen und durch die Kristallviolett-Färbelösung ersetzt (etwa 5 mm hoch). Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf einem Schüttler, ehe die Färbelösung abgegossen und durch Reinstwasser ersetzt wurde. Das Reinstwasser wurde anschließend dreimal abgegossen und wieder aufgefüllt, um die letzten Reste der Färbelösung von den Zellen zu waschen. Im letzten Schritt wurden die Petrischalen an der Luft für einige Stunden getrocknet, danach konnten die angefärbten Kolonien mit bloßem Auge ausgezählt werden.

2.2.4. Färbung von Oberflächenmarkern für die Durchflusszytometrie

Um die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern der Zellen mittels Durchflusszytometrie nachweisen zu können, war es nötig, die zu untersuchenden Oberflächenmarker mit Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Antikörpern zu markieren. Dafür wurden pro Versuchsansatz 500000 bis 1000000 MNC eingesetzt (abhängig von der Gesamtzahl der isolierten Zellen aus dem Reaming eines Donors). Es wurden insgesamt vier verschiedene Färbungsansätze pro Donor angefertigt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Ansätze der Färbungen zur Detektion von Oberflächenmarkern. Die Ansätze 1 und 2 dienten als Kontrollen. Die Ansätze 3 und 4 enthielten die Antikörper gegen die genannten Oberflächenantigene. In Klammern ist der an die Antikörper gekoppelte Farbstoff genannt.

Ansatz	Antikörper und Farbstoff	Lebendfarbstoff
1	-	-
2	-	efluor 506

3	CD13 (PeCy7)- CD34 (FITC)- CD45 (APC Cy7)- CD73 (PerCpefluor710)- CD105 (APC)- CD146 (PE)	efluor 506
4	CD13 (PeCy7)- CD45 (APC Cy7)- CD73 (PerCpefluor710)- CD90 (FITC)- CD105 (APC)- CD271 (PE)	efluor 506

Der Lebendfarbstoff wurde vor Beginn des Versuches auf Raumtemperatur aufgewärmt. Das die benötigten Zellen enthaltende Volumen der Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit 10 ml PBS/ 1 % FCS aufgefüllt und für 6 Minuten bei 609 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 4 ml PBS/ 1 % FCS aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml dieser Lösung auf vier verschiedene 15 ml Röhrchen aufgeteilt (1 ml pro 15 ml Röhrchen) und jedes der Röhrchen für 6 Minuten bei 609 G zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zu drei Ansätzen (2, 3 und 4) wurden nun 250 µl der 0,1 %igen Lebendfarbstoff-Lösung gegeben und die Ansätze mittels des Vortex vermischt. Der Ansatz, welcher nicht mit dem Lebendfarbstoff gefärbt werden sollten, wurde mit dem äquivalenten Volumen an PBS/ 1 % FCS ohne Farbstoff versetzt. Alle Ansätze wurden daraufhin für 30 Minuten vor Licht geschützt in den Kühlschrank (4° C) gestellt. Im Anschluss wurden 2 ml PBS/ 1 % FCS hinzugegeben, erneut für 6 Minuten bei 609 G zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Für die Färbung wurden in jeden Ansatz nun 2,5 µl des benötigten Antikörpers gegeben (siehe Tab. 7) und auf ein Endvolumen von 50 µl mit PBS/ 1 % FCS aufgefüllt. In den Kontrollansätzen befand sich dementsprechend nur PBS/ 1 % FCS bzw. die Lebendfarbstofflösung und PBS/ 1 % FCS. Alle Ansätze wurden dann mittels Vortex durchmischt. Nachfolgend wurden die Proben erneut abgedunkelt im Kühlschrank für 30 Minuten inkubiert, ehe 1 ml PBS/ 1 % FCS hinzugegeben, bei 609 G für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt wurde. Dann wurden die Proben in 200 µl PFA (2 %) fixiert und für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PBS/ 1 % FCS hinzugegeben, für 6 Minuten bei 609 G zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die

Proben wurden dann in 200 µl PBS/ 1 % FCS aufgenommen, gut durchmischt, in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und bis zur Messung abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.5. Durchflusszytometrie

Mit einem LSR II Durchflusszytometer (Firma BD) wurden die mit Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Antikörpern versetzten, frisch isolierten mononukleären Zellen aus dem Knochenmark (siehe 2.2.1. und 2.2.4.) analysiert. Dies geschah entweder am Tag der Färbung oder einen Tag später. Anhand der gebundenen Antikörper ermöglicht es dieses Verfahren, die Oberflächenmarker von Zellen zu identifizieren. Die Zellen werden im Gerät vereinzelt und einzeln an Lasern mit unterschiedlichen Farbspektren vorbeigeleitet. Wenn das Laserlicht auf die Zelle trifft, entsteht sowohl gestreutes Licht als auch Fluoreszenzlicht (falls Antikörper mit Farbstoff an die Zellen gebunden sind und der Laser das richtige Spektrum hat, um den Farbstoff anzuregen). Das Streulicht gibt Aufschluss über Größe und Granularität der Zellen. Einige Zellen bzw. Zellpopulationen können anhand ihres typischen Streulichtes schon charakterisiert werden. Es gibt zwei Hauptklassen von Streulicht - das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter (FSC)) und das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter (SSC)). In den übrigen Fällen bieten die genannten Farbstoffe an den Antikörpern eine Möglichkeit der Charakterisierung bzw. Identifikation von exprimierten Oberflächenmarkern. Der Antikörper bindet spezifisch an den Oberflächenmarker und der Farbstoff strahlt bei Anregung durch den Laser Licht ab. So können einige Zellen/ Zellpopulationen, die die zu untersuchenden Oberflächenmarker exprimieren, anhand der Lichtemission durch den Farbstoff detektiert werden. Zellen, die das zu untersuchende Oberflächenantigen nicht exprimieren, weisen folglich nicht diese Lichtemission auf, da der Antikörper und damit auch der Farbstoff nicht an ihnen gebunden ist. Verwendet man mehrere, verschiedene Antikörper/ Farbstoffe in einem Versuch, kann die Zelle/ Zellpopulation noch genauer unterschieden und dadurch Subpopulationen identifiziert werden. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass sich sowohl die Wellenlängen des durch den Farbstoff emittierten Fluoreszenzlichts als auch die der anregenden Laser unterscheiden, da es

sonst zu Überlappungen in den Spektren kommt. Dies lässt sich jedoch nicht immer ganz verhindern, da die Fluoreszenzfarbstoffe zu einem geringen Teil auch die Detektoren für einen anderen Farbstoff (in einem anderen Farbspektrum) anregen können (siehe Abb. 6) [102-104].

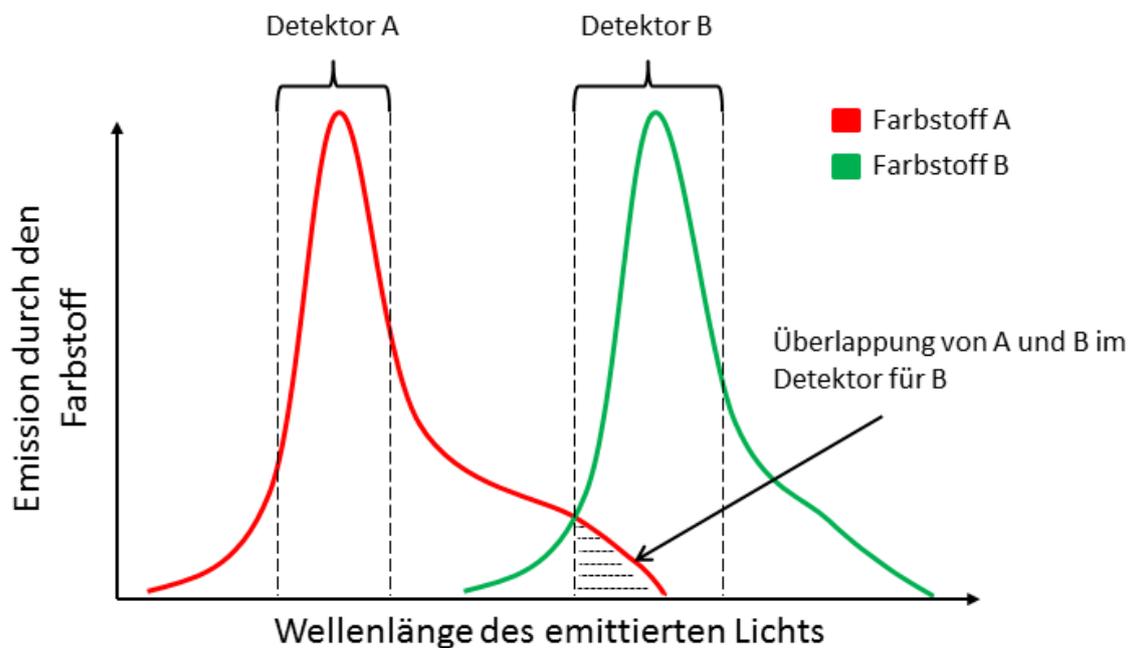


Abbildung 6: Mögliche Überlappung der Farbspektren bei der Verwendung von verschiedenfarbigen Farbstoffen in der Durchflusszytometrie. Bei einigen Farbstoffen kann es vorkommen, dass sie in geringem Maße auch Licht im Spektrum eines anderen Farbstoffes bzw. dessen Detektor emittieren (dargestellt durch die schraffierte Fläche). Diese Überlappung kann dafür sorgen, dass Zellen fälschlicherweise auch ein Signal in einem anderen Farbspektrum zugeordnet wird. Deshalb kann es so scheinen, als würde die Zelle zusätzlich noch einen anderen Oberflächenmarker aufweisen (In diesem Beispiel würde es so scheinen, als wenn Zellen mit dem grünen Farbstoff zu einem kleinen Teil auch den Antikörper mit dem roten Farbstoff tragen würden).

Solche Überlappungen müssen vor der Auswertung beachtet und kompensiert werden. Mit Hilfe der Messung von Kompensations-Beads ist es möglich, die Überlappung herauszurechnen. Dabei wird die Emission im „falschen“ Farbspektrum subtrahiert. Ungefärbte Beads dienen als Referenz für unspezifische Signale, die in beiden Farbspektren minimale Emissionen verursachen (siehe Abb. 7).

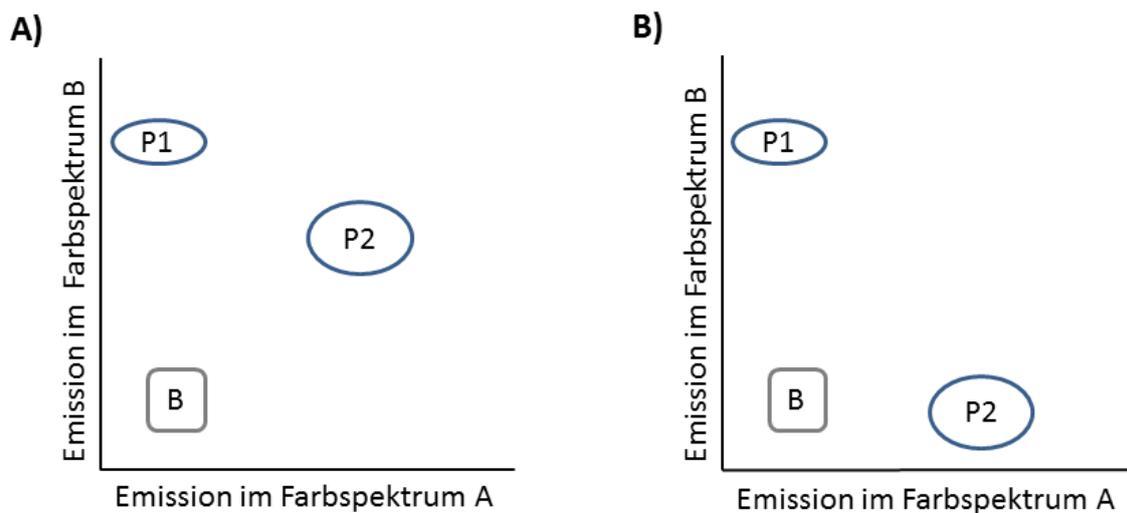


Abbildung 7: Messung von Kompensations-Beads vor und nach errechneter Kompensation. In Abbildungsteil (A) ist das Ergebnis einer Messung von ungefärbten Beads (B) und zwei mittels Fluorochrom-tragenden Antikörpern gefärbten Beads (P1 und P2) zu sehen. Die beiden gefärbten Populationen von Beads sind jeweils mit einem anderen Farbstoff-tragenden Antikörper gefärbt (Farbspektrum A und B). Man sieht, dass die mit Farbstoff B gefärbten Beads (P1) nur im Farbspektrum B Licht emittieren. Die minimale Emission in Farbspektrum A geht nicht über die der ungefärbten Beads hinaus - diese dienen als Referenz (z.B. nicht angefärbte Zellen in der richtigen Messung). Die mit Farbstoff A gefärbten Beads (P2) haben hingegen sowohl eine Emission in Farbspektrum A, als auch in B. Diese Emission in Farbspektrum B ist jedoch durch Überlappung der Lichtemission verursacht. Sie wird mittels Kompensation herausgerechnet, so dass das in Bildteil B dargestellte Spektrum entsteht. Hier hat die Population P2 nur ihre eigentliche Emission, die Emission in Farbspektrum B wurde subtrahiert und auf den Referenzwert durch die Beads minimiert. Diese Kompensation wird dann auf die eigentliche Messung übertragen. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, mehrere Farbstoffe pro Versuchsansatz zu verwenden und somit mehrere Oberflächenmarker auf Zellen zu untersuchen [102-104].

2.2.5.1. Färbung der Kompensations-Beads für die Auswertung der Durchflusszytometrie

Die verwendeten Kompensations-Beads bestanden aus zwei Komponenten. Eine Form hat Bindungsstellen für alle gängigen Anti-Maus Antikörper des Typs IgG1, die andere dient als Negativkontrolle und hat keine Bindungsstellen. Die für die Versuche verwendeten Antikörper mit den gekoppelten Farbstoffen werden einzeln in Röhrchen mit den Beads zusammengebracht, so dass für jede Farbe eine eigene Kompensation erstellt werden kann. Zum Prinzip der Kompensation siehe Abb. 6 und 7.

Vor Verwendung der Beads wurden diese in ihrer Verpackung mittels eines Vortex durchmischt. Für jedes zu kompensierende Fluorochrom wurde ein Teströhrchen vorbereitet, in welches 100 µl Färbepuffer gegeben wurde. Anschließend wurden jeweils 60 µl sowohl der Beads ohne Bindestelle als auch der Beads mit Bindestelle hinzugegeben und mittels des Vortex vermischt. Dann wurde in jedes Teströhrchen einer der für die Versuche verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegeben (20 µl insgesamt: jeweils 2,5 µl des Antikörpers und 17,5 µl PBS/ 1 % FCS), so dass dieser in der gleichen Konzentration vorlag wie im Experiment. Dann wurde der Inhalt der Röhrchen mittels des Vortex erneut durchmischt und für 30 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 ml des Färbepuffers hinzugegeben und bei 200 G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette vorsichtig entfernt, dann wurde das entstandene Pellet vorsichtig in 500 µl Färbepuffer resuspendiert und gevortext. Jedes Teströhrchen (und damit jeder Farbstoff) wurde einzeln mit dem Durchflusszytometer gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse (schematisch dargestellt in Abb. 7) wurden so adjustiert bzw. kompensiert, dass die mittlere Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe in etwa gleich war. Dies wurde für jedes verwendete Fluorochrom durchgeführt. Nachdem diese Kompensation erstellt worden war, konnten die eigentlichen Proben bearbeitet und mittels der erstellten Kompensation genau ausgewertet werden.

2.2.5.2. Auswertung der Durchflusszytometriedaten/-ergebnisse

Zur Auswertung der Durchflusszytometriedaten wurde die Software FlowJo (Version 10) verwendet. Um die Zellpopulationen detektieren zu können, die die zu untersuchenden Oberflächenmarker tragen, werden sog. Regionen (im englischen als Gates bezeichnet) benutzt. Diese Regionen begrenzen im Ergebnis-Dotplot bestimmte Bereiche, in denen sich die zu untersuchenden Zellen befinden, und selektieren sie somit. Die Grenzen der Regionen werden durch die vorher erfolgten Kontrollen mit ungefärbten Zellen und der einzelnen Farbstoffe definiert. So gelingt es am Ende nur diejenigen Zellen auszuwählen, die im jeweiligen Farbspektrum ein Lichtsignal emittiert haben und dementsprechend das Oberflächenantigen exprimieren. Es

werden in jedem Schritt nur diejenigen Zellen ausgewählt, die ein vorher festgelegtes Oberflächenantigen tragen bzw. eine bestimmte Eigenschaft aufweisen (z.B. lebendige Zellen oder beispielsweise CD271). Dies wird Schritt für Schritt wiederholt, bis man eine sehr definierte Zellpopulation herausgefiltert („gated“) hat. Somit kann der exakte Anteil dieser Zellpopulation an der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen berechnet werden. In Abb. 8 und 9 ist solch ein Vorgang beispielhaft abgebildet und beschrieben. Mittels der gewonnenen Daten konnte so u.a. die Häufigkeit von bestimmten Zellpopulationen an der Gesamtzellzahl bestimmt werden. Zudem ermöglichte das sog. Gating eine Untersuchung, welche Antigene auf den Zelloberflächen vorhanden sind und ob dieselben Zellen verschiedene Antigene tragen.

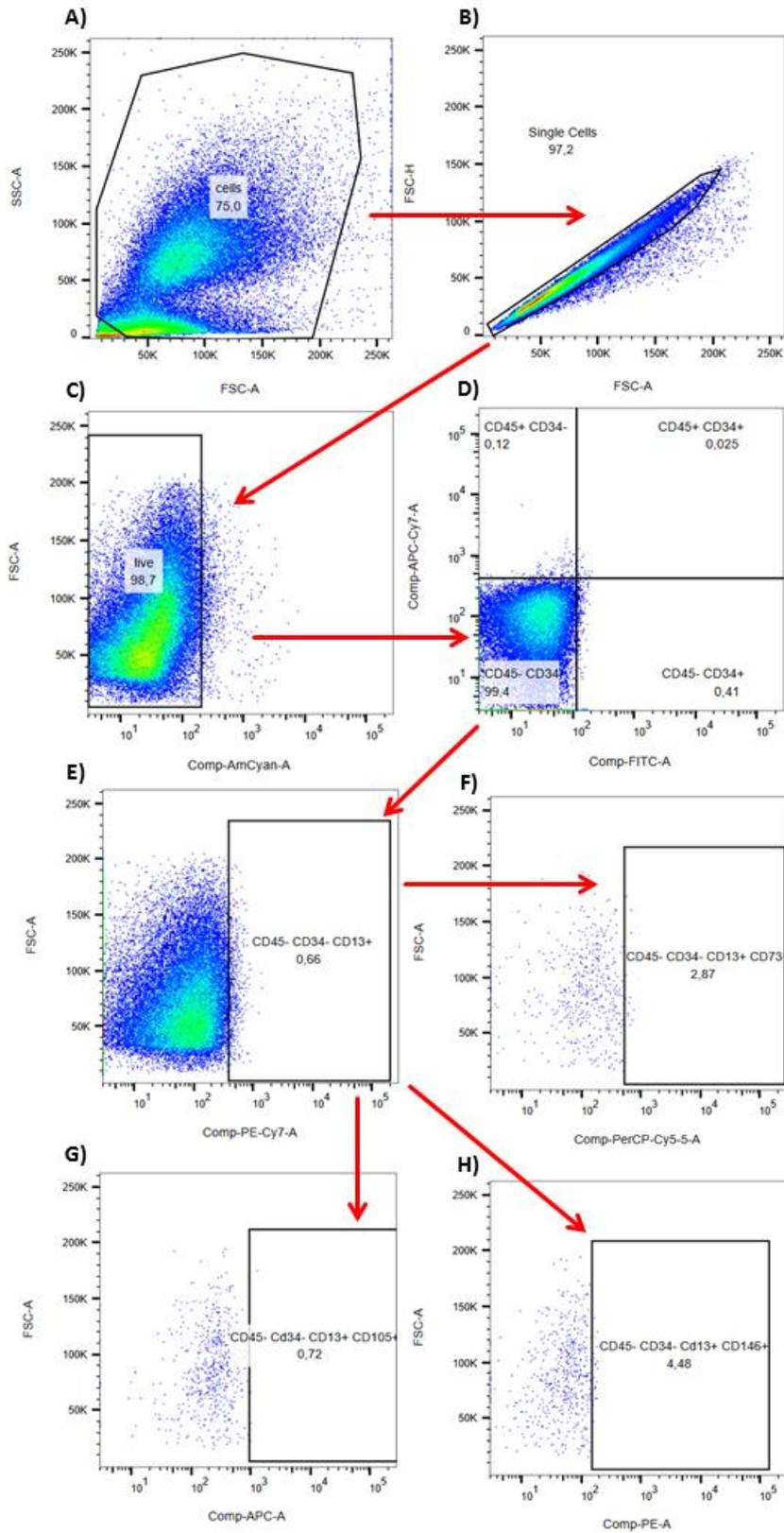


Abbildung 8: Darstellung der Regionen bzw. der Gating-Strategie für Versuchsansatz 3 zur Selektion nicht-hämatopoetischer Zellen aus den isolierten MNC. Das Bild zeigt die Auswahl der Regionen/ die

sog. Gating-Strategie für die Oberflächenmarker CD13, CD34, CD45, CD73, CD105 und CD146. Im ersten Schritt (A) wurden die Zellen anhand ihrer FSC/ SSC-Signale ausgewählt und so von Artefakten getrennt. Dann wurden die Einzelzellen ausgewählt, um Zelldupletten auszuschließen. Dies geschieht ebenfalls anhand des Streulichtes, welches sie verursachen - Erläuterung im Text oben (B). Mittels des Lebendfarbstoffes konnten aus den Einzelzellen die lebenden Zellen selektiert werden. Der Lebendfarbstoff färbt tote/ nicht lebende Zellen an, so dass die lebenden Zellen, dadurch selektiert werden können, dass sie nicht angefärbt sind (C). Aus der Population der lebenden Zellen konnten dann mit Hilfe der Lichtemissionen der Antikörper-gekoppelten Farbstoffe spezifische Zellen/ Zellpopulationen herausgefiltert werden. Da zur Segregation von MSC aus den isolierten Zellen keine hämatopoetischen Marker vorhanden sein durften, mussten die Zellen negativ für CD45 und CD34 sein. Deshalb wurden in den entsprechenden Farbkanälen (APC für CD45 und FITC für CD34) nur diejenigen Zellen ausgewählt, die dort keine Lichtemission zeigten (D). Von diesen doppelt negativen Zellen sollten im nächsten Schritt nur diejenigen ausgewählt werden, die CD13 exprimierten. Deshalb wurden nur Zellen berücksichtigt, die den CD13 Antikörper trugen und die deshalb im Farbspektrum des Farbstoffes am CD13 Antikörper (PE-Cy7) ein Signal verursachten (E). Aus der Population der CD45- CD34- und CD13+ wurden in drei weiteren Schritten, analog die Zellen ausgewählt, die CD45- CD34- CD13+ CD73+ (F) bzw. CD45- CD34- CD13+ 105+ (G) bzw. CD45- CD34- CD13+ CD146+ (H) waren.

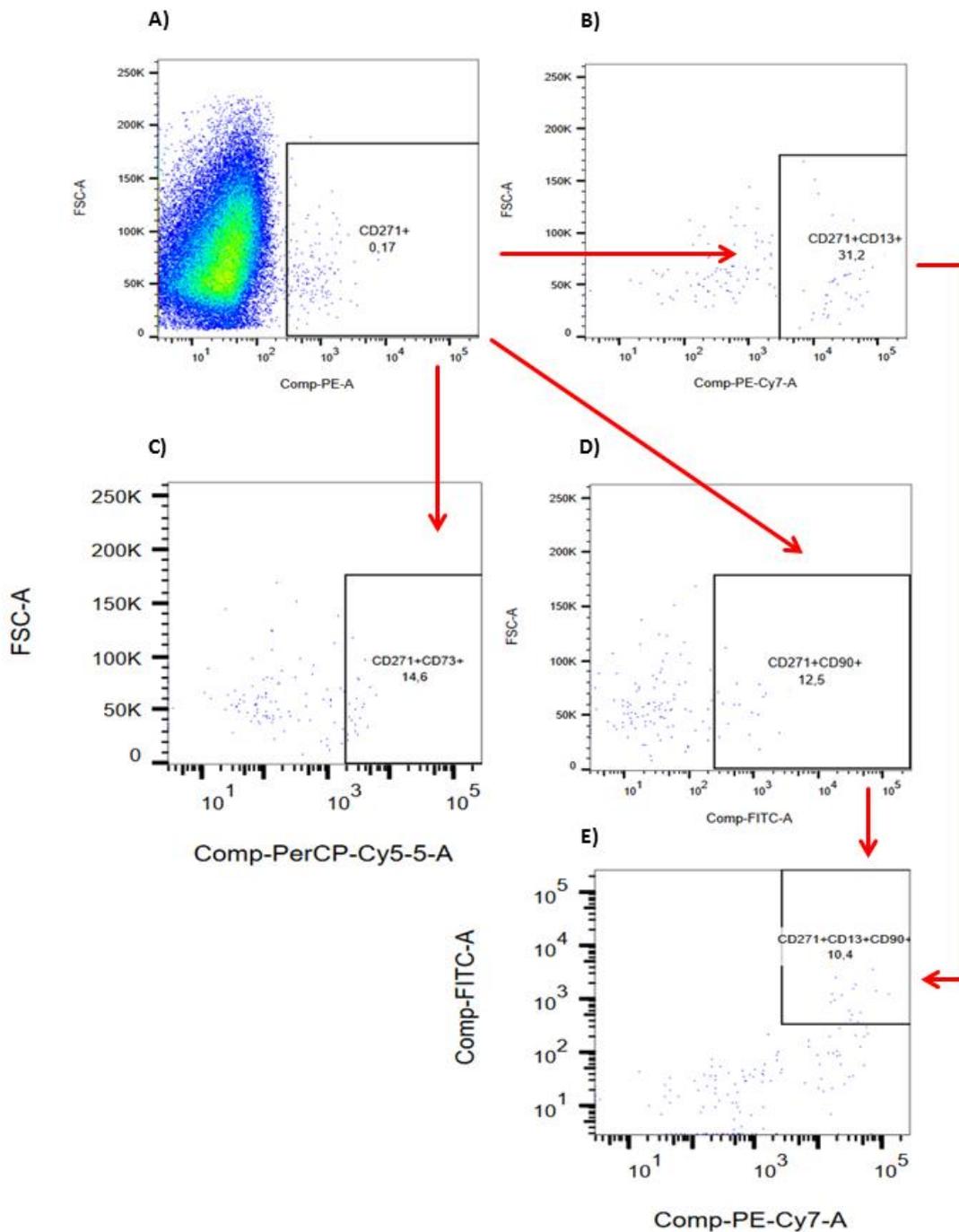


Abbildung 9: Darstellung der Regionen bzw. der Gating-Strategie für Versuchsansatz 4 zur Selektion von MSC aus den isolierten MNC. Analog zu Abb. 8 wurden zuerst Zellen, Einzelzellen und lebende Zellen gated (nicht erneut dargestellt). Aus der Population der lebenden Zellen (A) wurden diejenigen Zellen selektiert, die CD271 trugen. Ausgehend davon wurden in (B) Zellen selektiert, die zusätzlich noch CD13 positiv waren und dementsprechend im Kanal Pe-Cy7 Licht emittierten. In (C) wurde – erneut ausgehend von (A) – zusätzlich noch auf CD73 positive Zellen gated. In Teil (D) zusätzlich CD90 positive Zellen. In

Teil (E) wurde, nachdem zuvor für CD271 und CD13 gated wurde (B), noch für CD90 gated, so dass man eine Zellpopulation beschreiben konnte, die für alle drei Marker positiv war.

2.2.6. Adipogene Differenzierung

Die durch die Zellkultur selektierten MSC (siehe 2.2.3.1. und 2.2.3.2.) konnten für Experimente zu ihrer adipogenen Differenzierungsfähigkeit verwendet werden. Dazu wurden Zellen in Passage 1 verwendet. Nach Abschluss der Differenzierungsperiode wurden die gebildeten Lipidtröpfchen mit Öl-Rot-O-Färbelösung gefärbt, unter dem Mikroskop betrachtet, anschließend der Farbstoff aus den durch die MSC gebildeten Lipidtröpfchen herausgelöst und dieser dann zum Schluss mit Hilfe eines Photometers quantifiziert. So steht die Menge an gebundenem (und später herausgelöstem) Farbstoff stellvertretend für die Menge an gebildeten Lipidtröpfchen und damit für die adipogene Differenzierung der MSC.

2.2.6.1. Kulturbedingungen für die adipogene Differenzierung

Von den ex vivo expandierten MSC wurden einige für eine adipogene Differenzierung verwendet. Dazu wurden jeweils 32000 Zellen in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Das Medium bestand aus 10 ml Basalmedium der adipogenen Differenzierung, so wie 1 μ M Dexamethason, 500 μ M IBMX, 60 μ M Indomethacin und 5 μ g/ml Insulin. Der Mediumwechsel erfolgte analog zu 2.2.3.1. alle drei Tage. Die Dauer der Differenzierung betrug im Regelfall 14 Tage.

Weiterhin wurden Kontrollen angefertigt, die in den Wells zwar die MSC enthielten, aber zu deren Medium nicht die oben genannten Zusätze gegeben wurden.

2.2.6.2. Färbung und Quantifizierung der adipogenen Differenzierung

14 Tage nach Induktion der adipogenen Differenzierung wurde das auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und jedes Well zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde PFA (4 %) hinzugegeben, die 24-Well-Platten für 10 Minuten bei 4° C in den Kühlschrank gestellt und dann mit Reinstwasser ausgespült. Für 30

Sekunden wurde dann Isopropanol (60 %) hinzugegeben und dieses anschließend abgegossen. Folgend wurde die Öl-Rot-O-Färbelösung hinzugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Färbelösung abgegossen und erneut für 30 Sekunden durch Isopropanol (60 %) ersetzt. Dieses wurde im Anschluss mit Reinstwasser gewaschen, dann konnten unter dem Mikroskop Fotos der sich in den Wells befindlichen Zellen mit angefärbten Lipidtropfen gemacht werden. Für die Quantifizierung wurden die 24-Well-Platten erst an der Luft getrocknet, dann mit 500 µl Isopropanol (100 %) versetzt, abgedeckt und für 10 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Daraufhin wurden 100 µl aus jedem Well in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Im letzten Schritt wurde eine Standardverdünnungsreihe vom Öl-Rot-O-Farbstoff erstellt (siehe Tab. 8). Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl ebenfalls in eine 96-Well-Platte überführt. Von der 96-Well-Platte konnte dann im Photometer die Extinktion bei 450 nm gemessen werden. Durch die angefertigte Standardverdünnung war es möglich, die Menge an Farbstoff und damit die Menge an Lipidtropfen zu quantifizieren.

Tabelle 8: Standardverdünnungsreihe zur Kalibrierung der Messreihe des Öl-Rot-O-Farbstoffes.

Reaktionsgefäß	Verdünnungsstufe	Isopropanol 100 %	Anteil an Farbstoff
1	1:2	300 µl	300 µl Öl-Rot-O
2	1:4	300 µl	300 µl aus 1
3	1:8	300 µl	300 µl aus 2
4	1:16	300 µl	300 µl aus 3
5	1:32	300 µl	300 µl aus 4
6	1:64	300 µl	300 µl aus 5
7	1:128	300 µl	300 µl aus 6
8	Leerprobe	300 µl	-

2.2.7. Osteogene Differenzierung

Die ex vivo expandierten MSC (siehe 2.2.3.1. und 2.2.3.2.) konnten für Experimente zu ihrer osteogenen Differenzierungsfähigkeit verwendet werden. Dazu wurden parallel zum Versuch zur adipogenen Differenzierungsfähigkeit Zellen in Passage 1 verwendet. Die Bildung von mineralhaltiger EZM ist charakteristisch für die osteogene Differenzierung. Dieses Material kann mittels eines Farbstoffes angefärbt werden. Die Menge des gebundenen Farbstoffes kann als Maß für die Differenzierung verwendet werden. So wurde nach Abschluss der Differenzierung das durch die Zellen gebildete osteogene Material angefärbt, die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und der gebundene Farbstoff anschließend wieder herausgelöst. Mit Hilfe eines Photometers konnte die Menge des Farbstoffes quantifiziert werden - dazu wurde im Vorfeld eine Verdünnungsreihe erstellt. So war es möglich, die Menge des Farbstoffes als Maß für die osteogene Differenzierung der Zellen heranzuziehen.

2.2.7.1. Kulturbedingungen für die osteogene Differenzierung

Von den isolierten MSC (siehe 2.2.3.1.) wurden insgesamt je 40000 Zellen in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Dort wurden sie gleichmäßig mit Medium bedeckt. Das osteogene Induktionsmedium bestand aus 10 ml des Basalmediums für die osteogene Differenzierung (DMEM, Glucose 1 g/ L). Zusätzlich kamen noch frisch hinzu: 50 µg/ ml L-Ascorbinsäure-2 Phosphat, 5 mM β-Glycerophosphat und 10 nM Dexamethason. Der Mediumwechsel erfolgte analog zur 2.2.3.1. alle drei Tage. Die Dauer der Differenzierung betrug im Regelfall 21 Tage.

Weiterhin wurden Kontrollen angefertigt, die in den Wells zwar die MSC enthielten, aber zu deren Medium nicht die oben genannten Zusätze gegeben wurden.

2.2.7.2. Färbung und Quantifizierung der osteogenen Differenzierung

Nach Ende der Differenzierungsphase wurde das Medium in jedem Well abgesaugt, zweimal kaltes PBS hinzugegeben und abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol (70 %) fixiert, dann wurde die 24-Well-Platte für eine Stunde bei -20° C

gelagert. Anschließend daran wurde die 24-Well-Platte unter einen Abzug gestellt, bis das Ethanol verdampft war. Währenddessen wurde die 2 %ige Alizarin-Rot-Färbelösung frisch hergestellt. Nach Verdunsten des Ethanols wurden die Wells zweimal mit Reinstwasser gewaschen. Nachfolgend wurden in jedes Well 150 µl der Alizarin-Rot-Färbelösung gegeben und die gesamte 24-Well-Platte für 15 Minuten auf einen Schüttler gestellt (niedrige Stufe). Im Folgenden wurde die überschüssige Färbelösung in den Wells mit Reinstwasser ausgespült, so dass die Wells unter dem Mikroskop betrachtet und fotodokumentiert werden konnten. Anschließend wurde in jedes Well 400 µl der 10 %igen Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (die Vorbereitung dieser erfolgte in der Regel am Tag vor dem Experiment) gegeben und dann für 20 Minuten erneut auf den Schüttler gestellt - wieder auf einer niedrigen Stufe. Abschließend wurde die Lösung aus jedem Well in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Die Quantifizierung des Versuches erfolgte mittels Photometer bei 570 nm. Möglich wurde dies durch eine Standard-Messreihe, die ebenfalls in einer 96-Well-Platte angesetzt wurde.

Tabelle 9: Standardverdünnungsreihe zur Kalibrierung der Messreihe bei der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung mit Alizarin-Rot.

Reaktionsgefäß	10 %ige Cetylpyridiniumchlorid-Lösung	Alizarin-Rot-Anteil
1	950 µl	50 µl der 2 %igen Vorratslösung
2	500 µl	500 µl aus 1
3	500 µl	500 µl aus 2
4	600 µl	400 µl aus 3
5	500 µl	500 µl aus 4
6	500 µl	500 µl aus 5
7	600 µl	400 µl aus 6
8	500 µl	500 µl aus 7
Leerprobe	500 µl	-

2.2.8. Datenerhebung und Auswertung

2.2.8.1. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (Version 7), welches übliche statistische Tests durchführen kann. Die Normalverteilung innerhalb der Datensätze wurde mit dem Pearson-D'Agostino-Test bestimmt. Waren alle Datensätze normalverteilt, wurde mit parametrischen Analysen weitergearbeitet, andernfalls wurden nicht-parametrische Analysen verwendet. Wurden zwei Datensätze miteinander verglichen, war die parametrische Analyse der ungepaarte T-Test, die nicht parametrische der Mann-Whitney-Test. Wurden zwei oder mehr Gruppen miteinander verglichen, wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, da es nur nicht-parametrisch verteilte Gruppen im Rahmen dieser Studie gab. Für einige Datensätze wurde mittels GraphPad Prism eine lineare Regression erstellt und auf Korrelationen zwischen den Datensätzen geprüft. Bei einer vorliegenden Normalverteilung der Wertepaare wurde ein Pearson-Test verwendet. Waren die Wertepaare nicht normalverteilt, wurde ein Spearman-Test verwendet. Dazu wurden jeweils die entsprechenden Funktionen des Programms verwendet.

2.2.8.2. Grafische Darstellung

Die grafische Darstellung der Ergebnisse und die der statistischen Berechnungen erfolgten mittels GraphPad Prism (Version 7). Angegeben ist immer der Mittelwert der Daten \pm der Standardabweichung. Bildbearbeitungen wurden mittels ImageJ, Paint, Snipping Tool und Powerpoint vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Bildung von CFU-F in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Bildung von CFU-F durch frisch ausgesäte mononukleäre Zellen eine Korrelation zu bestimmten Parametern der Knochenmarksdonoren zeigt. Die Bildung von CFU-F stellt eine Messgröße für die Quantifizierung von MSC dar [35]. Folgende Parameter wurden auf eine mögliche Korrelation untersucht: Alter, BMI, Geschlecht und K&L Score. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist ein weiterer Teil, der das Vorkommen von CFU-F mit der Frequenz von Zellen mit bestimmten Oberflächenmarkern vergleicht, in einem separaten Teil dargestellt (siehe 3.3.1.). Die Quantifizierung der gebildeten CFU-F erfolgte wie in 2.2.3.3. beschrieben und wurde als Prozentsatz ausgerechnet und dargestellt.

3.1.1. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom Alter

Da das Alter ein gut vergleichbarer Parameter ist und einen großen Einfluss auf viele Funktionen des menschlichen Körpers hat – auch auf das muskuloskelettale System – war es interessant zu untersuchen, ob sich das Alter von Patienten mit Coxarthrose auch auf die Bildung von CFU-F auswirkt. Es treffen in diesem Fall zwei das Gelenk betreffende Faktoren zusammen, zum einen verändert sich die Struktur von Gelenken bzw. die Zusammensetzung ihres Knorpelgewebes durch das Alter, zum anderen durch die Arthrose. Auch der Knochen an sich zeigt mit dem Alter Veränderungen, was die Grundlage für einige degenerative muskuloskelettale Erkrankungen bildet [2, 4]. Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation wurde die Anzahl an gebildeten CFU-F gegen das Alter der Donoren aufgetragen (siehe Abb. 10).

% CFU in Abhängigkeit vom Alter der Donoren

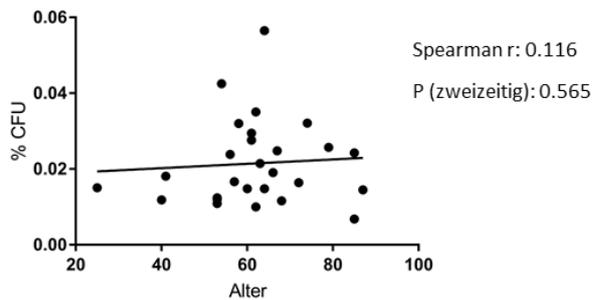


Abbildung 10: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom Alter der Donoren. Aufgetragen ist der Prozentsatz an gebildeten CFU-F bei 250000 ausgesäten mononukleären Zellen aus frischen Knochenmarksproben in Abhängigkeit vom Alter der Donoren. Das Alter ist in Jahren angegeben. Eine lineare Regression durch die Werte wurde durchgeführt (schwarze Linie). Der Stichprobenumfang betrug 27 Donoren. Die statistische Testung wurde mittels eines Spearman-Tests durchgeführt.

Es zeigte sich statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gebildeten CFU-F aus den mononukleären Zellen aus frischen Knochenmarksproben und dem Alter der Donoren. Das Alter der Donoren variierte zwischen 25 und 87 Jahren. Der Mittelwert des Alters lag bei 61,85 ($\pm 13,85$) Jahren. Der Mittelwert der gebildeten CFU-F lag bei 0,022 ($\pm 0,011$) % der ausgesäten Zellen.

3.1.2. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom BMI

In diesem Teil wurde untersucht, ob der BMI der Donoren einen Einfluss auf die Anzahl an gebildeten CFU-F hat. Das Körpergewicht hat einen großen Einfluss auf viele Prozesse im Körper, so entsteht durch Übergewicht unter anderem eine Entzündungsreaktion im Körper, zudem ist Adipositas ein bekannter Risikofaktor für Arthrose [6, 26]. Deshalb sollte untersucht werden, ob der BMI auch einen Einfluss auf die MSC im Knochenmark hat. Dazu wurde der Prozentsatz an gebildeten CFU-F von 250000 ausgesäten mononukleären Zellen in Bezug zum BMI der Donoren gesetzt (siehe Abb. 11). (Der BMI diente in dieser Studie dazu, das Gewicht der Donoren anschaulicher zu machen und in Bezug zu ihrer Körpergröße zu setzen).

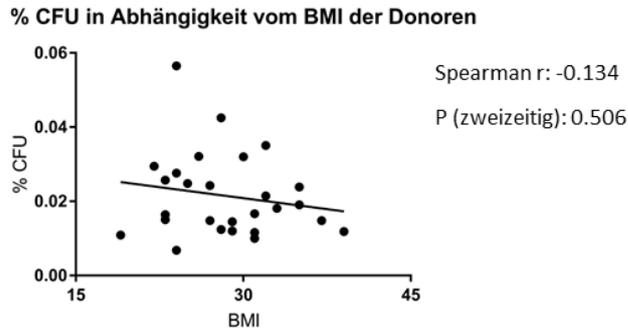


Abbildung 11: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom BMI der Donoren. Aufgetragen ist der Prozentsatz an gebildeten CFU-F bei 250000 ausgesäten mononukleären Zellen in Abhängigkeit vom BMI der Donoren. Eine lineare Regression durch die Werte wurde durchgeführt (schwarze Linie). Die Anzahl der Donoren für diesen Teil der Studie betrug 27. Der BMI ist in kg/m^2 angegeben. Die statistische Testung wurde mittels eines Spearman-Tests durchgeführt.

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation von BMI und Anzahl der gebildeten CFU-F. Der niedrigste BMI im Patientenkollektiv betrug $19 \text{ kg}/\text{m}^2$, der höchste BMI war $39 \text{ kg}/\text{m}^2$. Im Mittelwert lag der BMI bei $28,41 (\pm 4,963) \text{ kg}/\text{m}^2$. Das Donorenkollektiv war im Mittel dementsprechend leicht übergewichtig [105]. Im Mittel bildeten sich aus den ausgesäten 250000 mononukleären Zellen $0,022 (\pm 0,011) \% \text{ CFU-F}$.

3.1.3. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom Geschlecht

Um zu untersuchen, ob das Geschlecht einen Effekt auf die Anzahl an gebildeten CFU-F aus frisch ausgesäten mononukleären Zellen hat, wurden die Donoren in Gruppen nach ihrem Geschlecht eingeteilt und miteinander verglichen (siehe Abb. 12).

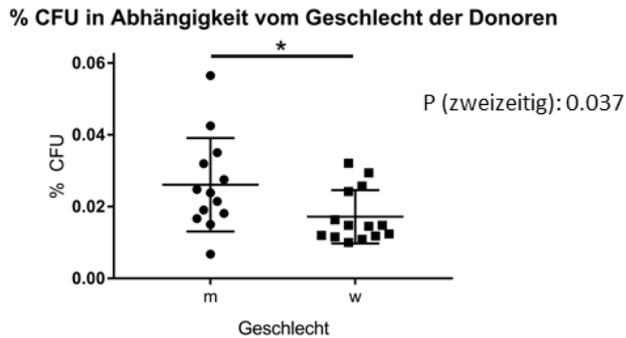


Abbildung 12: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom Geschlecht der Donoren. Aufgetragen ist der Prozentsatz an gebildeten CFU-F bei 250000 ausgesäten Zellen in beiden Geschlechtern (m=männlich, w=weiblich). Der Balken mit Stern zeigt an, dass es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl an gebildeten CFU-F zwischen den beiden Geschlechtern gibt. Die Anzahl an männlichen Donoren in dieser Studie war 13, die der weibliche Donoren betrug 14. Die beiden Gruppen wurden mittels eines ungepaarten T-Tests zweizeitig miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass sich bei männlichen Donoren im Schnitt mehr CFU-F aus mononukleären Zellen bildeten als bei weiblichen Donoren. Die Mittelwerte beider Gruppen unterscheiden sich signifikant. Bei den männlichen Donoren wurden im Schnitt zu 0,026 (± 0,018) % CFU-F gebildet, bei den weiblichen Donoren zu 0,017 (± 0,007) %. Die statistische Analyse, ob sich beide Geschlechter statistisch signifikant unterscheiden, wurde mittels eines ungepaarten T-Tests (P-Wert (zweizeitig): 0,037) durchgeführt. Dieser zeigte, da der P-Wert kleiner als 0,05 war, einen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Donoren.

3.1.4. Bildung von CFU-F durch MSC aus arthrotischen Hüftgelenken in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score

Das Kellgren & Lawrence System zur Klassifikation der Arthrose ist zwar letztendlich ein sehr subjektives, vom Befundenden abhängiges System, jedoch hat es sich als Standard zum Einteilen des Schweregrades von Arthrosen im Hüftgelenk etabliert [106]. Daher wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht, ob es Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an gebildeten CFU-F zwischen den unterschiedlichen Kellgren & Lawrence Einteilungen der Donoren gab. Da es im Donorenkollektiv keine Donoren mit

einem Score von 1 gab, sind daher nur die Gruppen mit einem Score von 2-4 berücksichtigt (siehe Abb. 13).

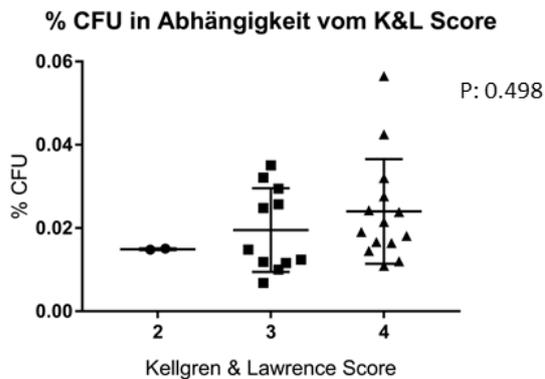


Abbildung 13: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score der jeweiligen Hüftgelenke, aus denen die Zellen isoliert wurden. Die Donoren sind nach ihrem jeweiligen K&L Score gruppiert. Aufgetragen ist der Prozentsatz der CFU-F Bildung nach Aussaat von 250000 mononukleären Zellen aus frischen Knochenmarkspalten in den jeweiligen Gruppen. In der Gruppe mit einem K&L Score von 2 gab es 2 Donoren, in der Gruppe mit einem K&L Score von 3 gab es 11 Donoren und in der Gruppe mit einem K&L Score von 4 waren es 14 Donoren. Die statistische Analyse erfolgte mittels eines Kruskal-Wallis-Tests.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Bildung von CFU-F zwischen Donoren mit unterschiedlichen Scores im K&L System. Für die Effektivität der CFU-F Bildung bei 250000 ausgesäten Zellen lagen die Mittelwerte bei 0,015 ($\pm 0,0002$) % für die Gruppe mit einem K&L Score von 2, bei 0,02 ($\pm 0,01$) % in der Gruppe mit einem K&L Score von 3 und 0,024 ($\pm 0,013$) % bei den Donoren mit einem K&L Score von 4.

3.2. Differenzierungseigenschaften

In diesem Teil der Studie wurde untersucht, ob die Fähigkeit der aus dem Reaming isolierten MSC osteogen und adipogen zu differenzieren in Zusammenhang mit verschiedenen erhobenen Parametern der Donoren steht. Als Maß für die osteogene Differenzierung der Zellen wurde die Mineralablagerung durch sie in der EZM herangezogen. Die abgelagerten Mineralien konnten mittels Alizarin-Rot angefärbt werden und lichtmikroskopisch dargestellt werden, beispielhaft dargestellt in Abb. 14.

Anschließend wurde der Farbstoff aus der EZM herausgelöst und mittels eines Photometers anhand einer Standard-Verdünnungsreihe quantifiziert. Die adipogene Differenzierung wurde mittels Färbung von Lipidtröpfchen beurteilt. Dabei wurden die durch die MSC gebildeten Lipidtröpfchen mittels des Farbstoffes Öl-Rot-O angefärbt. Auch hier wurden lichtmikroskopische Bilder angefertigt, bevor der Farbstoff anschließend aus der EZM herausgelöst und dann mittels Photometer quantifiziert wurde. In beiden Differenzierungen steht die so gemessene Menge an Farbstoff jeweils stellvertretend für die Differenzierungsfähigkeit der MSC. Untersucht wurden mögliche Zusammenhänge der Differenzierungsfähigkeit der MSC mit dem Alter, BMI, Geschlecht und dem K&L Score.

A) Osteogene Differenzierung B) Adipogene Differenzierung

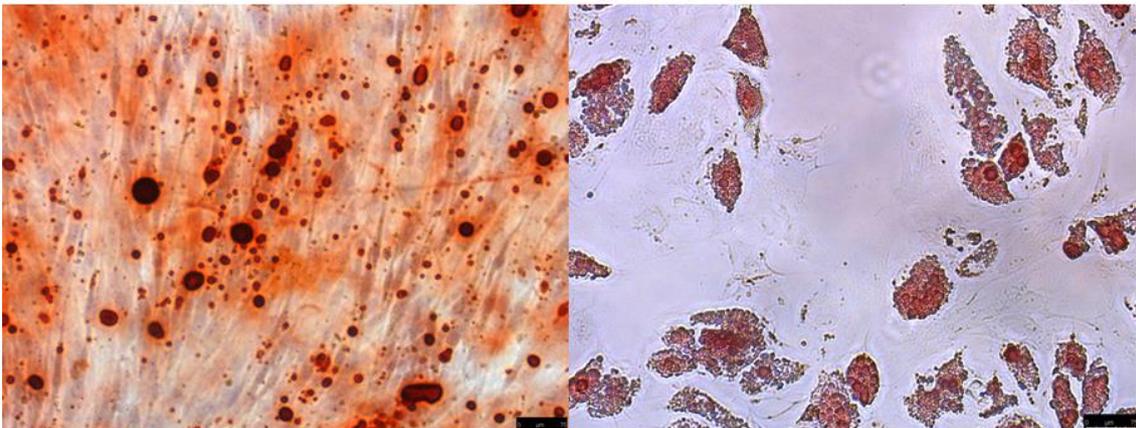


Abbildung 14: Mikroskopbilder nach erfolgter osteogener bzw. adipogener Differenzierung der MSC. In Teil (A) sind die durch das Alizarin-Rot angefärbten Mineralablagerungen zu sehen. In Teil (B) die durch Öl-Rot-O angefärbten Lipidtröpfchen. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von 75 µm.

3.2.1. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit von Alter

Wie vorherig beschrieben wirkt sich das Alter im menschlichen Organismus auf Zellen und Gewebe und damit letztendlich auch auf die Gesundheit des Körpers aus. In Gelenken kann sich dieser Alterseffekt ebenfalls zeigen, z.B. in Form einer Arthrose. Dabei treten u.a. zwei Phänomene auf, die direkt mit dem Knochen in Verbindung stehen: Mikrofrakturen und Osteophyten [4, 6]. Weiterhin steigt im Alter nicht nur der generelle Körperfettanteil, sondern es verfettet ebenfalls das dann ehemals rote,

blutbildende Knochenmark und das gelbe Knochenmark, auch Fettmark genannt, vermehrt sich [37]. Aus diesen Gründen sollten die MSC im Hinblick auf ihre Fähigkeit osteogen bzw. adipogen zu differenzieren in Abhängigkeit vom Alter der Donoren untersucht werden (siehe Abb. 15).

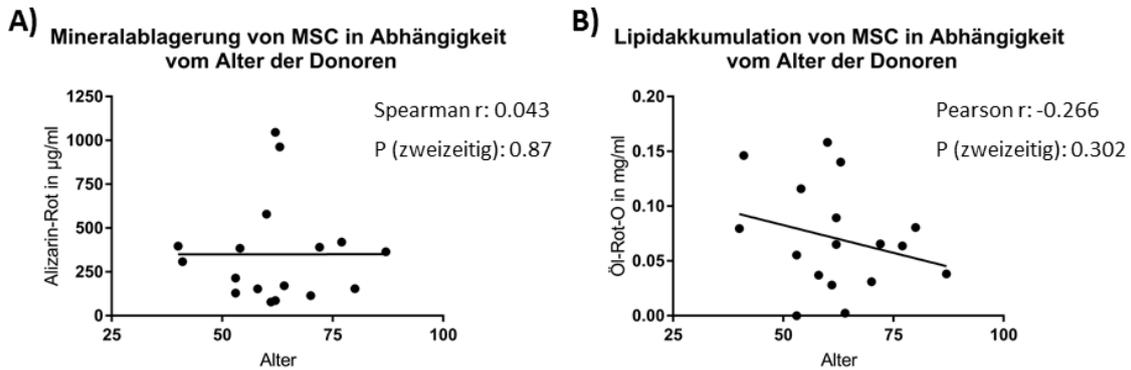


Abbildung 15: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom Alter der Donoren. In (A) ist die, durch das von MSC gebildete osteogene Material, gebundene Menge an Alizarin-Rot gegen das Alter der Donoren aufgetragen. Der Farbstoff färbt von den Zellen gebildete Mineralien an und steht stellvertretend für die osteogene Differenzierung der Zellen. In (B) ist die, durch die von MSC gebildeten Lipidtröpfchen, eingelagerte Menge an Öl-Rot-O dargestellt. Sie steht stellvertretend für die adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC. Die schwarze Linie ist jeweils eine lineare Regressionsgerade durch die Wertepaare. Die Anzahl an Donoren betrug 17. Das Alter ist in Jahren angegeben. Die statistische Testung wurde mittels eines Spearman- bzw. Pearson-Tests durchgeführt.

Es zeigte sich, dass es keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Donoren und dem durch die MSC gebildeten osteogenen oder adipogenen Material gibt. Das Alter der Donoren reichte von 40 bis 87 Jahre. Der Mittelwert des Alters betrug 62,18 (\pm 12,54) Jahre. Der Mittelwert für die Bildung des osteogenen Materials, quantifiziert durch den Farbstoff Alizarin-Rot, betrug 350,8 (\pm 284,9) μ g/ ml Alizarin-Rot. Der Mittelwert des in den Zellen eingelagerten und anschließend gemessenen Farbstoffes Öl-Rot-O, der stellvertretend für die adipogenen Differenzierung steht, betrug 0,07 (\pm 0,048) mg/ ml. Es zeigte sich, v.a. bei der osteogenen Differenzierung der MSC eine große Variabilität zwischen den Donoren, welche sich in der großen Standardabweichung niederschlägt.

3.2.2. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit vom BMI

Wie u.a. in der Einleitung dargestellt, gilt Adipositas nicht nur als Risikofaktor für Arthrose, sondern wirkt über Adipokine zusätzlich auch entzündungsfördernd. Bei Adipositas steigt die Zahl der Adipozyten im Knochenmark [24]. Das muskuloskeletale System ist von Übergewicht dementsprechend stark betroffen und es ist nicht geklärt, in wie weit sich diese Effekte der Adipositas auf die im Knochenmark befindlichen MSC auswirken. Daher sollte in diesem Teil der Studie untersucht werden, ob die Fähigkeit der MSC osteogen bzw. adipogen zu differenzieren, vom BMI statistisch signifikant beeinflusst wird (siehe Abb. 16).

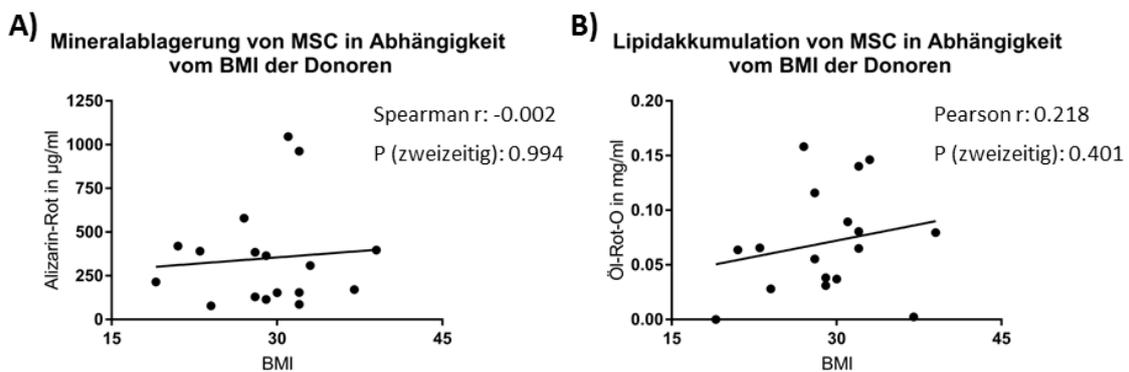


Abbildung 16: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom BMI der Donoren. In (A) ist die, durch das von MSC gebildete osteogene Material, gebundene Menge an Alizarin-Rot gegen den BMI der Donoren aufgetragen. Der Farbstoff färbt von den Zellen gebildete Mineralien an und steht stellvertretend für die osteogene Differenzierung der Zellen. In (B) ist die, durch die von MSC gebildeten Lipidtröpfchen, eingelagerte Menge an Öl-Rot-O dargestellt. Sie steht stellvertretend für die adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC. Die schwarze Linie ist jeweils eine lineare Regressionsgerade durch die Wertepaare. Die Anzahl an Donoren betrug 17. Der BMI ist in kg/m^2 angegeben. Die statistische Testung wurde mittels eines Spearman- bzw. Pearson-Tests durchgeführt.

Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem BMI und der Bildung von osteogenem bzw. adipogenem Material durch die MSC. Der niedrigste BMI in der Gruppe der Donoren war $19 \text{ kg}/\text{m}^2$, der höchste $39 \text{ kg}/\text{m}^2$. Im Mittel betrug der BMI $29,06 (\pm 5,262) \text{ kg}/\text{m}^2$. Dies zeigt, dass die Donoren im Mittel leicht übergewichtig waren [105]. Der Mittelwert für die Bildung des osteogenen Materials quantifiziert durch den Farbstoff betrug $350,8 (\pm 284,9) \mu\text{g}/\text{ml}$ Alizarin-Rot. Der Mittelwert des

gebildeten adipogenen Materials, welches durch Öl-Rot-O stellvertretend quantifiziert wurde, belief sich auf $0,07 (\pm 0,048)$ mg/ ml Öl-Rot-O. An dieser Stelle zeigt sich erneut eine große Variabilität zwischen den Donoren, v.a. bei der osteogenen Differenzierung der MSC.

3.2.3. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit vom Geschlecht

Da es geschlechtsspezifische Unterschiede im menschlichen Körper gibt, sollten die Differenzierungseigenschaften der MSC untersucht werden. So ist unter anderem die Fettverteilung im zwischen Männern und Frauen deutlich unterschiedlich, da Frauen im allgemeinen mehr Körperfett aufweisen [107]. Zudem konnte in 3.1.3. gezeigt werden, dass es einen Unterschied in der Häufigkeit der CFU-F Bildung aus mononukleären Zellen zwischen den Geschlechtern gibt. Weiterhin zeigen sich auch im Knochenstoffwechsel Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Frauen verlieren im Alter mehr Knochenmasse als Männer [2]. Um diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden weiter nachzugehen, wurden in diesem Teil der Studie MSC auf geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer adipogenen und osteogenen Differenzierungsfähigkeit untersucht (siehe Abb. 17).

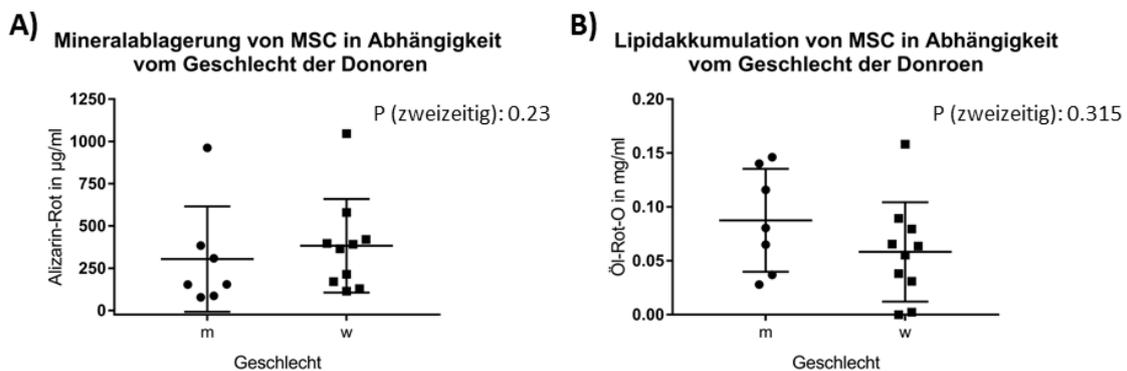


Abbildung 17: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom Geschlecht der Donoren in Gruppen (m=männlich, w=weiblich). In (A) ist die, durch das von MSC gebildete osteogene Material, gebundene Menge an Alizarin-Rot und das Geschlecht der Donoren aufgetragen. Der Farbstoff färbt von den Zellen gebildete Mineralien an und steht stellvertretend für die osteogene Differenzierung der Zellen. In (B) ist die, durch die von MSC gebildeten Lipidtröpfchen, eingelagerte Menge an Öl-Rot-O und das Geschlecht dargestellt. Sie steht stellvertretend für die adipogene

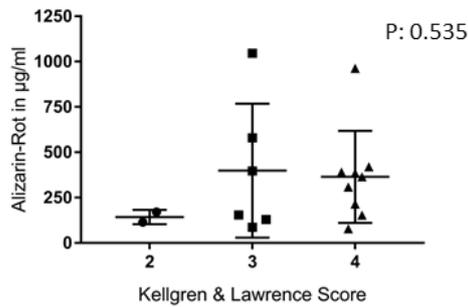
Differenzierungsfähigkeit der MSC. Die Anzahl an männlichen Donoren betrug 7, die an weiblichen 10. Die statistische Testung wurde jeweils mittels eines Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Donoren in Bezug auf die Bildung von osteogenem und adipogenem Material durch MSC festgestellt werden. Somit unterscheiden sich die osteogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC nicht zwischen den beiden Geschlechtern. Der Mittelwert des eingelagerten und anschließend herausgelösten Farbstoffes für die osteogene Differenzierung betrug bei den männlichen Donoren $304,5 (\pm 311,7) \mu\text{g}/\text{ml}$ Alizarin-Rot, bei den weiblichen Donoren betrug er $383,2 (\pm 277) \mu\text{g}/\text{ml}$ Alizarin-Rot (Abb. 17). Für die adipogene Differenzierung konnte ein Mittelwert bei den männlichen Donoren von $0,088 (\pm 0,048) \text{mg}/\text{ml}$ Öl-Rot-O, bei den weiblichen Donoren ein Mittelwert von $0,058 (\pm 0,046) \text{mg}/\text{ml}$ Öl-Rot-O gemessen werden. Auch in diesem Teil der Studie zeigt sich erneut eine große Variabilität der Donoren in den Differenzierungseigenschaften, so dass die Standardabweichung sogar in einem Fall größer war als das Messergebnis selbst.

3.2.4. Differenzierungseigenschaften von MSC in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang von der Fähigkeit der MSC osteogen bzw. adipogen zu differenzieren und der radiologischen Klassifikation nach Kellgren & Lawrence zeigt (siehe Abb. 18). In dieses Scoring fließen z.B. auch gebildete Osteophyten ein, sowie weitere knöcherne Veränderungen auf makroskopischer Ebene [106]. Außerdem hat eine Arthrose auch eine entzündliche Komponente, so dass es möglich schien, dass sich mit dem K&L Score auch die Fähigkeit zur Differenzierung der MSC verändert. Weiterhin ist es noch nicht geklärt, ob die Schwere der Arthrose auch einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit von MSC hat. Es gab, analog zu den vorherigen Untersuchungen, keinen Donor, der einen K&L Score von 1 aufwies, weshalb diese Gruppe nicht berücksichtigt werden konnte.

A) Mineralablagerung von MSC in Abhängigkeit vom K&L Score der Donoren



B) Lipidakkumulation von MSC in Abhängigkeit vom K&L Score der Donoren

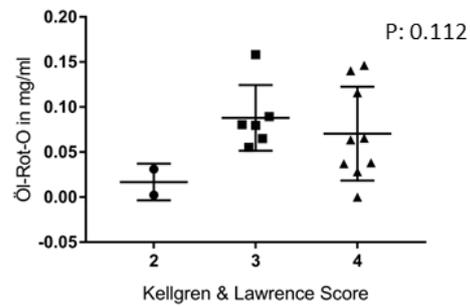


Abbildung 18: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score der jeweiligen Hüftgelenke, aus denen sie isoliert wurden. In (A) ist die, durch das von MSC gebildete osteogene Material, gebundene Menge an Alizarin-Rot und der Kellgren & Lawrence Score der Donoren aufgetragen. Der Farbstoff färbt von den Zellen gebildete Mineralien an und steht stellvertretend für die osteogene Differenzierung der Zellen. In (B) ist die, durch die von MSC gebildeten Lipidtröpfchen, eingelagerte Menge an Öl-Rot-O und der Kellgren & Lawrence Score dargestellt. Sie steht stellvertretend für die adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC. In der Gruppe mit einem K&L Score von 2 gab es 2 Donoren, in der Gruppe mit einem K&L Score von 3 gab es 6 Donoren und in der Gruppe mit einem K&L Score von 4 waren es 9 Donoren. Die statistische Testung wurde mittels eines Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt.

Es zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit verschiedenen K&L Scores sowohl für die osteogene als auch für die adipogene Differenzierung. In der osteogenen Differenzierung ließen sich im Mittel folgende Werte für Alizarin-Rot messen: In der Gruppe K&L 2 ein Wert von 143,1 (\pm 39,74) $\mu\text{g}/\text{ml}$, bei K&L 3 von 399,3 (\pm 369,2) $\mu\text{g}/\text{ml}$ und bei K&L 4 von 364,6 (\pm 253,4) $\mu\text{g}/\text{ml}$. Für die adipogene Differenzierung ließen sich folgende Werte für Öl-Rot-O messen: für K&L 2 ein Wert von 0,017 (\pm 0,02) mg/ml , für K&L 3 von 0,088 (\pm 0,037) mg/ml und für K&L 4 von 0,071 (\pm 0,052) mg/ml . Weiterhin ist in diesem Teil wieder eine deutliche Variabilität in der Effektivität der Differenzierungseigenschaften zwischen den einzelnen Donoren sichtbar.

3.3. Vergleich verschiedener potentieller Oberflächenmarker von MSC

Da es bisher für frisch aus dem Knochenmark isolierte MSC noch keine Oberflächenmarkerkombination gibt, mittels derer sie sich hinreichend beschreiben lassen, sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob sich eben solch ein Oberflächenmarker bzw. eine Oberflächenmarkerkombination findet, die diese Identifikation möglich macht. Für einen genaueren Überblick über die verwendeten Oberflächenmarker und ihrer Kombinationen siehe 1.4.. Auf Grundlage von Ergebnissen bisheriger Forschungen sollten potentielle MSC-Markerkombinationen miteinander verglichen werden, um zu überprüfen, ob sich durch sie dieselben Zellpopulationen identifizieren lassen. Zuerst wurde untersucht, ob es möglich ist, eine Korrelation zwischen der Anzahl an gebildeten CFU-F und den putativen Oberflächenmarkern bzw. bestimmten Kombinationen dieser herzustellen. Somit sollte untersucht werden, ob die Zellen, die CFU-F bilden und die untersuchten Oberflächenmarker tragen, möglicherweise dieselbe Zellpopulation darstellen. Anschließend wurde analysiert, ob bestimmte Oberflächenmarker untereinander korrelieren, um mögliche Rückschlüsse darauf zu ziehen, ob diese auf bestimmten Zellpopulationen möglicherweise gemeinsam vorkommen und somit als gute Kombination in weiteren Versuchen dienen könnten. In einem letzten Teil der Studie wurde untersucht, ob es Veränderungen an der Quantität dieser Oberflächenmarker/-kombinationen in Bezug auf die im vorherigen Teil schon dargestellten Parameter Alter, BMI, Kellgren & Lawrence Score oder Geschlecht der Donoren gab. All diese Untersuchungen wurden in der Hoffnung durchgeführt, eine bessere Charakterisierung bzw. Identifikation von frisch isolierten MSC möglich zu machen.

So war eine der untersuchten Kombinationen z.B. die Kombination von CD271, CD13 und CD90 positiven Zellen, da auch CD13 ein von mehreren Autoren als putativer MSC Marker gehandelt wird [80, 82, 84]. Überdies wurde das allgemein hin bekannte Perizyten Panel CD34- CD45- CD146+ [67] um CD13 erweitert. CD146, der auch in der Abgrenzung von Perizyten genutzt wird [88], wurde ebenfalls in diesen Kombinationen

eingeschlossen, da der Unterschied zwischen Perizyten und MSC noch nicht vollständig geklärt ist.

3.3.1. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Relation zu den gebildeten CFU-F

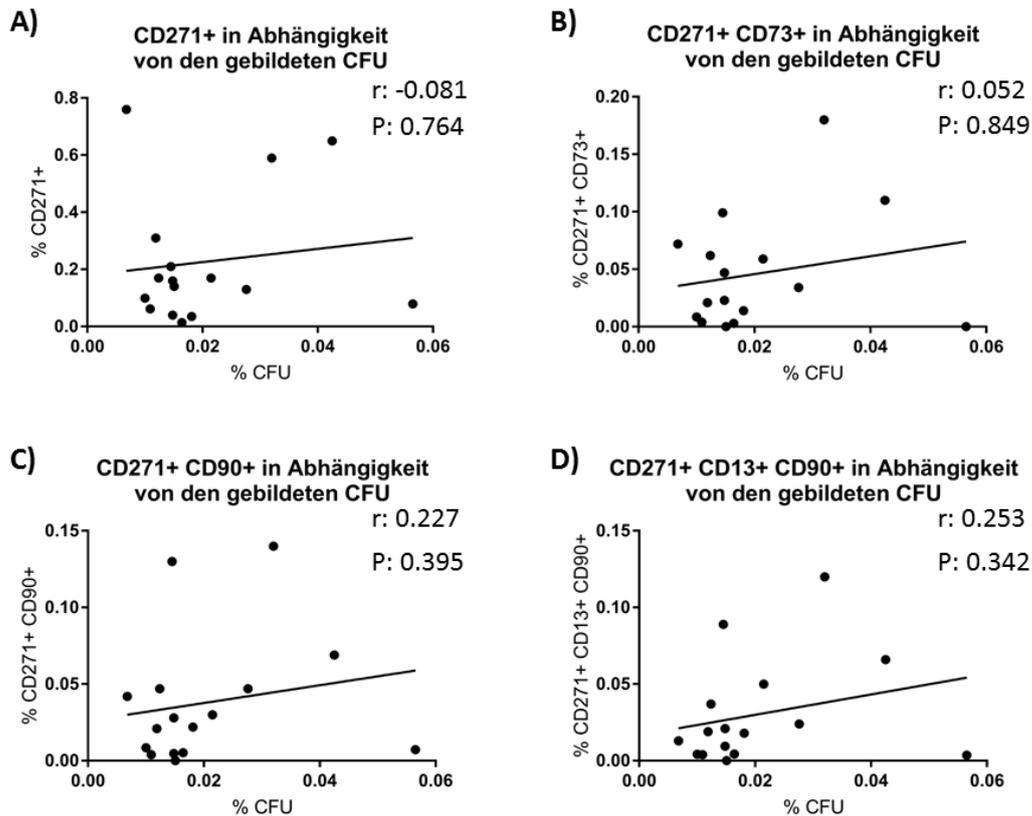
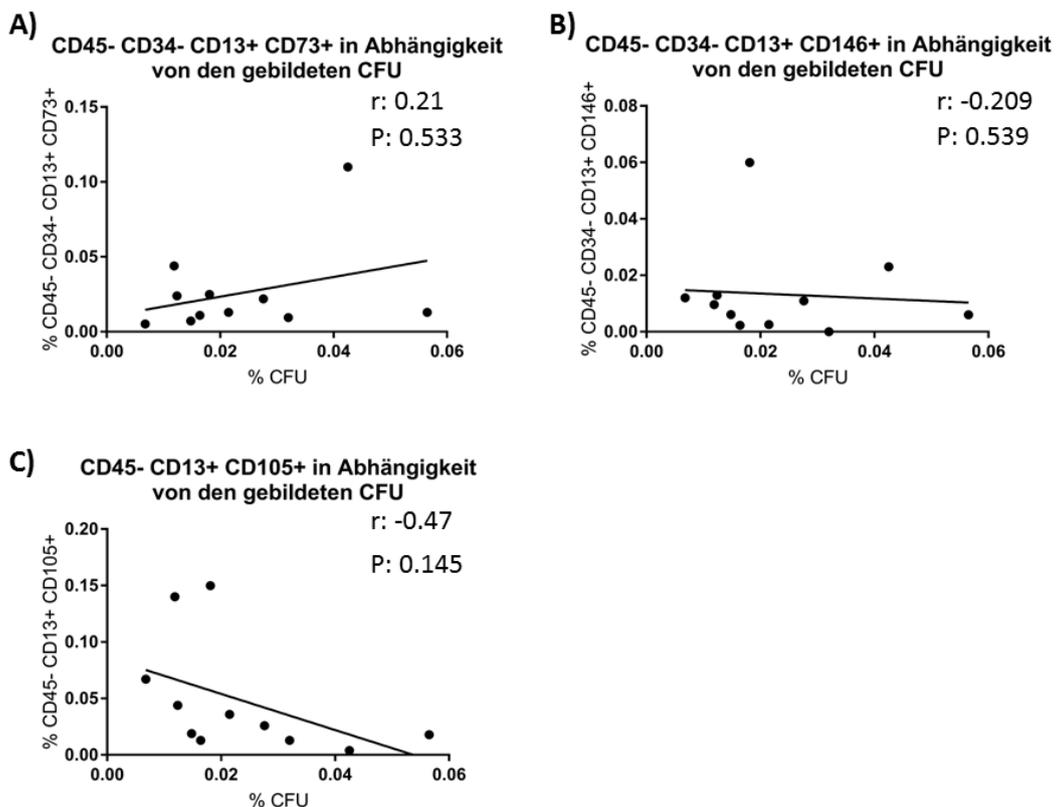


Abbildung 19: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit von der Anzahl gebildeter CFU-F - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. In jeder Teilabbildung sind verschiedene Oberflächenmarker bzw. deren Kombinationen gegen den Prozentsatz an gebildeten CFU-F bei 250000 ausgesäten mononukleären Zellen aus frischem Knochenmark aufgetragen. Die Detektion der mittels spezifischen Antikörpern angefärbten Oberflächenmarker erfolgte durch Durchflusszytometrie. Die Prozentzahlen der Zellen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen/ Zellpopulationen an den lebenden Zellen. Die schwarze Linie ist jeweils eine lineare Regression durch die Werte. Die Anzahl der Donoren betrug jeweils 16. Die statistische Testung auf eine mögliche Korrelation der Wertepaare erfolgte jeweils durch einen Spearman-Test.

Es zeigte sich für keine der untersuchten und in Abb. 19 dargestellten Kombinationen von Oberflächenmarkern eine Korrelation mit den gebildeten CFU-F von ausgesäten mononukleären Zellen aus frischem Knochenmark. Der in Prozent angegebene Mittelwert der gebildeten CFU-F von 250000 ausgesäten Zellen war dabei jeweils 0,02 ($\pm 0,013$) %. Der Mittelwert der CD271 positiven Zellen betrug dabei 0,226 ($\pm 0,233$) % aller lebenden Zellen. Weiterhin wurden Zellen selektiert, die positiv für CD271 und CD73 waren. Im Mittel kamen diese mit einer Häufigkeit von 0,046 ($\pm 0,05$) % vor. Zellen, die sowohl CD271 als auch CD90 trugen, kamen im Mittel zu 0,038 ($\pm 0,043$) % in der lebenden Zellpopulation der Studie vor. Zellen, die sowohl CD271 als auch CD13 und CD90 auf ihrer Oberfläche exprimieren, hatten im Mittel eine Häufigkeit von 0,03 ($\pm 0,035$) %.



Abbildungung 20: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit von der Anzahl gebildeter CFU-F - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. In jeder Teilabbildung sind verschiedene Oberflächenmarker bzw. deren Kombinationen gegen den Prozentsatz an gebildeten CFU-F bei 250000 ausgesäten mononukleären

Zellen aus frischem Knochenmark aufgetragen. Die Detektion der mittels spezifischen Antikörpern angefärbten Oberflächenmarker erfolgte durch Durchflusszytometrie. Die Prozentzahlen der Zellen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen/ Zellpopulationen an den lebenden Zellen. Die schwarze Linie ist jeweils eine lineare Regression durch die Werte. Die Anzahl der Donoren betrug jeweils 11. Die statistische Testung auf eine mögliche Korrelation der Wertepaare erfolgte für alle Teilabbildungen mittels eines Spearman-Tests.

Es ergab sich für keine der in Abb. 20 dargestellten und untersuchten Oberflächenmarkerkombinationen auf den Zellen eine Korrelation mit der Anzahl an gebildeten CFU-F pro 250000 ausgesäten Zellen. Der Mittelwert der gebildeten CFU-F von den ausgesäten Zellen betrug jeweils 0,024 (\pm 0,015) %. Zellen, die negativ für die Oberflächenmarker CD45 und CD34, aber positiv für CD13 und CD73 waren, hatten im Mittel einen Anteil von 0,026 (\pm 0,03) % an den untersuchten lebenden Zellen. Zellen, die negativ für CD45 und CD34 waren, aber positiv für CD13 und CD146 waren, konnten mit einer mittleren Häufigkeit von 0,013 (\pm 0,017) % nachgewiesen werden. Der Mittelwert für solche Zellen, die CD45 negativ und CD13 und CD105 positiv waren, lag bei 0,048 (\pm 0,051) %.

Die mit Abstand am häufigsten vorkommenden Zellen waren diejenigen, auf denen alleine CD271 angefärbt wurde. Sie waren etwa fünf bis zehn Mal häufiger, als die anderen untersuchten Zellpopulationen. In den Zellpopulationen, die durch mehrere angefärbte Oberflächenmarker detektiert wurden, zeigten sich nicht derart deutliche Unterschiede. Die dabei am häufigsten vorkommenden Zellen sind die CD45 negativen, CD13 und CD105 positiven Zellen, die am seltensten vorkommenden Zellen diejenigen, die CD45 und CD34 negativ und CD13 und CD146 positiv sind.

3.3.2. Untersuchung einer Korrelation von verschiedenen Oberflächenmarkern zur Detektion von gleichen Zellpopulationen

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, ob bestimmte Oberflächenmarker möglicherweise gemeinsam auf Zellen vorkommen und somit die gleichen Zellpopulationen durch die Durchflusszytometrie detektiert werden. Dies würde womöglich eine bessere Identifikationsmöglichkeit für MSC liefern.

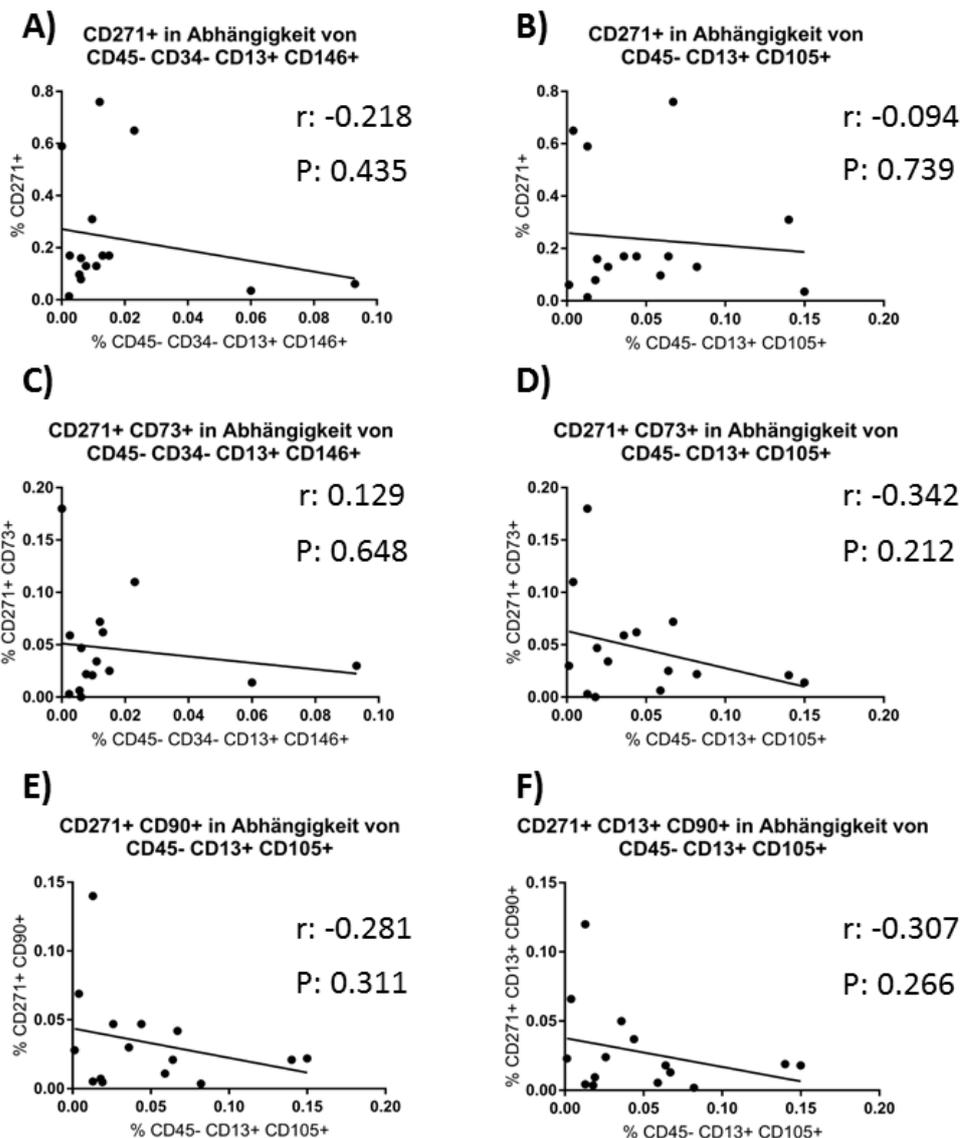


Abbildung 21: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihr Verhältnis zueinander. Aufgetragen sind hier die verschiedenen relativen Häufigkeiten von Oberflächenmarkerkombinationen gegeneinander. Zur Detektion wurden die Oberflächenmarker mittels spezifischer Antikörper angefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient ist r . Die Anzahl an untersuchten Donoren betrug jeweils 15. Die Testung auf eine mögliche Korrelation wurde für (A), (B), (D), (E) und (F) mittels eines Pearson-Tests durchgeführt, für Teil (C) mittels eines Spearman-Tests.

Es konnte für keine der untersuchten Oberflächenmarkerkombinationen eine Korrelation zu einem anderen Oberflächenmarker bzw. einer

Oberflächenmarkerkombination nachgewiesen werden (Abb. 21 A-F). Somit konnte gezeigt werden, dass in den Analysen nicht dieselben Zellpopulationen angefärbt wurden. Die Zellen, die CD271 auf ihrer Oberfläche trugen, kamen im Mittel zu 0,235 ($\pm 0,236$) % vor. Die Zellen, die negativ für CD45 und CD34 waren, aber positiv für CD13 und CD146 wurden im Mittel zu 0,018 ($\pm 0,025$) % detektiert. Zellen, die negativ für CD45, aber positiv für CD13 und CD105 waren, wurden im Mittel zu 0,049 ($\pm 0,046$) % beobachtet. CD271 und CD73 positive Zellen kamen im Mittel zu 0,046 ($\pm 0,048$) % vor. Eine Zellpopulation, die positiv für CD271 und CD90 war, zeigte im Mittel einen Anteil an der Gesamthäufigkeit von 0,033 ($\pm 0,035$) %. Diejenigen Zellen, die positiv für CD271, CD13 und CD90 waren, kamen im Mittel zu 0,028 ($\pm 0,031$) % vor.

Die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Zellen lag in diesem Teil der Studie in der gleichen Größenordnung, die auch schon in Abschnitt 3.3.1. gemessen werden konnte. So waren die häufigsten Zellen CD271 positive Zellen und bei denen mit mehreren gefärbten Antigenen die CD45 und CD34 negativen, aber CD13 und CD105 positiven Zellen.

3.3.3. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom Alter

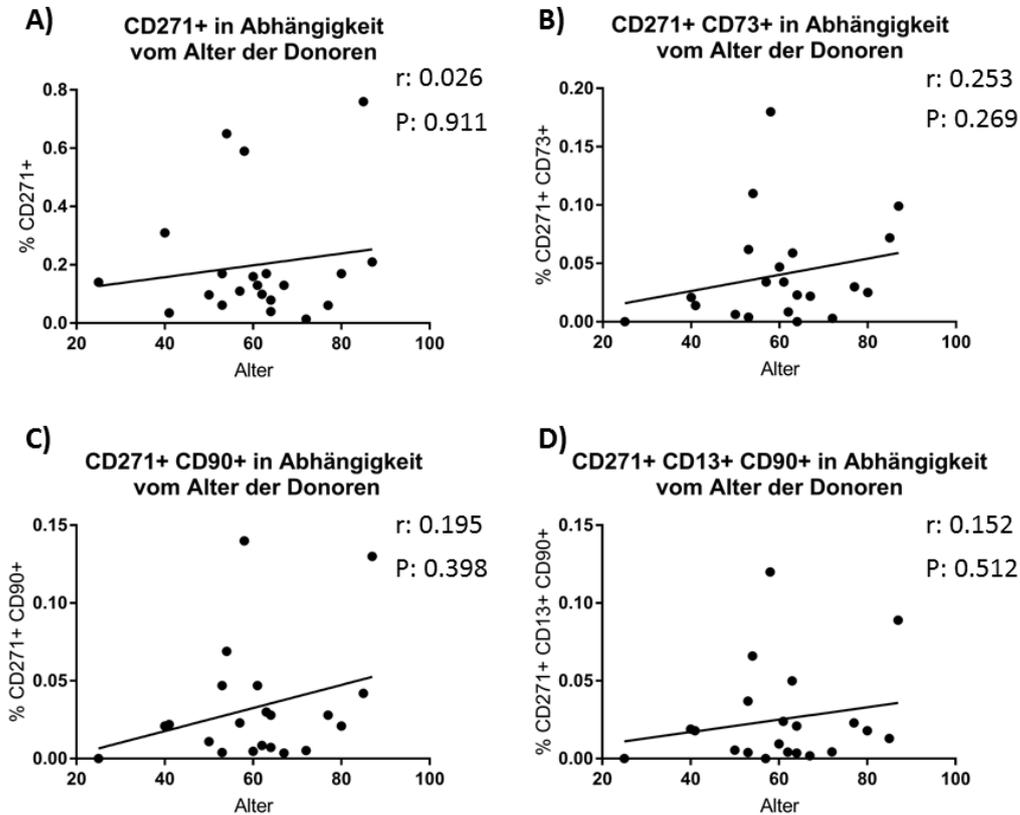


Abbildung 22: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom Alter - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen in Abhängigkeit vom Alter der Donoren. Die Prozentzahlen der Zellen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen/ Zellpopulationen an lebenden Zellen. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt (schwarze Linie). Die Anzahl an Donoren betrug jeweils 21. Das Alter ist in Jahren angegeben. Zur statistischen Testung wurde ein Spearman-Test verwendet.

Die Anzahl, an den durch die untersuchten Oberflächenmarker definierten, Zellpopulationen ändert sich nicht mit dem Alter der Donoren - es zeigte sich keine signifikante Veränderung (siehe Abb. 22). Das Alter der Donoren schwankte zwischen 25 Jahren und 87 Jahren. Der Mittelwert des Alters betrug $60,62 (\pm 15,01)$ Jahre. Der Mittelwert an Zellen, die positiv für CD271 waren, betrug $0,199 (\pm 0,208)$ %.

Mittelwert an Zellen, die positiv für CD271 und CD73 waren, belief sich auf 0,041 (\pm 0,045) %. Zellen, die positiv für CD271 und CD90 waren, kamen im Mittel zu 0,033 (\pm 0,038) % vor. Zellen, die sowohl positiv für CD271 als auch für CD13 und CD90 waren, hatten einen Mittelwert von 0,025 (\pm 0,032) %. Die Werte beziehen sich jeweils auf den Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den isolierten lebenden Zellen.

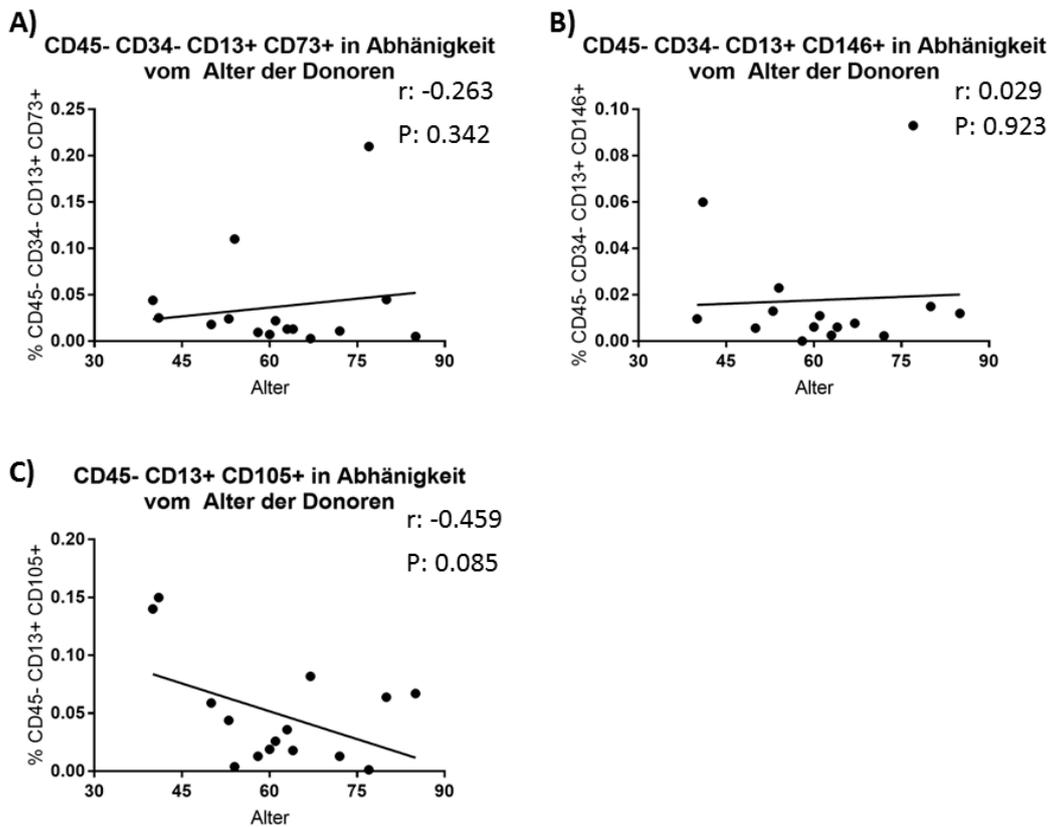


Abbildung 23: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom Alter - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen in Abhängigkeit vom Alter der Donoren. Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt (schwarze Linie). Die Anzahl an Donoren betrug jeweils 15. Das Alter ist in Jahren angegeben. Zur statistischen Testung wurde für die Teilabbildungen (A) und (B) ein Spearman-Test verwendet, für die Teilabbildung (C) ein Pearson-Test.

Auch für die in Abb. 23 dargestellten Zellpopulationen mit den untersuchten Oberflächenmarkerkombinationen zeigte sich keine Korrelation zum Alter der

Donoren. Der jüngste der Donoren war 40 Jahre alt, der Ältteste war 85 Jahre alt. Der Mittelwert des Alters betrug 61,67 (\pm 13,21) Jahre. Zellen, die negativ für CD45 und CD34 waren und die positiv für CD13 und CD73 waren, kamen im Mittel zu 0,037 (\pm 0,055) % vor. Zellen, welche nicht die Oberflächenmarker CD45 und CD34, dafür jedoch die Oberflächenmarker CD13 und CD146 aufwiesen, zeigten einen Mittelwert von 0,018 (\pm 0,025) % an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen. Eine dritte untersuchte Zellpopulation, die negativ für CD45 und positiv für CD13 und CD105 war, hatte einen Mittelwert von 0,049 (\pm 0,046) %.

Die für diesen Teil der Studie untersuchten Zellen zeigten von ihrer Häufigkeitsverteilung ähnliche Werte, wie in den bereits beschriebenen Teilen 3.3.1. und 3.3.2. Einzig die CD271 positiven Zellen, waren etwas weniger häufig vertreten, jedoch immer noch mit Abstand die häufigsten Zellen.

3.3.4. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom BMI

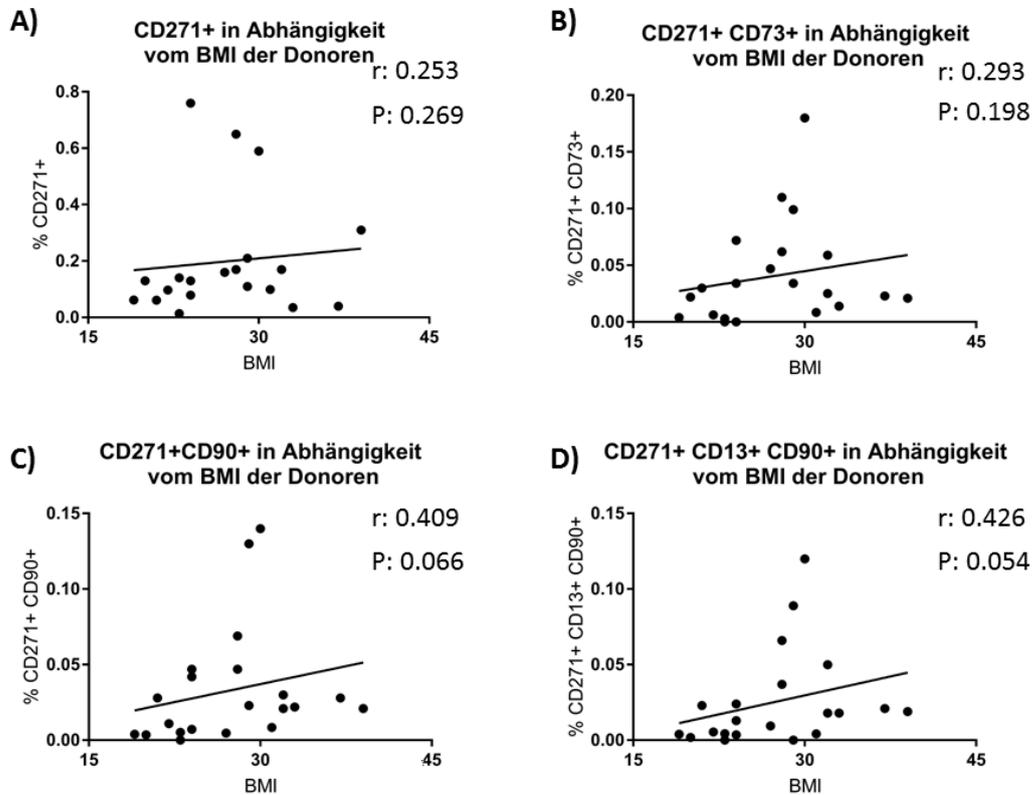


Abbildung 24: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom BMI - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen in Abhängigkeit vom BMI der Donoren. Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt (schwarze Linie). Die Anzahl berücksichtigter Donoren betrug jeweils 21. Der BMI ist in kg/m^2 angegeben. Die statistische Testung auf eine mögliche Korrelation erfolgte für alle untersuchten Markerkombinationen mittels eines Spearman-Tests.

Es zeigte sich für keinen der in Abb. 24 untersuchten Oberflächenmarker bzw. ihrer Kombination eine Korrelation zum BMI der Knochenmarksdonoren. Der niedrigste BMI betrug $19 \text{ kg}/\text{m}^2$, der höchsten BMI $39 \text{ kg}/\text{m}^2$. Der Mittelwert des BMI lag in diesem Teil der Studie bei $27,38 (\pm 5,454) \text{ kg}/\text{m}^2$, so dass auch dieses Donorenkollektiv im

Mittel leicht übergewichtig war [105]. Die Häufigkeiten der Zellen waren identisch mit denen aus Abschnitt 3.3.3..

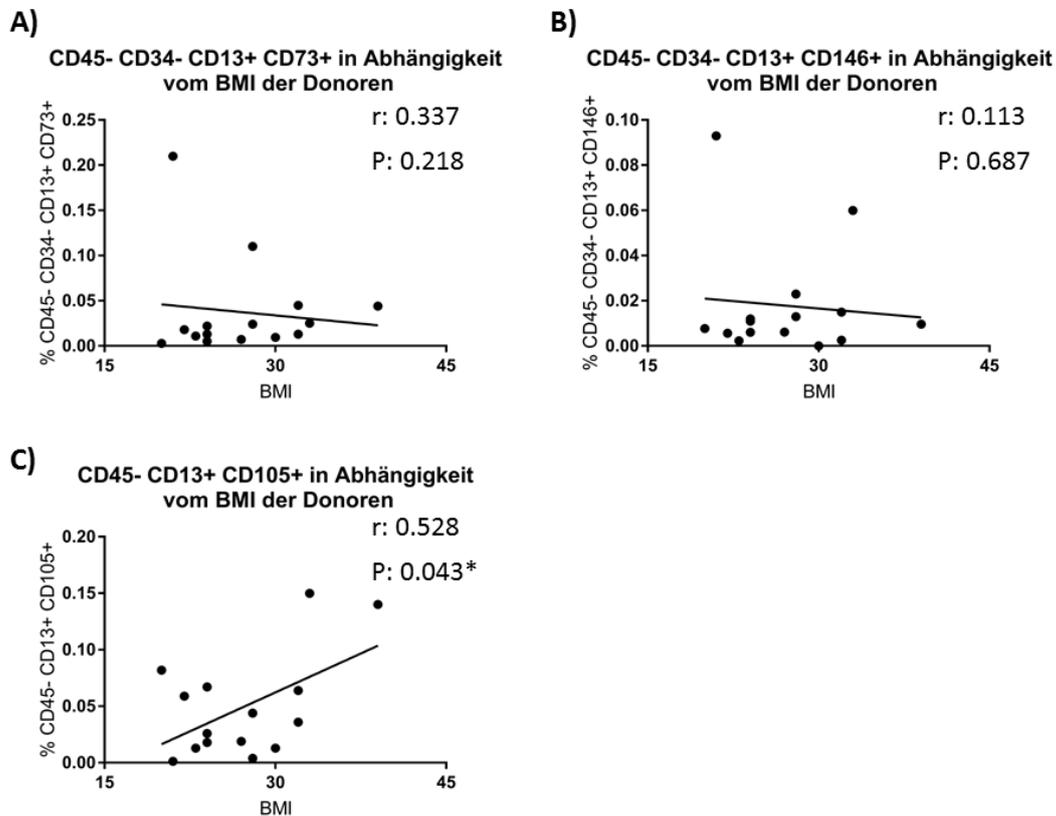


Abbildung 25: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom BMI - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen in Abhängigkeit vom BMI der Donoren. Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt (schwarze Linie). Die Anzahl berücksichtigter Donoren betrug jeweils 15. Der BMI ist in kg/ m² angegeben. Die statistische Testung auf eine mögliche Korrelation erfolgte für die Teilabbildungen (A) und (B) mittels eines Spearman-Tests, für die Teilabbildung (C) mittels eines Pearson-Tests.

Für Zellen, die auf ihrer Oberfläche kein CD45 tragen, gleichzeitig aber CD13 und CD105 auf ihrer Oberfläche exprimieren, konnte eine signifikant positive Korrelation mit dem BMI nachgewiesen werden. Im Mittel wurden sie zu 0,049 (± 0,046) % gefunden. Ein Pearson Test (r: 0,528; P-Wert (zweiseitig): 0,043) zeigte oben genannte

Korrelation (Abb. 25, Teil C). Für die restlichen untersuchten Oberflächenmarkerkombinationen konnte keine Korrelation mit dem BMI der Donoren festgestellt werden. Der niedrigste BMI im untersuchten Donorenkollektiv lag bei 20 kg/ m², der höchste bei 39 kg/ m². Der Mittelwert des BMI betrug 27,13 (± 5,303) kg/ m² und lag somit in einem präadipösen Bereich. Die Frequenzen der Zellpopulationen sind identisch zu denen in 3.3.3..

3.3.5. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom Geschlecht

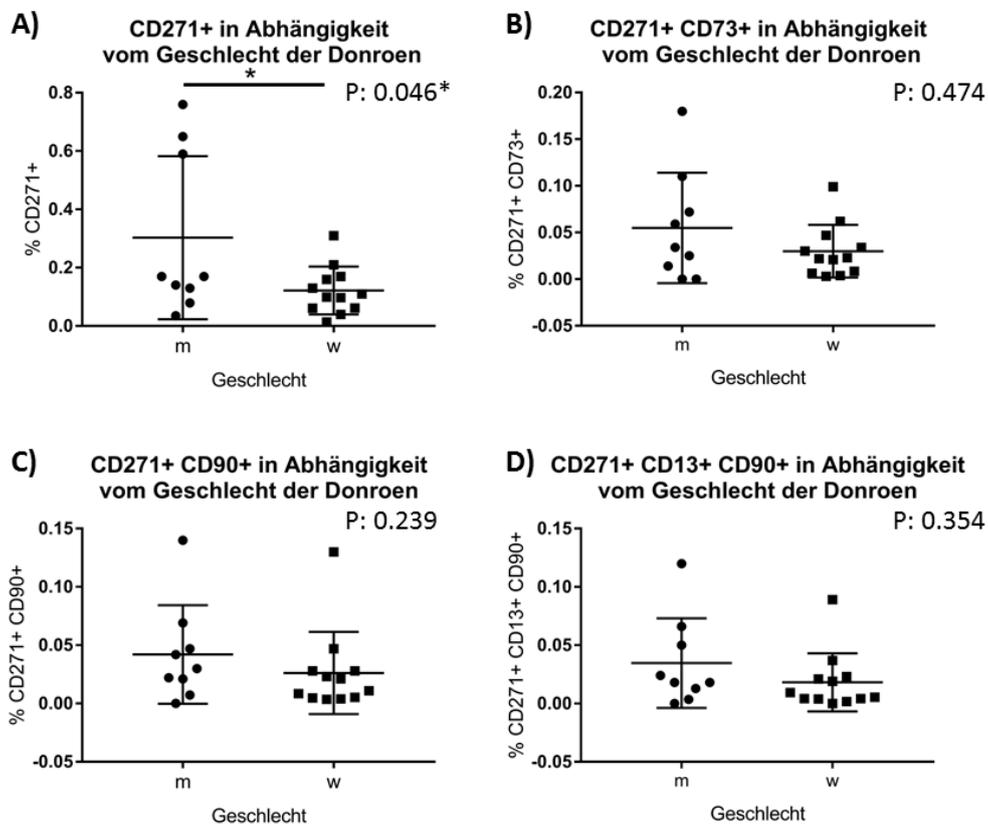


Abbildung 26: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Geschlecht - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen sowie ihre Verteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht der Donoren (m=männlich, w=weiblich). Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Es waren jeweils 9 männliche und 12 weibliche Donoren. Die statistische Auswertung erfolgte für Teilabbildung

(A) mittels eines ungepaarten T-Tests, für die restlichen Teilabbildungen mittels eines Mann-Whitney-Tests.

Es zeigte sich, dass die männlichen Donoren signifikant mehr CD271 positive Zellen haben als die weiblichen Donoren. Für andere Kombinationen von Oberflächenmarkern ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachweisen. Es zeigten sich jedoch gewisse Tendenzen in einigen Teilbereichen. Diese Tendenzen legen nahe, dass männliche Donoren eher mehr Zellen mit den untersuchten Oberflächenmarkern aufweisen als weibliche Donoren (Abb. 26). Für Zellen, auf denen allein der Oberflächenmarker CD271 angefärbt wurde, betrug der Mittelwert für die männliche Donorengruppe 0,303 (\pm 0,28) % an allen lebenden Zellen, für die weibliche Gruppe der Donoren 0,122 (\pm 0,082) %, was einem signifikant niedrigeren Wert entspricht. Mittels eines ungepaarten T-Test (P-Wert (zweiseitig): 0,046) wurde dieser signifikante Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern nachgewiesen. Der im T-Test berechnete P-Wert $<$ 0,05 zeigt, dass der Unterschied statistisch signifikant und nicht als Zufall anzunehmen ist. Für die Zellen, welche positiv für CD271 und CD73 waren, ergab sich bei den männlichen Donoren ein Mittelwert von 0,055 (\pm 0,059) %, und für die weiblichen Donoren 0,03 (\pm 0,028) %. Jene Zellen, die auf ihrer Oberfläche die Marker CD271 und CD90 exprimiert hatten, kamen bei den männlichen Donoren zu 0,042 (\pm 0,042) % vor, bei den weiblichen zu 0,026 (\pm 0,035) %. Es lässt sich hier eine Tendenz ablesen, dass weibliche Donoren auch hier weniger Zellen mit diesen Oberflächenmarkern aufweisen. Für Zellen, die positiv für CD271, CD13 und CD90 waren, ergaben sich für die Mittelwerte der Zellhäufigkeit bei den männlichen Donoren 0,035 (\pm 0,038) % und bei den weiblichen Donoren 0,018 (\pm 0,025) %.

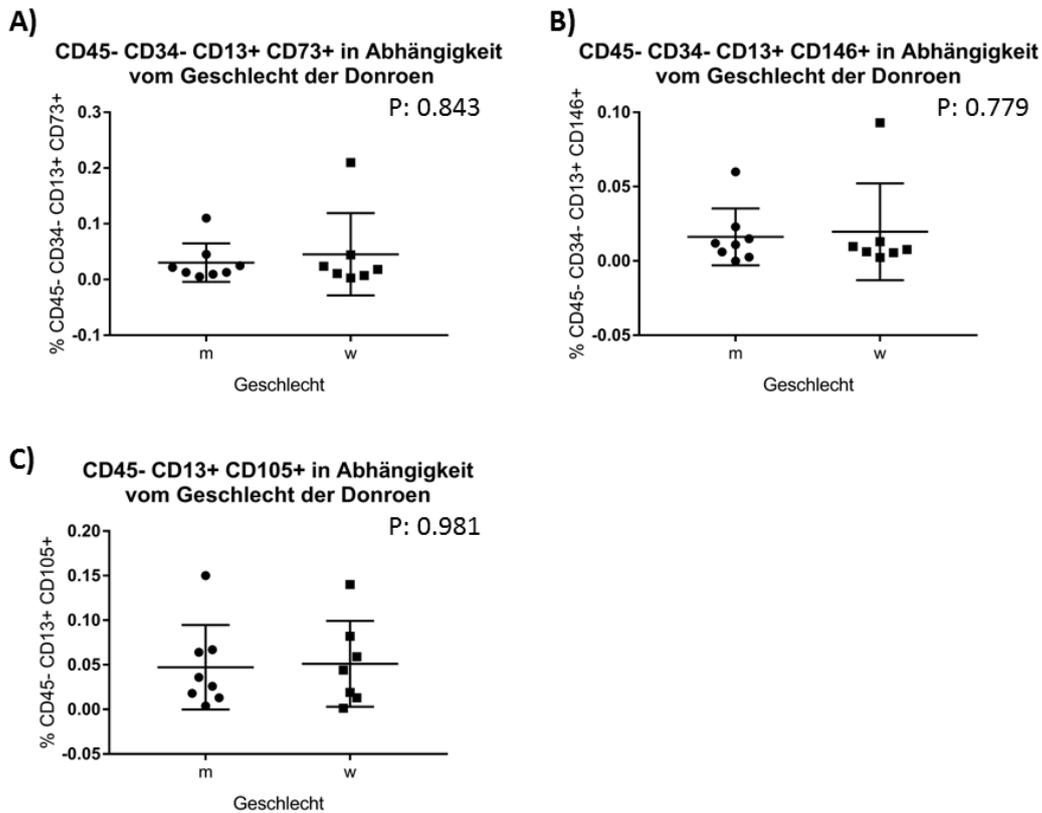


Abbildung 27: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Geschlecht - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen sowie ihre Verteilung in Abhängigkeit vom Geschlecht der Donoren (m=männlich, w=weiblich). Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Es gab jeweils 8 männliche und 7 weibliche Donoren in dieser Studie. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils mittels eines Mann-Whitney-Tests.

Für keine der in Abb. 27 untersuchten Oberflächenmarkerkombinationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern gefunden werden. Die Zellen, welche negativ für CD45 und CD34, und gleichzeitig positiv für CD13 und CD73 waren, hatten bei den männlichen Donoren eine mittlere Häufigkeit von 0,03 ($\pm 0,035$) %, bei den weiblichen Donoren von 0,045 ($\pm 0,074$) %. Für Zellen, die negativ für CD45 und CD34 und positiv für CD13 und CD146 waren, wurden Mittelwerte von 0,016 ($\pm 0,019$) % für die männlichen, und 0,02 ($\pm 0,033$) % für die weiblichen Donoren gemessen werden. Für Zellen, die den Oberflächenmarker CD45 nicht aufweisen, aber

CD13 und CD105 exprimieren, wurde für die männlichen Donoren eine Frequenz von 0,047 (\pm 0,047) % gefunden, für die weiblichen Donoren 0,051 (\pm 0,048) %.

3.3.6. Häufigkeit von Zellen mit verschiedenen Oberflächenmarkern und ihrer Kombinationen in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score

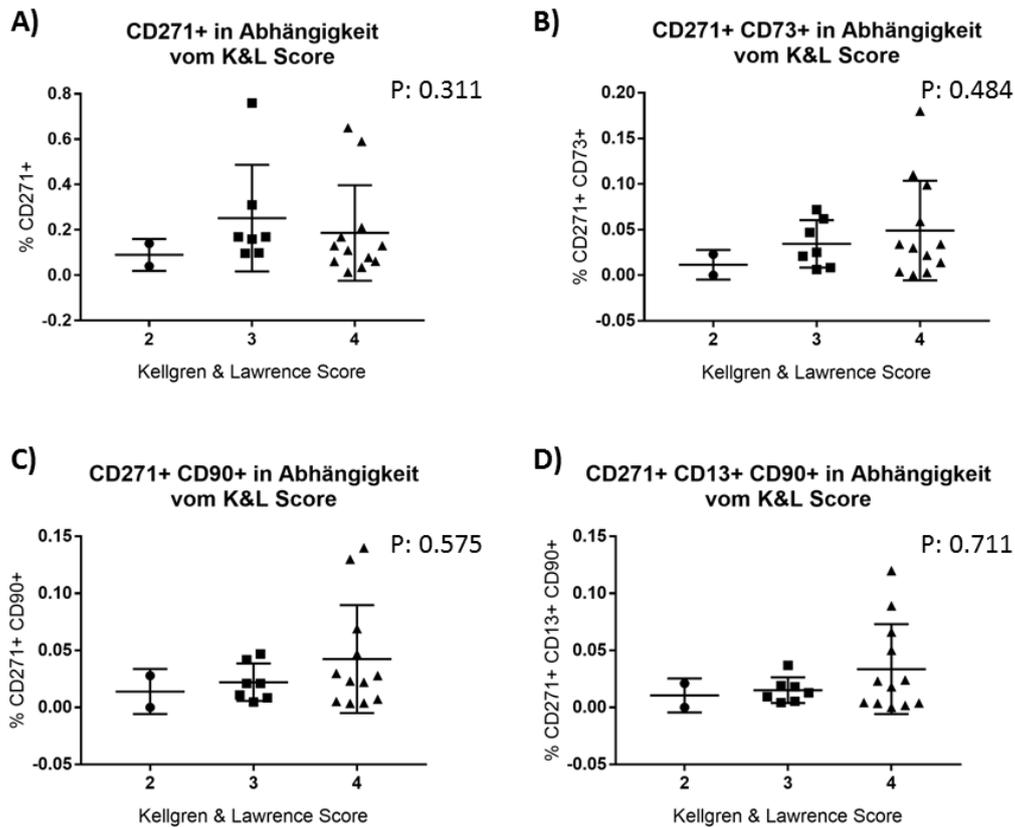


Abbildung 28: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen in Abhängigkeit vom K&L Score der Donoren. Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Die Anzahl an Donoren betrug jeweils 2 in K&L 2, 7 in K&L 3 und 12 in K&L 4. Die statistische Auswertung erfolgte in allen Teilabbildungen mittels eines Kruskal-Wallis-Tests.

Es zeigte sich kein Unterschied in der mittleren Anzahl an Zellen mit den in Abb. 28 dargestellten Oberflächenmarkern in Bezug auf den K&L Score der Donoren. Die einzelnen mittleren Häufigkeiten der jeweiligen Zelltypen sind in Tab. 10 dargestellt.

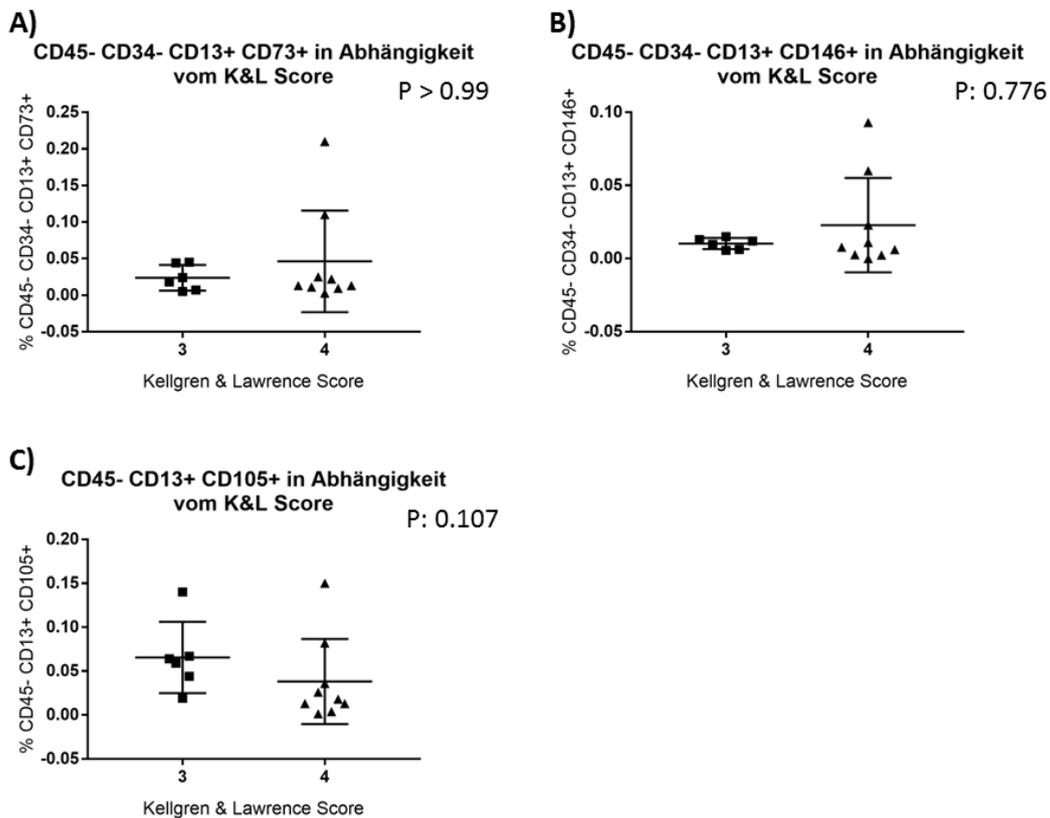


Abbildung 29: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern. Dargestellt sind verschiedene Oberflächenmarker, angefärbt mittels spezifischer Antikörper und gemessen mittels Durchflusszytometrie, und ihre Kombinationen in Abhängigkeit vom K&L Score der Donoren. Die Prozentzahlen der Zellen/ Zellpopulationen beziehen sich dabei jeweils auf den Anteil der Zellen an den lebenden Zellen. Die Anzahl an Donoren mit K&L 3 betrug 6, die an Donoren mit K&L 4 betrug 9. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils mittels eines Mann-Whitney Tests.

Es konnte für keine der in Abb. 29 dargestellten Oberflächenmarkerkombinationen ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Kellgren & Lawrence Gruppen nachgewiesen werden. Von Donoren mit dem K&L Score 2 lagen in diesem Teil der

Studie keine entsprechenden Daten vor. Die jeweiligen mittleren Häufigkeiten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Häufigkeit der verschiedenen Zellpopulationen bei verschiedenen K&L Scores der Donoren. Dargestellt sind die mittleren Häufigkeiten der jeweiligen Zellpopulationen aus den Abb. 28 und 29 in Prozent an den lebenden Zellen und der jeweiligen K&L Scores der Donoren. Werte ergänzend zu den Abb. 28 und 29.

<u>Marker(- kombination)</u>	<u>K&L 2</u>	<u>K&L 3</u>	<u>K&L 4</u>
CD271+	0,09 (± 0,071) %	0,252 (± 0,235) %	0,187 (± 0,21) %
CD271+ CD73+	0,012 (± 0,016) %	0,035 (± 0,026) %	0,049 (± 0,055) %
CD271+ CD90+	0,014 (± 0,02) %	0,022 (± 0,017) %	0,042 (± 0,047) %
CD271+ CD90+ CD13+	0,011 (± 0,015) %	0,015 (± 0,011) %	0,034 (± 0,039) %
CD45- CD34- CD13+ CD73+		0,024 (± 0,017) %	0,046 (± 0,07) %
CD45- CD34- CD13+ CD146+		0,01 (± 0,004) %	0,023 (± 0,032) %
CD45- CD13+ CD105+		0,066 (± 0,041) %	0,038 (± 0,049) %

Blickt man in der Gesamtschau auf die Häufigkeiten der jeweiligen untersuchten Zellen, so liegen die Größenordnungen dieser Zellen über fast alle Versuchsteile in relativ konstanten Zielbereichen ohne größere Schwankungen. Eine Ausnahme bilden die CD271 positiven Zellen - diese kommen in den Teilen 3.3.1. bis 3.3.5. mit einer

etwa gleichen Häufigkeit vor, die etwa um etwa 0,2 % liegt. In Teil 3.3.6. sind diese, vor allem in der Gruppe mit einem K&L von 2 um etwa eine Zehnerpotenz niedriger, bei circa 0,09 %. In den Gruppen mit einem K&L von 3 bzw. 4 waren die Zellen wieder bei etwa 0,2 %.

Wie bereits in den einzelnen Teilen angemerkt sieht man mitunter eine sehr große Variabilität zwischen den Donoren.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen, dass es eine sehr große Heterogenität zwischen verschiedenen MSC-Populationen gibt. Einflussfaktoren sind z.B. das Geschlecht und der BMI. Es konnte gezeigt werden, dass männliche Donoren mehr CFU-F als weibliche Donoren bilden und im Knochenmark des Acetabulums mehr potentielle MSC aufweisen, die CD271+ sind. Die Anzahl CD45- CD13+ CD105+ Zellen steigt signifikant mit dem BMI der Donoren an. Es konnte jedoch – mit den hier untersuchten Markern – keine Oberflächenmarkerkombination nachgewiesen werden, die MSC eindeutig beschreibt. Die gewonnenen Erkenntnisse geben jedoch wichtige Einblicke und mögliche Ansätze für weitere Forschungen im Hinblick auf das große und komplexe Feld der MSC.

4.1. Generelle Aspekte des Studiendesigns

Durch die Auswahl der Donoren weist diese Studie einige Besonderheiten auf. Das Donorenkollektiv war sehr eng gesteckt - alle mussten sich einer Hüft-TEP auf Grund einer Arthrose unterziehen (primäre und sekundäre Ursachen). Dieses Krankheitsbild weist jedoch interindividuell große Unterschiede auf, da klinische und radiologische Befunde nicht miteinander korrelieren [26]. Das führte im Endeffekt dazu, dass die Donoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung operiert wurden und überdies unterschiedlichste Ko-Morbiditäten aufwiesen (Daten nicht einbezogen). Dieser Umstand wurde im verwendeten K&L Scoring zu berücksichtigen versucht. Dennoch kann dieses Hilfsmittel nur den Versuch eines Angleiches schaffen. Da eine Hüft-TEP letztendlich ein elektiver Eingriff ist, war der Zeitpunkt, an dem sich die Donoren auf Grund des Leidensdruckes für eine Operation entschieden, unterschiedlich. Dies erklärt die geringe Anzahl an Donoren mit einem K&L Score von 2, da im Regelfall erst alle konservativen Therapieoptionen ausgeschöpft werden. Da eine Arthrose vorwiegend eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist [2], war das Donorenkollektiv mit einem mittleren Alter von über 60 Jahren in jedem Versuchsteil eher alt (durch die unterschiedliche Anzahl an Donoren in jedem Versuchsteil

schwankte das mittlere Alter in jedem Teil etwas). Um unnötige Eingriffe ohne medizinische Indikation zu vermeiden, wurde auf ein Abfallprodukt der Operation zurückgegriffen. Dies hatte jedoch zur Folge, dass sich neben dem Knochenmark auch noch Reste vom Gelenkknorpel (soweit er durch die Arthrose noch vorhanden war), dem Ligamentum Capitis Femoris bzw. Transversum Acetabuli, der Arteria Capitis Femoris und des Pulvinars in der Probe befinden konnten. Aus diesem Grund kann man nicht von „reinen“ Knochenmarks-MSC ausgehen. Allerdings sollten die Störfaktoren durch die anderen Gelenkkomponenten sehr gering sein. Diese Art der Materialgewinnung kann allerdings auch von Vorteil sein, es mussten keine chemischen Verfahren wie eine enzymatische Zellverdauung genutzt werden, um Zellen aus dem Knochen herauszulösen, oder eine reine Knochenmarksaspiration, welche unter Umständen (u.U.) nicht alle Zellen auffängt oder nicht die Zellen erreicht, die sich in direkter Umgebung der subchondralen arthrotischen Vorgänge befinden. Weiterhin scheint es möglich, dass in Knochenmarksaspiraten auch Verunreinigungen durch das periphere Blut eine größere Rolle spielen. Weiterhin werden die Aspirate in der Regel mit Heparin versetzt, so dass hier auch ein Einfluss des Heparins möglich scheint [38, 55, 108]. Ein Nachteil der verwendeten Methode besteht jedoch darin, dass durch die Extraktion der Zellen mittels Ficoll laut Literatur etwa 15-30% der MNC verloren gehen und damit auch MSC [42]. Zudem zeigen direkt ausplattierte Zellen andere Eigenschaften als mit Ficoll aufgereinigte, was darauf schließen lässt, dass diese Zellen etwas naiver sind [41]. Ebenso unterscheiden sich die Ergebnisse je nach Gewinnungsort der MSC. So wurde gezeigt, dass nach einer Aspiration der MSC aus dem Knochenmark weniger CFU-F gebildet wurden als nach enzymatischem Verdau des Knochens [109]. Weiterhin fehlt ein Vergleich mit Probenmaterial von gesunden Donoren. Ein Vergleich mit gesunden Individuen wäre zwar möglich, allerdings nicht mit dem gleichen Probenmaterial, da man es nicht bei Gesunden entnehmen kann. Ein Vergleich mit auf dieselbe Art gewonnenen Zellen von gesunden Donoren würde in den meisten Punkten wahrscheinlich weitere Erkenntnisse über die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks bringen, da eine Differenzierung zwischen

gesund und krank möglich wäre. Dies alles gilt es bei der Einordnung und Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

4.2. Geschlechtsabhängigkeit von CFU-F und Oberflächenmarkern

4.2.1. Die CFU-F Kapazität ist geschlechtsabhängig

Eine der grundlegenden Eigenschaften von MSC ist ihre Fähigkeit an Plastik zu adhären. Diese Plastikadhärenz macht man sich in einem Routineverfahren zur Selektion von MSC aus MNC zu Nutze. Bei der Bildung von CFU-F bzw. der Effizienz der CFU-F Bildung werden MNC ausgesät und nach etwa zwei Wochen die gebildeten Kolonien gezählt, wodurch Rückschlüsse auf die Abundanz von MSC im Reaming der Donoren gezogen werden können [30, 35, 47]. In dieser Studie wurde diese Methode benutzt, um zu untersuchen, ob sich die Zahl der gebildeten CFU-F in Korrelation zu einigen körperbezogenen Eigenschaften der Donoren bringen lässt. Weiterhin wurde untersucht, ob gezeigt werden kann, dass bestimmte MSC-Populationen im Knochenmark, die mittels bestimmten Oberflächenmarkern selektiert wurden, ebenfalls einen Bezug zu den körperbezogenen Faktoren der Donoren haben.

Es konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz an gebildeten CFU-F, bei 250000 ausgesäten MNC aus frischen Knochenmarkspräparaten, bei weiblichen Donoren signifikant niedriger ist als bei den männlichen Donoren ($0,026 (\pm 0,018) \%$ vs. $0,017 (\pm 0,007) \%$). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied konnte bereits durch eine vorherige Studie gezeigt werden. Dort wurde allerdings das Knochenmark aus dem Beckenkamm von gesunden Donoren verwendet [110]. In derselben Studie konnten weiterhin signifikante Unterschiede zwischen der Schwere einer Verletzung und der CFU-F Anzahl beschrieben werden [110]. So wäre es ein interessanter Ansatz, die CFU-F von gesunden Donoren mit der Anzahl an CFU-F von Patienten mit Coxarthrose zu vergleichen, um herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen Donoren mit Trauma oder mit degenerativen Erkrankungen gibt. Dem entgegen steht eine Studie von Chaput et al. aus dem Jahr 2018, die zeigte, dass die CFU-F Frequenz bei den männlichen Studienteilnehmern signifikant geringer war [111]. Dort wurde jedoch mit

einer anderen Isolations- und Kultivierungsmethoden für MNC gearbeitet (z.B. wurde das Medium während der Kultur nicht erneuert/ gewechselt).

Im Tiermodell mit Ratten (1 Jahr alt, Sprague-Dawley) konnten im Jahr 2009 Strube et al. herausstellen, dass aus dem Knochenmark von weiblichen Ratten weniger CFU-F nach Kultivierung gebildet werden als bei männlichen [112]. Aber auch hier lassen sich die Ergebnisse nur bedingt vergleichen, da es zum einen ein Tiermodell ist und zum anderen auch der Entnahmeort (Femur und Tibia) differiert. Weiterhin ist die Methode an sich grundsätzlich eine andere. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeitsgruppe, dass die anfängliche Frakturheilung bei weiblichen Mäusen schlechter war [112], könnte in Zusammenhang mit den geringeren CFU-F stehen. Geht man davon aus, dass MSC (nachgewiesen durch die CFU-F) für die Frakturheilung nötig sind, scheint es logisch, dass bei weniger MSC die Frakturheilung bei den weiblichen Mäusen schlechter war. Ob sich diese These durch die hier erzielten Ergebnisse auf den Menschen übertragen lässt, bedarf weiterer Forschung.

Im Optimalfall könnten vergleichende Studien durchgeführt werden, die im selben Labor z.B. verschiedene Isolations- und Kultivierungsmethoden direkt gegenüberstellen und vergleichen. So konnten bereits 2012 Lohmann et al. zeigen, dass die CFU-F Bildung auch vom verwendeten Zusatzstoff des Mediums während der Kultur abhängt. Das u.a. in dieser Studie verwendete humane Plättchenlysate (engl. human platelet lysate (HPL)) verbesserte das Wachstum der CFU-F deutlich im Vergleich zu FCS als Mediumzusatz. Allerdings befanden sich die MSC in besagter Studie in Passage > 4 [113], so dass man davon ausgehen kann, dass sowohl das Alter der Zellen als auch die Kultivierungsbedingungen allgemein einen sehr großen Einfluss auf die Resultate haben. Um die Ergebnisse international vergleichbar machen zu können ist es nötig, die Isolation und Kultur zu standardisieren und dadurch einheitliche Ergebnisse erzielen zu können. Zusammengenommen lässt sich in Bezug auf den herausgefundenen, geschlechterspezifischen Unterschied in der CFU-F Bildung sagen, dass es im Vergleich mit anderen Studien sowohl übereinstimmende als auch konträre Ergebnisse gibt. Deshalb sind weitere Forschungen nötig, um die Ergebnisse

letztendlich genau einordnen zu können - diese könnten wie oben beschrieben durchgeführt werden. Alles in allem zeigt dies in aller Deutlichkeit, wie wichtig es ist, einheitliche Kriterien zu definieren, nach denen MSC aus MNC gewonnen und letztendlich dadurch die Ergebnisse beurteilt und verglichen werden können. Gerade in Hinblick auf das große Potential, welches die Zellen in der klinischen Forschung und Therapie haben könnten. Ein weiterer möglicher Faktor, der zu den gegensätzlichen Ergebnissen geführt haben könnte ist gegebenenfalls der Ort der Entnahme der MNC bzw. der Krankheitseffekt durch die Arthrose in dem hier verwendeten Donorenkollektiv.

4.2.2. CD271 kommt geschlechtsabhängig auf MNC vor

Männliche Donoren haben signifikant mehr Zellen mit CD271 als die weiblichen Donoren. Für alle anderen untersuchten Kombinationen ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse. Es zeigten sich auch in den weiteren – CD271 enthaltenden Zellpopulationen – keine Unterschiede mehr. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die Population, die nur mittels CD271 selektiert wurde, so heterogen ist, dass dort auch Zellen selektiert wurden, die einen Geschlechterunterschied aufweisen, aber mittels der anderen Marker nicht erfasst wurden.

4.3. Untersuchungen zu CFU-F Bildung und der Frequenz von Zellpopulationen in Bezug zu Alter, BMI und Kellgren & Lawrence Score

4.3.1. Untersuchungen zum Alter

4.3.1.1. *Die CFU-F Bildung ist unabhängig vom Alter*

Das Alter gilt heutzutage als der größte Risikofaktor für chronische Erkrankungen. Mechanismen die zur Gewebe-/Zellalterung führen sind u.a. mitochondriale Dysfunktion, veränderte Zellkommunikation und (epi)genetische Veränderungen. Auslöser der Zellalterung können verschiedene Faktoren sein - z.B. extrazelluläre DAMPs oder intrazelluläre DNA-Schäden, die im Laufe der Replikationen der Zellen

aufzutreten. Die Zellalterung führt u.a. zu einem geringeren Proliferationspotential und verringerter Proteinproduktion. Die alternden Zellen setzen jedoch proinflammatorische Mediatoren frei, die ebenfalls umliegendes Gewebe altern lassen können oder zu einer systemischen Entzündungsreaktion führen können [114]. Auf Grund dieser weitreichenden Effekte war ein Einfluss des Alters auf die CFU-F Bildung im Setting dieser Studie vermutet worden. Viele Studien für den Einfluss des Alters auf die CFU-F Bildung sind bekannt, mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen - zusammengefasst u.a. in einem Review von Bellantuono [35]. So beschreibt Caplan in seinem Paper 2009, dass sich die Anzahl an MSC im Knochenmark (dargestellt durch die CFU-F) mit steigendem Lebensalter verringert [115]. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass Caplan seine Daten nur in Dekaden des Lebensalters eingruppiert hat und so möglicherweise Effekte verdeckt oder vorgetäuscht wurden. Weiterhin ist das hier untersuchte Donorenkollektiv eher älter und zudem auch krank. Darüber macht Caplan in seiner Arbeit keine Angaben, so dass ein direkter Vergleich beider Studien schwierig ist. In einer Arbeit aus dem Jahr 2015 wurde herausgefunden, dass es bei im Alter angeglichenen, gesunden, männlichen Donoren signifikante Unterschiede in der CFU-F Bildung gab, so dass im Allgemeinen von einer großen, interindividuellen Varianz auszugehen ist. Die Prozentwerte der gebildeten CFU-F lagen dort, ähnlich wie in dieser Arbeit, bei 0,01 % oder darunter [116]. Auch hier wurde ein gesundes Kollektiv betrachtet. In einer weiteren Arbeit aus dem Jahr 2011 konnte ebenfalls kein Zusammenhang von Alter und CFU-F Bildung gefunden werden [117]. Alles in allem kann man davon ausgehen, dass das Alter keinen Effekt auf die CFU-F Bildung hat, unabhängig davon, ob der Donor gesund war oder wie die hier untersuchten Donoren eine Coxarthrose hatten. Gleichfalls konnte gezeigt werden, dass die bisher untersuchten, verschiedenen Arten von Zellkulturmedien keinen Einfluss auf das Wachstum von CFU-F hatten. So hatte HPL von verschiedenen alten Donoren keinen Einfluss auf die Frequenz der CFU-F Bildung. Ebenso konnte kein Alterseffekt mit Standardmedium gezeigt werden. Das HPL spiegelt die Alterungsvorgänge im Körper zumindest in Teilen wider [113]. Ob das Alter im Gegensatz zur Frequenz jedoch einen

Effekt auf die Funktionalität der Zellen hat, bleibt der Gegenstand weiterer Forschungen.

4.3.1.2. Die untersuchten Zellpopulationen kommen unabhängig vom Alter der Donoren vor

Es konnte nicht beobachtet werden, dass im Alter eine Zellpopulation signifikant zu- oder abnimmt. In einer Studie aus dem Jahr 2018 wurde gezeigt, dass CD45- CD271+ Zellen mit dem Alter eher abnehmen [87]. Jones et al. konnten 2010 für diese Zellen hingegen keinen Alterseffekt nachweisen [109]. In der vorliegenden Studie ist ein leichter Anstieg des Vorkommens von CD271+ Zellen mit dem Alter zu beobachten (nicht signifikant), so dass es möglich erscheint, dass die Arthrose entweder mögliche Effekte verschleiert oder hervorruft. Da die anderen Studien erneut andere Bedingungen (Knochenmarksaspirate aus dem Beckenkamm, Hüftkopf-Spongiosa) aufwiesen, sind diese Ergebnisse erneut schwer in den Kontext zu setzen. Es zeigt sich wieder, wie wichtig einheitliche Protokolle sind [87, 109].

In der vorliegenden Arbeit steigen sowohl die CD271+ Zellen als auch die CD271+ CD73+ Zellen ganz leicht mit dem Alter an. Die Expression von CD73 bleibt über die Kultur von MSC stabil [109]. Auf Grundlage dessen kann man vermuten, dass der hier gefundene Effekt auf die Expression von CD271 zurückzuführen ist. Weiterhin zeigten in der vorliegenden Arbeit CD45- CD13+ CD105+ Zellen eine relativ starke Tendenz mit dem Alter abzunehmen. Ein Experiment, in dem CD105 alleine betrachtet wurde, zeigte, dass CD105 während der Kultur nicht abnimmt und stabil exprimiert wird [109]. Hier gilt es jedoch zu beachten, dass die in vitro Kultivierung und die Alterungsprozesse von Zellen in vivo nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Jedoch kann man in diesem Fall zusammengenommen davon ausgehen, dass CD105 ein relativ häufiger Marker ist und sich Unterschiede in seiner Expression erst in Kombination mit anderen Markern zeigen und er außerdem einem gewissen Alterseffekt unterliegt, sobald er nicht alleine betrachtet wird. Geht man durch die vorhergehenden Ergebnisse (siehe oben (s.o.)) davon aus, dass diese Population eine relativ undifferenzierte ist, erscheint

es möglich, dass sie mit zunehmendem Alter etwas weniger wird. Dies könnte z.B. auf Grund der zunehmenden Verfettung des Knochenmarkes geschehen [118].

4.3.2. Untersuchungen zum BMI

4.3.2.1. Die CFU-F Bildung ist unabhängig vom BMI

Da das Knochenmark bzw. die in ihm enthaltenen Knochenmarkszellen auf proinflammatorische Mediatoren reagieren kann [77] und es beim Übergewicht eine generelle Entzündungskomponente gibt [6], schien es vorstellbar, dass sich deshalb ein Zusammenhang des BMIs auf die CFU-F Bildung zeigt. Jedoch konnte in dieser Studie keine Korrelation des BMI mit der Effizienz der CFU-F Bildung nachgewiesen werden. Das für den BMI gefundene Spearman-r von -0,1339 zeigt allenfalls eine ganz leichte Tendenz für ein Abnehmen der CFU-F Bildung und somit der MSC mit steigendem BMI. Entweder hat die Entzündung durch den erhöhten BMI keinen Einfluss auf die MSC oder die Entzündung durch die Arthrose überdeckt einen möglichen Effekt. Beide Effekte wurden in der vorliegenden Studie jedoch nicht eingehender untersucht. Hier bedarf es weiterer Forschung, z.B. mittels der Analyse von bestimmten Entzündungsmediatoren und ihrem Effekt auf die MSC. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die MSC von keiner der beiden Entzündungen beeinflusst werden. Um dies genauer herauszufinden, wäre ein Vergleich mit Daten aus gesunden und normalgewichtigen Hüften/ Donoren nötig. Dies ist auf Grund ethischer Probleme jedoch unwahrscheinlich. Insgesamt ist es noch nicht genau bekannt, in wie weit sich Entzündungseffekte bei steigendem BMI im Einzelnen auf den Körper auswirken bzw. ob es nicht auch dort starke interindividuelle Unterschiede gibt. Die Adipokine, die u.a. von den Adipozyten sezerniert werden, sorgen – im Verbund mit anderen Entzündungsmediatoren – für die Synovialitis bei Arthrose. Jedoch werden diese Adipokine z.T. auch von Osteoblasten sezerniert [6]. Ein möglicher Zusammenhang wäre dahingehend denkbar gewesen, dass mit steigendem oder sinkendem BMI ein Effekt auf die MSC zu beobachten gewesen wäre, da sich die Konzentrationen der Entzündungsmediatoren verändert. In einer Studie mit Mäusen konnten jedoch ebenfalls keine Unterschiede zwischen normalgewichtigen und übergewichtigen

Mäusen bei der CFU-F Bildung gefunden werden [119], so dass alles in allem davon ausgegangen werden kann, dass der BMI keinen Einfluss auf die Anzahl an MSC hat.

4.3.2.2. CD45- CD13+ CD105 Zellen steigen signifikant in Abhängigkeit vom BMI, die übrigen Zellpopulationen zeigen keine signifikanten Abhängigkeiten vom BMI

Mäuse, die defizient für CD90 sind, zeigen ein höheres Körpergewicht als Wildtyp-Mäuse [119]. Um herauszufinden, ob umgekehrt auch der BMI einen Einfluss auf die Oberflächenmarker bzw. CD90 hat, wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Frequenz gewisser Zellpopulationen und dem BMI der Donoren gibt. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ebenfalls die Möglichkeit besteht, dass sich nicht die Frequenz der Zellpopulationen ändert, sondern die Markerexpression an sich auf den Zellen. Dieses könnte in weiteren Versuchsreihen erforscht werden, die sich mit der Quantifizierung der Marker auf den Zellen beschäftigen. Es konnte durch Ulum et al. gezeigt werden, dass die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 während der in vitro Kultur von MSC aus dem Knochenmark von Donoren mit hohem BMI signifikant seltener vorkommen (allerdings befanden sich die untersuchten Zellen in Passage 3) [120]. Ob sich diese Ergebnisse auch auf frische, ex vivo Zellpopulationen übertragen lassen, sollte hier untersucht werden.

Es konnte ein signifikanter Anstieg der CD45- CD13+ CD105 Zellen festgestellt werden. Je höher der BMI der Donoren war, desto häufiger kam diese Zellpopulation vor. Dies ist eine mögliche Erklärung für die gefundenen Unterschiede in der Frequenz dieser Population im Vergleich zu den Ergebnissen von Muniz et al. Durch diese Arbeitsgruppe wurde die Frequenz dieser Zellen etwa mit 0,028% angegeben, in der vorliegenden Studie kamen sie zu etwa 0,049 (\pm 0,046) % vor. Möglicherweise werden durch den erhöhten BMI der Donoren Faktoren ausgeschüttet, die diese Zellpopulation vermehrt bilden lässt. Eine weitere mögliche Erklärung zielt auf die mechanische Belastung - so ist es vorstellbar, dass durch das erhöhte Körpergewicht eine größere Kraft auf das Gelenk und das darunterliegende Knochenmark einwirkt und dies zu einer vermehrten Bildung dieser Zellpopulation führt [4, 84, 108].

Alle untersuchten Zellpopulationen, die mittels CD271+ selektiert wurden, zeigten eine leichte Tendenz mit steigendem BMI zuzunehmen. Die Populationen, die negativ für CD34 und CD45 waren, zeigten eher abnehmende Tendenzen. Hier sind weitere Forschungen nötig, um den Einfluss von CD271 zu untersuchen. So wäre es denkbar, die Zellpopulationen CD34- und CD45- um CD271 zu erweitern, bzw. die mittels CD271+ selektierten Populationen um CD34- und CD45- zu erweitern. Da es, soweit bekannt, keine vergleichbaren Studien mit ex vivo Knochenmark zu besagten Markern gibt und sie nur teilweise mit bisher bekannten Ergebnissen (s.o.) in Einklang zu bringen sind, sind weitere Untersuchungen von Nöten. Zusammengeführt mit den Ergebnissen von Ulum et al., dass CD73, CD90 und CD105 mit steigendem BMI vermehrt exprimiert werden [120], könnte vermutet werden, dass CD271 ebenfalls mit steigendem BMI hochreguliert wird. Dies würde erklären, warum sich o.g. Tendenzen der CD271+ Zellen finden lassen.

Für die anderen untersuchten Zellpopulationen zeigten sich keine klar erkennbaren Tendenzen. Ob dies an der Kombination der Oberflächenmarker liegt oder an anderen Einflüssen, sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein. So könnte man die Marker noch anders kombinieren, um weitere Erkenntnisse zu gewinnen.

4.3.3. Untersuchungen zum Kellgren & Lawrence Score

4.3.3.1. Die CFU-F Bildung ist unabhängig vom Kellgren & Lawrence Score

Der K&L Score ist ein Score, mit Hilfe dessen versucht wird die sehr variable klinische Ausprägung der Arthrose radiologisch einheitlich(er) zu klassifizieren und somit den Effekt auf den Knochen bzw. die umgebenden Strukturen vergleichbarer zu machen [4]. Da radiologisch die Veränderungen am Gelenk, wie z.B. die subchondrale Sklerosierung beurteilt werden, wurde ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Schweregraden der Arthrose (nach K&L klassifiziert) und der CFU-F Bildung vermutet, die im Endeffekt den Einfluss der Arthrose auf die im Knochenmark enthaltene Stammzellpopulation darstellt. Möglich schien es, dass sowohl eine Steigerung der CFU-F Bildung (durch erhöhten Knochenumsatz und Umbauvorgänge)

als auch eine Senkung (durch Effekte der Entzündung, wie z.B. die Zellalterung hervorgerufen durch Entzündungsmediatoren [114]) vorkommen. Bei der Arthrose finden im Knochen viele Umbauvorgänge statt, die letztendlich zu den radiologischen Veränderungen führen: subchondrale Sklerosierung, Knochenzysten, Osteophyten. Während dieses Remodelings des Knochens und auch bereits in frühen Phasen der Entzündung wandern mononukleäre Zellen in das betroffene Gelenk ein. Weiterhin werden durch bestimmte Chemokine mesenchymale Vorläufer in ein arthrotisches Gelenk rekrutiert [6]. Es sollte versucht werden, diese Effekte auf das Knochenmark fassbar zu machen. Krüger et al. konnten 2018 für das Knie zeigen, dass auch dort bei einem K&L Score von 3 die mesenchymalen Vorläuferzellen in der Lage waren, osteogen zu differenzieren. Sie wurden aus Knochenfragmenten der jeweiligen Kniegelenke isoliert [121]. Ein direkter Vergleich mit der CFU-F Bildung aus gesunden Hüften wäre interessant (vorausgesetzt Entnahmeort und weitere Verfahren sind identisch). Jones et al. führten dazu 2010 eine Studie durch. Sie vergleichen die CFU-F Bildung von gesunden Donoren mit der Bildung von CFU-F bei Arthrose. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der CFU-F Bildung bei Proben aus arthrotischen Gelenken und von gesunden Donoren (die Proben wurden – im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit – aus dem Beckenkamm entnommen oder kommerziell erworben) [109]. Eine weitere Arbeitsgruppe kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die CFU-F Bildung aus Knochenmarkszellen (gewonnen bei Hüft-Operationen, wo genau wird nicht genannt) nicht durch Arthrose beeinträchtigt wird [122]. Durch eine direkte Vergleichsstudie von Proben aus gesundem Knochenmark und von Proben aus arthrotischem subchondralen Knochenmark könnte man den genauen Effekt der Arthrose herausfinden – mit der Fragestellung, ob die Arthrose die Fähigkeit zur Bildung der CFU-F im Vergleich zu gesunden Donoren senkt oder ob es auch hier eine große interindividuelle Streuung gibt. Ethisch ist eine solche Studie mit gesunden Probanden allerdings schwer vorstellbar - Reaming fällt nicht bei gesunden Patienten an. Eine denkbare Möglichkeit bei jungen, gesunden Patienten Reaming zu gewinnen, wäre im Rahmen einer Schenkelhalsfraktur, welche endoprothetisch versorgt werden muss. Diese ist jedoch eine Fraktur des älteren Menschen und deshalb meistens auch mit

einer begleitenden Arthrose verknüpft. Weiterhin wird bei jungen Patienten mit Schenkelhalsfraktur versucht gelenkerhaltend zu operieren. Weiterhin richtet sich die Versorgung mit Frakturendoprothesen stark nach den patientenabhängigen Faktoren. So wird eine TEP eher bei jüngeren Patienten mit Arthrose eingesetzt, eine sog. Duokopfprothese eher bei älteren. Bei dieser Operation fällt aber kein Reaming an [123, 124].

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der CFU-F Bildung, dass nur das Geschlecht einen Einfluss auf die Anzahl an gebildeten CFU-F, respektive an MSC im Knochenmark hat. Die weiteren möglichen und untersuchten Einflussfaktoren – Alter, BMI und K&L Score – hatten keinen Einfluss auf die CFU-F Bildung. Durch die verschiedenen Methoden MNC zu isolieren verbunden mit unterschiedlichen Kulturbedingungen ist ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren oftmals nicht aussagekräftig, liefert allerdings den Ansatzpunkt für weitere Studien.

4.3.3.2. Die untersuchten Zellpopulationen sind unabhängig vom Kellgren & Lawrence Score der Donoren

Für den K&L Score zeigten sich für keine der Markerkombinationen Unterschiede. Jones et al. zeigten in ihrer Studie 2010, dass sich die Frequenzen von CD45- CD271+ Zellen aus arthrotischen Femurköpfen und denen aus gesunden Gelenken nicht unterscheiden [109]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Score zwar klinisch eine Bedeutung hat, auf Zellpopulationsebene lassen sich aber offenbar keine Unterschiede in der Frequenz von o.g. Zellen feststellen, so dass keine Unterschiede in der Frequenz erwartet werden können. Dies ist in Einklang mit den anderen gefundenen Ergebnissen dieser Arbeit, die für den K&L Score keine Unterschiede in Bezug zur CFU-F Bildung, der Differenzierung und den untersuchten Zellpopulationen zeigten.

4.4. Die Anzahl an CFU-F korreliert mit keiner untersuchten Zellpopulation

Für keine der untersuchten Kombinationen der MSC Oberflächenmarker konnte eine Korrelation mit dem Prozentsatz an gebildeten CFU-F festgestellt werden. Eine Korrelation hätte nahegelegt, dass es sich um dieselben Zellpopulationen handelt. So kann man davon ausgehen, dass die Populationen ähnlich, aber nicht gleich sind.

Eine Studie, die Zellen nach der Isolation mittels CD271 selektierte und das Wachstumsverhalten von diesen Zellen, so wie Zellen die negativ für CD271 waren und Zellen, die nicht auf einen Oberflächenmarker selektiert wurden, verglich, zeigte, dass die CD271 positiven Zellen signifikant mehr CFU-F bilden, als die anderen beiden Zelltypen. Die Zellen, die negativ für CD271 selektiert wurden, zeigten gar kein CFU-F Wachstum [125]. Fast alle in der vorliegenden Studie untersuchten Markerkombinationen, die CD271 enthielten, wiesen eine Tendenz dahingehend auf, dass mit steigender Anzahl an Zellen mit den betreffenden Markern mehr CFU-F gebildet wurden. Dies galt für Zellen die CD271+ CD73+, CD271+ CD90+, sowie für Zellen, die CD271+ CD13+ und CD90+ waren. Dies lässt die Vermutung zu, dass CD271 eine Zellpopulation markiert, die CFU-F bilden kann - in Einklang mit den Ergebnissen von Quirici et al. [125].

Es wurden neben den zuvor Genannten auch Zellpopulationen überprüft, die nicht mittels CD271 angefärbt wurden (CD34- CD45- CD13+ CD73+, CD34- CD45- CD13+ CD146+ und CD45- CD13+ CD105+) – Hier zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation der Frequenz der Zellpopulationen mit den CFU-F. Allerdings zeigten diese Populationen unterschiedliche Tendenzen in Bezug auf die CFU-F Bildung. CD34- CD45- CD13+ CD146+ Zellen zeigten kaum Schwankungen in ihrer Anzahl in Bezug zur CFU-F Bildung. Sie waren relativ konstant vorhanden, unabhängig von der Effektivität der CFU-F Bildung. CD34- CD45- CD13+ CD73+ Zellen zeigten eine leichte Tendenz zum vermehrten Vorkommen mit steigender Anzahl an CFU-F. Eine mögliche Erklärung ist das die beiden letztgenannten Populationen nicht auf das Vorhandensein von CD271 untersucht wurden. Da dieser Marker offenbar wichtig ist für die CFU-F Bildung

könnten in einem nächsten Versuch betreffende Zellen noch um den Marker CD271 erweitert werden, da dieser wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der CFU-Bildung inne zu haben scheint. Ob CD271 selbst eine Funktion dabei hat oder lediglich exprimiert wird, ist ebenfalls ungeklärt. Es scheint möglich, dass sich z.B. für CD34- CD45- CD13+ CD73+ CD271+ Zellen eine positive Korrelation zeigt.

4.5. Vergleich verschiedener Oberflächenmarkerkombinationen zur Detektion von MSC Populationen

Um Hinweise zu erlangen, ob verschiedene Oberflächenmarker die gleichen MSC Populationen detektieren, wurden in einem nächsten Schritt die Frequenzen der Zellpopulationen an sich miteinander verglichen. Nach in vitro Expansion müssen Zellen mindestens die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 exprimieren und gleichzeitig negativ für CD34 und CD45 sein, um als MSC zu gelten [30]. Da es aber weitere, vielversprechende und aktuell beforschte Oberflächenmarker gibt, wurden für diese Studie verschiedene Kombinationen von unterschiedlichen Markern gewählt. Auch vor dem Hintergrund, dass diese Kombination für ex vivo MSC u.U. gar nicht gilt. Es zeigten sich für keine dieser Zellpopulationen Korrelationen zueinander, so dass man davon ausgehen kann, dass die Marker unterschiedliche MSC Populationen identifizieren.

Für einige der untersuchten Populationen war sogar das Gegenteil der Fall, es zeichneten sich sogar eher negative Tendenzen ab. Exemplarisch seien die Zellen CD271+ CD73+ und CD45- CD13+ CD105+ herausgestellt (Abb. 21 D). Hier zeigt sich eine stark negative Tendenz ($r = -0,342$). Auf Grund dessen kann man davon ausgehen, dass mit steigenden Zahlen der einen die andere Zellpopulation abnimmt. Muniz et al. untersuchten für ihre verschiedenen Versuchsreihen u.a. Zellen, die CD45- CD13+ CD105+ waren. Die Arbeitsgruppe entdeckte diese Zellen mit einer Frequenz von etwa 0,028 % [84]. In der vorliegenden Arbeit kamen diese Zellen etwa zu 0,049 ($\pm 0,046$) % vor. Worin dieser Unterschied in der Häufigkeit begründet liegt ist nicht geklärt. Eine mögliche Erklärung ist der Ort der Entnahme der MSC (Beckenkamm vs. Hüftgelenk).

Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass es keine Zellen mehr mit MSC Eigenschaften gibt, wenn diese Zellpopulation ex vivo depletiert wird [84]. Alles in allem könnte es sein, dass diese Zellen eine frühe Population von MSC darstellen, die noch nicht die Oberflächenmarker CD271 und CD73 exprimiert. Es könnte sich um eine Art Vorläuferzelle handeln. Die gleichen negativen Tendenzen wurden im Vergleich mit den CD271+ CD90+ Zellen und CD271+ CD13+ CD90+ Zellpopulationen gesehen. Picke et al. postulieren, dass CD90 an der Reifung („fate decision“) entscheidend beteiligt ist und die MSC ohne CD90 eine erhöhte Wachstumsrate haben. Weiterhin wurde herausgefunden, dass MSC sich eher in Adipozyten differenzieren, wenn CD90 fehlt [119]. Dies unterstützt diese These, dass CD90 entscheidend an der Schicksalsbestimmung beteiligt ist und dementsprechend konträr zu den CD45- CD13+ CD105+ Zellen ist, die eher als Vorläufer anzusehen sind.

4.6. Das Potential von MSC zur adipogenen bzw. osteogenen Differenzierung ist unabhängig vom Alter, BMI, Geschlecht oder Kellgren & Lawrence Score der Donoren

In diesem Teil der Studie wurde untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der in vitro Fähigkeit von den frisch isolierten MSC in die adipogene bzw. osteogene Linie zu differenzieren und bestimmten Eigenschaften der Donoren gab. Dazu wurden das Alter, der BMI, das Geschlecht und der K&L Score der Donoren untersucht. Um als MSC bezeichnet werden zu können, müssen MSC in vitro sowohl in die adipogene, die chondrogene als auch in die osteogene Linie differenzieren können [30]. Die MSC können aus verschiedensten Geweben gewonnen werden und es wird aktuell vermutet, dass sich ihre Herkunft auf ihre spezifischen Eigenschaften auswirkt [47, 62]. So wird weiterhin gemutmaßt, dass MSC aus dem Knochenmark eine Art Prädisposition für die osteogene Linie haben [47, 126]. Dies könnte durch die Interaktion von Zellen untereinander und mit ihrer Umgebung begründet sein [41].

Eine neue Theorie besagt, dass es mindestens zwei verschiedene MSC-ähnliche Stammzelltypen gibt. Die skelettalen Stammzellen (engl. Skeletal Stem Cell), welche

kein Fett bilden können und solche, die Fett bilden können [127]. Jedoch ist die Herkunft des Fettgewebes im Knochen weiterhin nicht abschließend geklärt. Im Knochenmark bilden Zellen (ungeachtet der Abstammung) während der Entwicklung und des Remodelings des Knochenmarks im Laufe des Lebens Fettzellen. Diese nehmen gleichzeitig – während des Alterungsvorgangs – zu und ersetzen, zumindest einen Teil oder eine Population der vorhandenen Stammzellen (HSC und MSC) [37, 127]. Aus diesen Gründen erschien eine Veränderung der Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung – festzumachen an der veränderten Bildung adipogenen Materials durch die MSC – in Bezug zu den untersuchten Parametern möglich. Die MSC befanden sich in Passage 1. Fast alle anderen bekannten Studien verwenden Passage 3 oder höher, so dass die hier erzielten Ergebnisse als neu anzusehen sind.

Eine mögliche Schwäche aller Differenzierungsversuche an sich ist die Differenzierung *in vitro* selbst. Sie ist auf Grund der *in vitro* durchgeführten Experimente nur bedingt aussagekräftig in Bezug auf die *in vivo* herrschenden Verhältnisse. Mögliche Artefakte bei der Differenzierung *in vitro* können aktuell nicht ausgeschlossen werden. In Experimenten, in denen die Dexamethasonkonzentration variiert wurde, konnte gezeigt werden, dass mit unterschiedlichen Mengen an Dexamethason, unterschiedliche Ergebnisse sowohl in Rattenzellen als auch in menschlichen Zellen erzielt werden [128]. Allgemein wird angenommen, dass Dexamethason die Differenzierung eher in Richtung adipogen verschiebt. Jedoch sind trotzdem Effekte dieses Einflusses über die Zeit denkbar, die zwar eine osteogene Differenzierung einleiten, aber mögliche Unterschiede im natürlichen *ex vivo* Potential der Zelle überdecken [129]. Welchen Unterschied die Kulturbedingungen ausmachen, wird in den Studien zum HPL deutlich [113]. Es bieten sich hier viele Möglichkeiten zur weiteren Forschung, z.B. mit HPL von Männern und Frauen getrennt und im Vergleich an. Oder verschiedene Konzentrationen von Dexamethason über die Zeit, da sich Effekte von Dexamethason auf die Genexpression auswirken können. Ferner zeigten Studien, dass die Differenzierung an sich verschiedenste Veränderungen in der Genexpression hervorruft, die nicht nur die Differenzierung betreffen [129-131]. Hier gilt es herauszufinden, ob dies nur die von Natur aus nötigen Veränderungen sind oder

ob durch die Differenzierung weitere Effekte verursacht werden. Es scheint denkbar, dass dieser Effekt über die Zeit der Kultur mögliche Unterschiede in den Zellen überdeckt und alle Zellen gleichsetzt, so dass sich keine Unterschiede feststellen lassen.

In Bezug auf die hier vorliegende Arbeit wäre ein Vergleich zu frisch isolierten, von gesunden Donoren (des gleichen Alters, BMI und Geschlechtes) stammenden MSC wegweisend. Es könnte so aufgeklärt werden, welchen genauen Effekt die Arthrose hat. Ob durch sie z.B. Effekte in den Zellen auftreten, die sie in Bezug auf ihr Differenzierungspotential verändern. Dieses „Priming“ wäre in MSC aus gesunden Donoren höchstwahrscheinlich nicht vorhanden. Hier sind allerdings ethische Vorbehalte in Bezug auf die Gewinnung bei gesunden Donoren eine Limitation - in den seltensten Fällen wird eine Hüft-TEP bei Traumapatienten implantiert. Die Arbeit von Ulum et al. lässt durch die fast gleichen Ergebnisse (MSC von übergewichtigen Donoren differenzieren weniger osteogen und haben bei der in vitro Kultur weniger CD73, CD90 und CD105), so wie das annähernd gleiche Differenzierungsprotokoll einen verändernden Einfluss der in vitro Differenzierungsversuche an sich, unwahrscheinlich werden [120]. Da die Arbeitsgruppe jedoch auch MSC der Passage 3 benutzte, ist es möglich, dass sich Effekte während der Kultur entwickelten. Für frisch isolierte (bzw. sich in Passage 1 befindliche) MSC können die vorliegenden Ergebnisse als neue Grundlage weiterer Forschung dienen.

4.6.1. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom Alter

In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang des Alters der Donoren mit den adipogenen und osteogenen Differenzierungseigenschaften der MSC in vitro festgestellt werden. In einer Studie aus dem Jahr 2011 konnten Dexheimer et al. ebenfalls keine Unterschiede in den Differenzierungseigenschaften von MSC feststellen. Allerdings wurden in besagter Arbeit Zellen in Passage 3 verwendet und die Herkunft der Zellen unterschied sich ebenfalls von denen in der vorliegenden Arbeit. So verwendete diese Arbeitsgruppe Knochenmarksaspirate aus dem Femurschaft oder aus dem Hüftkamm von Patienten, die sich entweder einer Hüft-TEP Operation oder

einer Osteotomie-Operation unterzogen [117]. Zusammengenommen ergänzen sich beide Studien jedoch gut und belegen, dass es offenbar in vitro keine Unterschiede in Bezug auf die adipogene bzw. osteogene Differenzierung in Abhängigkeit vom Alter gibt. Die vorliegende Studie deckte – im Gegensatz zu Dexheimer – eine deutlich geringere Altersspanne ab. Möglicherweise überdeckt die Arthrose hier reine Alterseffekte. In beiden Arbeiten konnte ein allenfalls leichter Trend zu einer etwas verminderten adipogenen Differenzierungsfähigkeit mit dem Alter festgestellt werden. Die Menge von gebundenem Öl-Rot-O lag in beiden Studien etwa in einem Größenbereich von ungefähr $0,07 (\pm 0,048)$ mg/ ml.

Weitere Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss des Alters von HPL als Mediumsupplement auf die MSC. So hatte HPL von älteren Donoren einen negativen Einfluss auf die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung, allerdings nicht auf die adipogene Differenzierung [113]. Mit dem Alter sinkt die Knochenneubildung und führt zu einer erhöhten Gefahr für Frakturen [35, 81]. Eine weitere Studie konnte ebenfalls keine Unterschiede in Bezug auf die osteogene Differenzierung mit dem Alter zeigen - hier wurden die MSC bei Hüft- oder Knie-Endoprothesen aus dem Femur oder der Tibia mittels Aspiration gewonnen. Als gesunde Kontrollgruppe dienten hier Aspirate aus dem Beckenkamm, allerdings war die gesunde Population deutlich jünger als die kranke [40]. Die in Bezug auf die osteogene Differenzierung gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass die Einflüsse auf die MSC komplex sind und viele extrazelluläre Faktoren eine Rolle spielen, wie die Ergebnisse bzgl. des HPL zeigen. Auf die adipogene Differenzierung hat das HPL scheinbar keinen Einfluss. Da das HPL menschlichen Ursprungs ist, kann davon ausgegangen werden, dass es die Vorgänge und Prozesse im menschlichen Körper realitätsnäher widerspiegelt als die hier verwendeten Zusätze und das FCS. Leider wurden in der Veröffentlichung von Lohmann keine absoluten Zahlen angegeben, so dass ein Vergleich der absoluten Werte mit denen dieser Arbeit nicht möglich ist. Sie konnten keine Korrelation mit untersuchten Wachstumsfaktoren nachweisen, so dass auch dort weitere Forschung nötig ist, was genau zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung führt [113]. Die Vorgänge in Bezug auf die adipogene Differenzierung unterliegen offenbar anderen Mechanismen, so dass hier

auch weitere Forschung nötig ist, welchen Einfluss das HPL hat oder ob es weitere Faktoren gibt, die die adipogene Differenzierung beeinflussen können, die nicht durch das HPL abgebildet werden.

Weitere Studien sind in einem Review von Bellantuono zusammengefasst. In diesen wurde entweder kein Unterschied gesehen oder sogar eine verminderte Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung [35]. Aktuellere Forschungen beziehen sich eher auf die Zellen in vivo - so werden z.B. im Mausmodell Transplantationsexperimente oder ex vivo Versuche durchgeführt, um das osteogene/ adipogene Potential von Stammzellen in vivo beurteilen zu können. Weiterhin werden ex vivo Zellen auch bzgl. ihrer RNA/ Genexpression untersucht, um Informationen über ihr Differenzierungspotential zu erlangen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Stammzellalterung mit einer veränderten Genexpression einhergeht. Ob jedoch die Alterung auf der veränderten Genexpression beruht oder umgekehrt, ist nicht geklärt [132]. Um die Ergebnisse weiter einordnen zu können, sind weitere Studien nötig - es scheint, als sei die Regulation der Adipozytenbildung im Knochenmark auf weitere, bisher nicht bekannte Faktoren im Körperinneren, zurückzuführen, die bisher nicht genau abgebildet werden konnten.

4.6.2. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom BMI

Beide untersuchten Differenzierungsrichtungen der MSC zeigten sich in dieser Studie unabhängig vom BMI der Donoren. Es gibt wenig vergleichbare Studien, um das Ergebnis in einen wissenschaftlichen Kontext zu setzen. Ulum et al. konnten 2017 zeigen, dass MSC von übergewichtigen Donoren weniger osteogen differenzieren. Allerdings teilten sie die Donoren nur in zwei Gruppen nach ihrem BMI ein und auch waren die dortigen Donoren relativ jung. Das geringe Alter der Donoren könnte allerdings genauso ein Vorteil der Studie sein, da so ggf. Alterseffekte sich gar nicht oder nicht so stark auswirken. Die osteogene Differenzierung wurde in dieser Studie durch eine Calciumquantifizierung bewertet, das Alizarin-Rot wurde lediglich zur Färbung verwendet im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit [120]. Für die adipogene Differenzierung konnten – analog zur vorliegenden Arbeit – keine signifikanten

Unterschiede nachgewiesen werden [120]. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2013 untersuchte kryokonservierte Stammzellen aus dem Fettgewebe bzgl. der Genexpression und phänotypischer Eigenschaften im Vergleich zu Knochenmarksstammzellen. Diese sind zwar vergleichbar zu MSC aus dem Knochenmark, allerdings ist bereits nachgewiesen worden, dass sich Stammzellen nach ihrer Herkunft unterscheiden - so ist bekannt, dass MSC aus dem Fettgewebe und MSC aus dem Knochenmark sich in ihrer Genexpression unterscheiden [55, 133]. Dadurch entstehen auch Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit - aus Fettgewebs-MSCs können beispielsweise in vitro auch Zellen mit neuralem Phänotyp und neuraler Oberflächenmarker-Expression angezüchtet werden [134]. Frazier et al. zeigten, dass die von ihnen untersuchten Stammzellen eine negative Korrelation von BMI und osteogener Differenzierung aufwiesen. Da sich die Arbeit allerdings sowohl methodisch als auch durch die eingesetzten Zellen sehr von der vorliegenden unterscheidet (u. A. kleinere Fallzahl, andere Quelle der Zellen (Fettgewebe, z.T. kryokonservierte Zellen), Gruppierung der Donoren), ist ein direkter Vergleich erneut schwierig. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2009 gibt Hinweise, dass sich das osteogene Potential von Knochenmarks-MSCs mit steigendem BMI verringert. Gemessen wurde in besagter Studie einerseits eine Belastung in Form von Dehnung der Zellen - erzeugt durch eine gleichmäßig angebrachte Biegebelastung auf den Untergrund, auf dem die Zellen in einer speziellen Vorrichtung einschichtig ausgesät waren. Andererseits wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase als Marker gemessen [108, 135]. Auch diese Ergebnisse sind nicht direkt vergleichbar, sie liefern auf Grund der nicht frisch isolierten MSC (sie befanden sich in Passage 4-6) und der anderen Untersuchungsmethoden, sowie der anderen Entnahmestelle als Aspirat aus dem Beckenkamm, eher Hinweise als vergleichbare Daten. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse der Studien und der vorliegenden Untersuchung könnte sein, dass sich Veränderungen, die sich in den Zellen durch den erhöhten BMI abspielen, erst in der Langzeitkultur zeigen. Dementsprechend ist es denkbar, dass z.B. epigenetische Veränderungen - wie sie auch durch bestimmte Kulturbedingungen erreicht werden können [136] - die die Zellen durch den erhöhten BMI erhalten, sich

erst in späteren Passagen während der Zellkultur bemerkbar machen und Zellen, die wie in dieser Arbeit, frisch isoliert wurden, diese Veränderungen noch nicht zeigen können.

Es ließ sich keine signifikante Korrelation von BMI und adipogener Differenzierung der MSC feststellen. Allerdings gab es eine leichte Tendenz, dass mit steigendem BMI die Menge an gebildeten Lipidtropfen zunimmt ($r=0,218$; $p=0,4$). In einem Tiermodell mit Mäusen, die eine fettreiche Diät bekommen haben, zeigten sich zwischen den fettreich ernährten Mäusen und einer Kontrollgruppe ebenfalls keine Unterschiede in der adipogenen Differenzierungsfähigkeit von MSC aus dem Knochenmark der Mäuse [130]. Allerdings wurden Unterschiede in der Genexpression für bestimmte Gene der Adipogenese nachgewiesen, so dass die Differenzierung an sich einen Einfluss auf die Zellen hat. Es wurden zwei spezifische Genprodukte der Adipogenese (bekannt als CEBP- α und PPAR- γ) untersucht. In den gemästeten Mäusen stieg jedoch nur eins der beiden an, während bei den normal gefütterten beide anstiegen [130]. Dies lässt vermuten, dass durch den erhöhten BMI einige Gene bereits am Maximum ihrer möglichen Expression sind und sich Unterschiede, nicht nur in Bezug auf die adipogene Differenzierung, erklären: Durch die systemische Inflammation werden die Zellen bereits in vivo so verändert/ geprägt, dass auch nach in vitro Differenzierung dort kein Unterschied mehr ersichtlich ist bzw. die in vitro Differenzierung nur begrenzt aussagekräftig ist. Weitere Experimente zur exakten Ursachenbestimmung auf der makro- und mikroskopischen Ebene dieser Effekte sind von Nöten. Demgemäß kann davon ausgegangen werden, dass der erhöhte BMI zwar einen Einfluss auf die Zellen hat, allerdings nicht auf die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung. Weitere Studien könnten darauf abzielen den genauen Effekt der systemischen Entzündungskomponenten zu erforschen, z.B. die intrazellulären Signalwege, um herauszufinden, inwiefern sich die Entzündungsfaktoren bei erhöhtem BMI auf die Zellen auswirken bzw. warum die Zellen zwar auf der genetischen Ebene reagieren, dies sich jedoch nicht in der Differenzierung widerspiegelt.

4.6.3. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom Geschlecht

Es konnten keine Unterschiede in der osteogenen oder adipogenen Differenzierungsfähigkeit in Bezug auf das Geschlecht der Donoren entdeckt werden. In einem Tiermodell mit Ratten konnten in Jahr 2012 ebenfalls keine Unterschiede nachgewiesen werden [112]. Zwar unterschieden sich dort auch die Protokolle in einigen Punkten (z.B. bei der Isolationsmethode, dem Isolationsort und der Induktion der Differenzierung), jedoch gibt es nur wenige Studien, die sich überhaupt mit diesem Unterschied befassen. Alles in allem kann man davon ausgehen, dass es keinen Unterschied in Bezug auf das Geschlecht gibt. Eine weitere mögliche Untersuchung wäre, die basale Genexpression heranzuziehen. Auf diese Weise könnten Unterschiede in den Zellen vor der Differenzierung in den betreffenden Genen nachgewiesen werden und herausgefunden werden, ob die Differenzierung an sich mögliche Unterschiede verschleiert. Ebenso ist bisher der Einfluss der in vitro Kultur an sich nicht geklärt, also inwieweit sich die Zellen in Kultur genauso verhalten/ entwickeln wie in ihrer ursprünglichen Umgebung bzw. ob die Kultur einen Einfluss auf die genannten Prozesse nimmt. Hier wäre es zielführend, die Differenzierungseigenschaften in vivo zu untersuchen. Ein möglicher weiterer Untersuchungspunkt in diesem Bezug wären hormonelle Einflussfaktoren. Die Zellen wurden mit dem gleichen Medium angezüchtet, so dass davon auszugehen ist, dass sich etwaige geschlechtsspezifische Unterschiede im Umgebungsmilieu der Zellen nicht in der Kultur wiederfinden. Hier wäre ein Ansatz gegebenenfalls mit HPL zu arbeiten, wie es Lohmann et al. getan haben, denkbar [113].

4.6.4. Differenzierungseigenschaften in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score

Es zeigten sich nach der Differenzierung der MSC keine Unterschiede zwischen verschiedenen K&L Scores der Donoren für die adipogenen und osteogene Differenzierung. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass offensichtlich keine Korrelation zwischen der radiologischen Schwere einer Arthrose und den Differenzierungseigenschaften der MSC im angrenzenden Knochenmark vorliegt. Dies

passt in eine Reihe mit der Feststellung, dass der Schmerz bei einer Arthrose nicht mit den radiologischen Zeichen korreliert [4]. Dies könnte allerdings gleichermaßen u.a. daran liegen, dass der K&L Score zum einen nicht ganz einheitlich definiert ist, zum anderen unterliegt er einer großen interindividuellen Schwankung bei der Betrachtung bzw. Auswertung [4, 27, 106, 137]. Weiterhin fehlten gesunde Kontrollen. Diese sind so gut wie nicht akquirierbar (siehe vorherige Abschnitte) [123, 124]. Das führt dazu, dass der K&L Score als limitiertes Bewertungskriterium anzusehen ist. Da es aber intraindividuell deutlich weniger Differenzen bei der Klassifikation gibt als interindividuell [106, 137] und er sich klinisch zur Arthrosebeurteilung durchgesetzt hat, wurde er in dieser Studie herangezogen, um mögliche Korrelationen zwischen dem Arthrosegrad und den Differenzierungseigenschaften der MSC zu untersuchen. MSC können sich im Knochenmark ihrer Umgebung anpassen und auf sie reagieren, so regulieren sie unter anderem die lokale Mikroumgebung oder die Differenzierung von Osteoklasten [37]. Da mit einem erhöhten K&L Score sogar makroskopische Veränderungen einhergehen, wie z.B. subchondrale Sklerosierung oder Knochenzysten, war die Vermutung, dass diese sich auch auf die Differenzierungsfähigkeit der MSC auswirkt [4]. Dass die Arthrose die osteogene und adipogene Differenzierung an sich nicht verhindert, konnten Krüger et al. 2018 zeigen, in dem sie MSC arthrotischen Knien isolierten und differenzierten. Dazu verwendeten sie Knochenstücke, die beim Einsetzen einer Knie-TEP anfielen [121]. Höchstwahrscheinlich auf Grund der genannten Faktoren, lagen keine vergleichbaren Studien zum Thema K&L Score und Differenzierungsfähigkeit vor. Dennoch ist es von großem Interesse und die vorliegende Studie ein erster Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen zum Einfluss des Arthrosegrades auf die Differenzierungsfähigkeit der subchondralen MSC. Eine Studie mit ähnlichem Design zur vorliegenden, über Patienten mit Arthrose konnte ebenfalls keinen Unterschied im Level der adipogenen Differenzierung nachweisen. Dort wurden die Hüftköpfe von Coxarthrose Patienten nach Entnahme mittels MRT untersucht und Regionen untersucht, die mittels MRT als verändert eingestuft wurden. Histologisch waren dies u.a. Veränderungen in der trabekulären Knochenstruktur und Knochenmarksfibrose. Jedoch zeigten die dort

entnommenen und kultivierten MSC nach osteogener Induktion eine geringere Calcium-Produktion (als Maß der osteogenen Differenzierung) [138].

5. Zusammenfassung

Die Coxarthrose ist eine häufige degenerative Erkrankung, deren Prävalenz mit steigendem Lebensalter zunimmt. Durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung nimmt dementsprechend auch die Anzahl an Patienten mit Coxarthrose zu. Die Therapie besteht konservativ u.a. aus Physiotherapie und Analgesie. Reichen die konservativen Maßnahmen nicht aus, steht der totale Gelenkersatz in Form einer Totalendoprothese zur Verfügung. Bisher gibt es keine regenerativen Therapien, die den arthrotisch degenerierten Gelenkknorpel ersetzen können. Durch die Fähigkeit, sich in Knochen-, Fett- und Knorpelzellen zu differenzieren, ist in der Vergangenheit die mesenchymale Stammzelle in den Fokus der Forschung gerückt. Es wird vermutet, dass diese Stammzellpopulation das Potential besitzen könnte, den defekten Knorpel zu ersetzen. Diese Zellpopulation ist in vivo jedoch noch nicht ausreichend charakterisiert und es fehlen belastbare Daten, wie sich die (pathologische) Umgebung auf die MSC auswirkt. In den letzten Jahren sind diverse Populationen von MSC mit unterschiedlichen Eigenschaften entdeckt worden. Um die subchondralen Populationen aus arthrotischen Hüften genauer zu charakterisieren, wurde hier Reaming aus dem Acetabulum (ein bei der Hüft-TEP Implantation anfallendes chirurgisches Abfallprodukt) untersucht. Die enthaltenen Zellen wurden im Hinblick auf die zelluläre Signatur und donorenbezogenen Eigenschaften untersucht. Parameter, die untersucht wurden, waren das Alter, das Geschlecht, der BMI und der K&L Score. Außerdem wurde die zelluläre Signatur anhand bestimmter Oberflächenmarker untersucht. Weiterhin wurden die isolierten und kultivierten MSC untersucht, ob sie sich bzgl. ihrer Fähigkeit unterscheiden, sich in die adipogene bzw. osteogene Linie zu differenzieren. Eine Eigenschaft, die bisher bei allen Populationen von möglichen MNC bzw. MSC nachgewiesen wurde, ist ihre Fähigkeit Kolonien zu bilden - sog. CFU-F. Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass aus allen erhaltenen Proben MSC in Form von CFU-F gewonnen werden konnten. Weiterhin waren alle Zellen in der Lage adipogen bzw. osteogen zu differenzieren. Signifikante Unterschiede in Bezug auf die Differenzierungseigenschaften konnten nicht festgestellt werden. Eine höhere CFU-

F Bildung konnte aus dem Reaming von männlichen Donoren nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich eine signifikant höhere Anzahl CD271-exprimierender Zellen im Reaming von männlichen Donoren befand. Ebenfalls konnte eine signifikante Zunahme für CD45- CD13+ CD105+ Zellen mit steigendem BMI nachgewiesen werden.

Durch diese umfassende Versuchsreihe konnte dargelegt werden, dass es in arthrotischen Hüften Unterschiede in der MSC Zahl im Vergleich der Geschlechter gibt und dass bestimmte Populationen von MSC mit steigendem BMI zunehmen. Um diese Ergebnisse einordnen zu können ist es in Zukunft notwendig zu untersuchen, ob diese Unterschiede allein durch die Arthrose bedingt sind oder ob dieser Unterschied auch im gesunden Knochenmark vorliegt.

6. Literaturverzeichnis

1. Miehle, W., *Arthrosis or osteoarthritis: do these terms imply therapy with pure analgesics or non-steroidal antirheumatic agents?* Scand J Rheumatol Suppl, 1987. **65**: p. 123-30.
2. Niethard, F.U., J. Pfeil, and P. Biberthaler, *Duale Reihe - Orthopädie und Unfallchirurgie*. 8., unveränderte Auflage ed. 2017, Stuttgart ; New York ; Delhi ; Rio: Thieme.
3. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe - Anatomie*, ed. a.A. 4. Vol. 4., aktualisierte Auflage. 2017, Stuttgart: Thieme.
4. Grifka, J. and J. Krämer, *Orthopädie, Unfallchirurgie*. 9 ed. Vol. 9., überarbeitete Auflage. 2013, Berlin: Springer- Lehrbuch. 423.
5. Bundesamt, S. *Durchschnittliche Lebenserwartung (Periodensterbetafel)*. 2021 [cited 2021 10.09.2021].
6. Robinson, W.H., et al., *Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(10): p. 580-92.
7. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 1697-707.
8. Imhof, H., I. Nöbauer-Huhmann, and S. Trattnig, *Koxarthrose – ein Update*. Der Radiologe, 2009. **49**(5): p. 400-409.
9. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 626-34.
10. Poole, A.R., *Osteoarthritis as a whole joint disease*. Hss j, 2012. **8**(1): p. 4-6.
11. Goldring, M.B. and K.B. Marcu, *Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. 224.
12. Li, B. and R.M. Aspden, *Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis*. Osteoporos Int, 1997. **7**(5): p. 450-6.
13. Li, B. and R.M. Aspden, *Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(4): p. 641-51.
14. Dequeker, J., et al., *Bone density and local growth factors in generalized osteoarthritis*. Microsc Res Tech, 1997. **37**(4): p. 358-71.

15. Fazzalari, N.L. and I.H. Parkinson, *Femoral Trabecular Bone of Osteoarthritic and Normal Subjects in an Age and Sex Matched Group*. Osteoarthritis and Cartilage, 1998. **6**(6): p. 377-382.
16. Walsh, D.A., et al., *Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford, England), 2010. **49**(10): p. 1852-1861.
17. Sokolove, J. and C.M. Lepus, *Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013. **5**(2): p. 77-94.
18. Benito, M.J., et al., *Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(9): p. 1263-7.
19. de Lange-Brokaar, B.J., et al., *Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review*. Osteoarthritis Cartilage, 2012. **20**(12): p. 1484-99.
20. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 279-89.
21. Orłowski, E.W. and V.B. Kraus, *The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive*. J Rheumatol, 2015. **42**(3): p. 363-71.
22. Foell, D., H. Wittkowski, and J. Roth, *Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(7): p. 382-90.
23. Zhuo, Q., et al., *Metabolic syndrome meets osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(12): p. 729-37.
24. Xie, C. and Q. Chen, *Adipokines: New Therapeutic Target for Osteoarthritis?* Curr Rheumatol Rep, 2019. **21**(12): p. 71.
25. Fuchs, J., M. Rabenberg, and C. Scheidt-Nave, *Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5): p. 678-686.
26. Rabenberg, M., *Arthrose*. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2013. **54**(Herausgeber: Robert Koch-Institut, Berlin 2013).
27. Harrasser, N., R.v. Eisenhart-Rothe, and P. Biberthaler, *Facharztwissen Orthopädie Unfallchirurgie*. 2016, Berlin, Heidelberg: Springer.
28. Lanyon, P., et al., *Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study*. Bmj, 2000. **321**(7270): p. 1179-83.

29. Magne, D., et al., *Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage*. Trends Mol Med, 2005. **11**(11): p. 519-26.
30. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
31. Somoza, R.A., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: challenges and unfulfilled expectations*. Tissue Eng Part B Rev, 2014. **20**(6): p. 596-608.
32. Bernstein, P., et al., *Knochen-Tissue-Engineering in der klinischen Anwendung*. Der Orthopäde, 2009. **38**(11): p. 1029.
33. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. Vol. 4., korrigierte Auflage. 2015, Stuttgart: Thieme.
34. Lüllmann-Rauch, R. and F. Paulsen, *Histologie*. 2012, Stuttgart: Thieme.
35. Bellantuono, I., A. Aldahmash, and M. Kassem, *Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(4): p. 364-70.
36. Sims, N.A. and T.J. Martin, *Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit*. Bonekey Rep, 2014. **3**: p. 481.
37. Bianco, P. and P.G. Robey, *Skeletal stem cells*. Development, 2015. **142**(6): p. 1023-7.
38. Naveiras, O., et al., *Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 259-63.
39. Méndez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
40. Murphy, J.M., et al., *Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(3): p. 704-13.
41. Bara, J.J., et al., *Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic*. Stem Cells, 2014. **32**(7): p. 1713-23.
42. Pösel, C., et al., *Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50293.

43. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. *Exp Hematol*, 1976. **4**(5): p. 267-74.
44. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. **16**(3): p. 381-90.
45. Herrmann, M. and F. Jakob, *Bone Marrow Niches for Skeletal Progenitor Cells and their Inhabitants in Health and Disease*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019. **14**(4): p. 305-319.
46. Shiozawa, Y., et al., *The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites*. *Leukemia*, 2008. **22**(5): p. 941-50.
47. Samsonraj, R.M., et al., *Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine*. *Stem Cells Transl Med*, 2017. **6**(12): p. 2173-2185.
48. Wu, Y., et al., *Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis*. *Stem Cells*, 2007. **25**(10): p. 2648-59.
49. Elahi, K.C., et al., *Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns*. *Stem Cells Int*, 2016. **2016**: p. 5646384.
50. Bernardo, M.E. and W.E. Fibbe, *Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation*. *Cell Stem Cell*, 2013. **13**(4): p. 392-402.
51. Waterman, R.S., et al., *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype*. *PloS one*, 2010. **5**(4): p. e10088-e10088.
52. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(2): p. 141-50.
53. Li, W., et al., *Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(9): p. 1505-13.
54. Ren, G., et al., *CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α* . *Cell Stem Cell*, 2012. **11**(6): p. 812-24.
55. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. *Cell Physiol Biochem*, 2004. **14**(4-6): p. 311-24.

56. Okolicsanyi, R.K., et al., *Human Mesenchymal Stem Cells Retain Multilineage Differentiation Capacity Including Neural Marker Expression after Extended In Vitro Expansion*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137255.
57. Isern, J., et al., *The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function*. Elife, 2014. **3**: p. e03696.
58. Prager, P., et al., *Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Anterior Cruciate Ligament: Characterization and Comparison of Cells from Young and Old Donors*. Knee Surg Relat Res, 2018. **30**(3): p. 193-205.
59. Assis-Ribas, T., et al., *Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation*. Dev Biol, 2018. **437**(2): p. 63-74.
60. Sacchetti, B., et al., *No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels*. Stem Cell Reports, 2016. **6**(6): p. 897-913.
61. Battula, V.L., et al., *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1*. Haematologica, 2009. **94**(2): p. 173-84.
62. Chen, K.G., et al., *Concise Review: Conceptualizing Paralogous Stem-Cell Niches and Unfolding Bone Marrow Progenitor Cell Identities*. Stem Cells, 2018. **36**(1): p. 11-21.
63. Caplan, A.I., *Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!* Stem Cells Transl Med, 2017. **6**(6): p. 1445-1451.
64. Sidney, L.E., et al., *Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors*. Stem Cells, 2014. **32**(6): p. 1380-9.
65. Heazlewood, C.F., *The isolation and expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow*, in *The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells*. 2016. p. 11-23.
66. Shepro, D. and N.M. Morel, *Pericyte physiology*. Faseb j, 1993. **7**(11): p. 1031-8.
67. Herrmann, M., et al. *Pericyte plasticity - comparative investigation of the angiogenic and multilineage potential of pericytes from different human tissues*. European cells & materials, 2016. **31**, 236-249 DOI: 10.22203/ecm.v031a16.
68. Bronckaers, A. and I. Lambrechts, *The role of mesenchymal stem/stromal cells in angiogenesis*, in *The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells*. 2016. p. 347-365.

69. Zahn, J., et al., *Platelet-Rich Plasma as an Autologous and Proangiogenic Cell Delivery System*. *Mediators Inflamm*, 2017: p. 1075975.
70. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(1): p. 41-51.
71. Armulik, A., et al., *Pericytes regulate the blood-brain barrier*. *Nature*, 2010. **468**(7323): p. 557-61.
72. Yamazaki, T. and Y.-s. Mukoyama, *Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes*. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2018. **5**(78).
73. Borysova, L. and K.A. Dora, *The three faces of pericytes*. *J Physiol*, 2018. **596**(16): p. 3453-3454.
74. Blocki, A., et al., *Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis*. *Stem Cells Dev*, 2013. **22**(17): p. 2347-55.
75. Caplan, A.I., *All MSCs are pericytes?* *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 229-30.
76. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 301-13.
77. Mercier, F.E., C. Ragu, and D.T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **12**(1): p. 49-60.
78. Prendergast, A.M. and M.A. Essers, *Hematopoietic stem cells, infection, and the niche*. *Ann N Y Acad Sci*, 2014. **1310**: p. 51-7.
79. Rasini, V., et al., *Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow*. *Cytotherapy*, 2013. **15**(3): p. 292-306.
80. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*, 2007. **9**(1): p. 204.
81. Ramasamy, S.K., et al., *Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2016. **32**: p. 649-675.
82. Barcellos-de-Souza, P., et al., *Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1836**(2): p. 321-35.

83. Herrmann, M. and J.J. Bara, *Biological changes in human mesenchymal stromal cells during monolayer culture*, in *The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells*. 2016. p. 58-74.
84. Muñiz, C., et al., *Ex vivo identification and characterization of a population of CD13high CD105+ CD45- mesenchymal stem cells in human bone marrow*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015. **6**(1): p. 169.
85. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 324-36.
86. Álvarez-Viejo, M., Y. Menéndez-Menéndez, and J. Otero-Hernández, *CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture*. *World J Stem Cells*, 2015. **7**(2): p. 470-6.
87. Rebolj, K., et al., *Hematopoietic stem cell and mesenchymal stem cell population size in bone marrow samples depends on patient's age and harvesting technique*. *Cytotechnology*, 2018. **70**(6): p. 1575-1583.
88. Herrmann, M., et al., *Phenotypic Characterization of Bone Marrow Mononuclear Cells and Derived Stromal Cell Populations from Human Iliac Crest, Vertebral Body and Femoral Head*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(14).
89. Lv, F.J., et al., *Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2014. **32**(6): p. 1408-19.
90. Tormin, A., et al., *CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization*. *Blood*, 2011. **117**(19): p. 5067-77.
91. Boxall, S.A. and E. Jones, *Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells*. *Stem Cells Int*, 2012. **2012**: p. 975871.
92. Carl-McGrath, S., et al., *Ectoepitidases in tumour biology: a review*. *Histol Histopathol*, 2006. **21**(12): p. 1339-53.
93. Gao, Z.W., K. Dong and H.Z. Zhang, *The roles of CD73 in cancer*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 460654.
94. Kumar, A., et al., *Multiple roles of CD90 in cancer*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 11611-11622.
95. Nassiri, F., et al., *Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy*. *Anticancer Res*, 2011. **31**(6): p. 2283-90.
96. Leroyer, A.S., et al., *CD146 (Cluster of Differentiation 146)*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(6): p. 1026-1033.

97. Wang, Z. and X. Yan, *CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion*. Cancer Letters, 2013. **330**(2): p. 150-162.
98. Russell, K.C., et al., *In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment*. Stem Cells, 2010. **28**(4): p. 788-98.
99. Vidal, A. and T. Redmer, *Decoding the Role of CD271 in Melanoma*. Cancers, 2020. **12**(9): p. 2460.
100. Saunders, A.E. and P. Johnson, *Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45*. Cellular Signalling, 2010. **22**(3): p. 339-348.
101. Ferenčik, M., *Wörterbuch Allergologie und Immunologie : Fachbegriffe, Personen und klinische Daten von A - Z*, 2005, Wien [u.a.]: Springer.
102. Murphy, K.M., et al., *Janeway Immunologie*. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
103. JP, M.H.u.b.E.K. *Was ist Durchflusszytometrie ?* [24.09.2021]; Available from: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/was-ist-durchflusszytometrie-facs/>
104. Meyer, K.L. *Facs and more - Datenauswertung*. [24.09.2021]; Available from: <http://www.facs-and-more.de/datenauswertung.html>.
105. Renz-Polster, H., B. Bätge, and S. Krautzig, *Basislehrbuch innere Medizin: kompakt - greifbar - verständlich*. 2013: Elsevier, Urban & Fischer.
106. Kohn, M.D., A.A. Sassoon, and N.D. Fernando, *Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis*. Clin Orthop Relat Res, 2016. **474**(8): p. 1886-93.
107. Klinker, R. and R. Baumann, *Physiologie*. 2010: Thieme.
108. Friedl, G., et al., *The osteogenic response of undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) to mechanical strain is inversely related to body mass index of the donor*. Acta Orthop, 2009. **80**(4): p. 491-8.
109. Jones, E., et al., *Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(7): p. 1944-54.
110. Seebach, C., et al., *Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions*. Calcif Tissue Int, 2007. **80**(4): p. 294-300.

111. Chaput, C.D., et al., *How stem cell composition in bone marrow aspirate relates to clinical outcomes when used for cervical spine fusion*. PLoS One, 2018. **13**(9): p. e0203714.
112. Strube, P., et al., *Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity*. Bone, 2009. **45**(6): p. 1065-72.
113. Lohmann, M., et al., *Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37839.
114. Khosla, S., et al., *The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease*. Nat Rev Endocrinol, 2020. **16**(5): p. 263-275.
115. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 318-24.
116. Samsonraj, R.M., et al., *Establishing criteria for human mesenchymal stem cell potency*. Stem Cells, 2015. **33**(6): p. 1878-91.
117. Dexheimer, V., et al., *Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22980.
118. Gurevitch, O., S. Slavin, and A.G. Feldman, *Conversion of red bone marrow into yellow – Cause and mechanisms*. Medical Hypotheses, 2007. **69**(3): p. 531-536.
119. Picke, A.K., et al., *Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protects against obesity*. Sci Transl Med, 2018. **10**(453).
120. Ulum, B., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cell donors with a high body mass index display elevated endoplasmic reticulum stress and are functionally impaired*. J Cell Physiol, 2018. **233**(11): p. 8429-8436.
121. Krüger, J.P., et al., *Proliferation, migration and differentiation potential of human mesenchymal progenitor cells derived from osteoarthritic subchondral cancellous bone*. J Stem Cells Regen Med, 2018. **14**(1): p. 45-52.
122. Oreffo, R.O.C., S. Bord, and J.T. Triffitt, *Skeletal Progenitor Cells and Ageing Human Populations*. Clinical Science, 1998. **94**(5): p. 549-555.
123. Bula, P. and F. Bonnaire, *Frakturoprothetik bei Schenkelhalsfrakturen*. OP-JOURNAL, 2016. **32**(03): p. 206-214.
124. Hack, J., et al., *Hüftendoprothetik nach Trauma*. Trauma und Berufskrankheit, 2017. **19**(2): p. 192-197.

125. Quirici, N., et al., *Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(7): p. 783-91.
126. Reger, R.L., A.H. Tucker, and M.R. Wolfe, *Differentiation and Characterization of Human MSCs*, in *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, D.J. Prockop, B.A. Bunnell, and D.G. Phinney, Editors. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. p. 93-107.
127. Chan, C.K.F., et al., *Identification of the Human Skeletal Stem Cell*. *Cell*, 2018. **175**(1): p. 43-56.e21.
128. Han, L., et al., *The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor*. *Stem Cell Res Ther*, 2019. **10**(1): p. 377.
129. Li, J., et al., *Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**(10): p. e832.
130. da Silva, S.V., et al., *Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis*. *Obesity (Silver Spring)*, 2016. **24**(12): p. 2522-2532.
131. Bragdon, B., et al., *Intrinsic Sex-Linked Variations in Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Bone Marrow Multipotent Stromal Cells*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(2): p. 296-307.
132. Ambrosi, T.H., et al., *Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche*. *Nature*, 2021. **597**(7875): p. 256-262.
133. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. *Experimental Hematology*, 2005. **33**(11): p. 1402-1416.
134. Safford, K.M., et al., *Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002. **294**(2): p. 371-379.
135. Bottlang, M., et al., *A Cell Strain System for Small Homogeneous Strain Applications - Ein Zellstimulations-System zur Applikation kleiner homogener Dehnungen*. 1997. **42**(11): p. 305-309.
136. Hermann, A., M. Maisel, and A. Storch, *Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2006. **6**(7): p. 653-670.

137. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis*. Ann Rheum Dis, 1957. **16**(4): p. 494-502.
138. Campbell, T.M., et al., *Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(7): p. 1648-59.
139. Trivanovic, D., et al., *Immune and stem cell compartments of acetabular and femoral bone marrow in hip osteoarthritis patients*. Osteoarthritis Cartilage, 2022.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

°	Grad (Winkelmaß)
° C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BMI	Body-Mass-Index (in Kilogramm/ Meter ²)
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	fibroblastische Koloniebildende Einheiten/ Colony forming units fibroblasts
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
DAMP(s)	Danger associated molecular pattern(s)
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
EZM	Extrazellulärmatrix/ extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor/ Fibroblast growth factor
FSC	Vorwärtsstreulicht/ Forward Scatter

g	Gramm
G	Erdbeschleunigung (in Meter/ Sekunde ²)
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
h	Stunde
HPL	Humanes Plättchen-Lysat/ Human platelet lysate
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
Hüft-TEP	Total Endoprothese der Hüfte
K&L Score	Kellgren & Lawrence Score
L	Liter
LCA	gemeinsames Leukozytenantigen/ Leukocyte common antigen
MCAM	Melanom Zelladhäsionsmolekül/ Melanoma cell adhesion molecule
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm ²	Quadratmillimeter
MNC	mononukleäre Zelle(n)
MSC	mesenchymale Stammzelle(n)
NGFR	Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors/ Nerve growth factor receptor

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung/ Phosphate buffered saline
PBS-Tab	PBS (s.o.) aus Tabletten hergestellt
PFA	Paraformaldehyd
PRR(s)	Pattern-recognition receptor(s)
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt(e)
SSC	Seitwärtsstreulicht/ Side Scatter
Thy-1	Thymuszellen Antigen 1/ Thymus cell antigen-1
TEP	Totalendoprothese
TLR	Toll-like-Rezeptoren
u.a.	unter anderem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
u.U.	unter Umständen

v.a.

vor allem

VEGF

vaskulärer Endothelwachstumsfaktor/ Vascular
endothelial growth factor

z.B.

zum Beispiel

z.T.

zum Teil

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemazeichnung eines gesunden und eines von Arthrose betroffenen Gelenks mit charakteristischen Strukturen	3
Abbildung 2: Von Arthrose betroffenes, linkes Hüftgelenk vor und nach einer totalendoprothetischen Versorgung	9
Abbildung 3: MSC und ihre Abkömmlinge im Kontext ihres hierarchischen Levels	15
Abbildung 4: Reaming im Transportbehältnis.....	28
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Neubauerzählkammer.	39
Abbildung 6: Mögliche Überlappung der Farbspektren bei der Verwendung von verschiedenfarbigen Farbstoffen in der Durchflusszytometrie	45
Abbildung 7: Messung von Kompensations-Beads vor und nach errechneter Kompensation.....	46
Abbildung 8: Darstellung der Regionen bzw. der Gating-Strategie für Versuchsansatz 3 zur Selektion nicht-hämatopoetischer Zellen aus den isolierten MNC.....	49
Abbildung 9: Darstellung der Regionen bzw. der Gating-Strategie für Versuchsansatz 4 zur Selektion von MSC aus den isolierten MNC	51
Abbildung 10: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom Alter der Donoren	58
Abbildung 11: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom BMI der Donoren	59
Abbildung 12: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom Geschlecht der Donoren.....	60

Abbildung 13: Prozentsatz der Bildung von CFU-F in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score der jeweiligen Hüftgelenke, aus denen die Zellen isoliert wurden	61
Abbildung 14: Mikroskopbilder nach erfolgter osteogener bzw. adipogener Differenzierung der MSC	62
Abbildung 15: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom Alter der Donoren.....	63
Abbildung 16: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom BMI der Donoren	64
Abbildung 17: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom Geschlecht der Donoren in Gruppen.....	65
Abbildung 18: Mineralablagerung und Lipidakkumulation durch MSC in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score der jeweiligen Hüftgelenke, aus denen sie isoliert wurden.....	67
Abbildung 19: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit von der Anzahl gebildeter CFU-F - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern	69
Abbildung 20: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit von der Anzahl gebildeter CFU-F - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern	70
Abbildung 21: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihr Verhältnis zueinander.	72
Abbildung 22: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom Alter - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern..	74

Abbildung 23: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom Alter - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern.	75
Abbildung 24: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom BMI - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern.	77
Abbildung 25: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC in Abhängigkeit vom BMI - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern.	78
Abbildung 26: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Geschlecht - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern.....	79
Abbildung 27: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Geschlecht - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern.....	81
Abbildung 28: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score - CD271 alleine und in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern.....	82
Abbildung 29: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf frisch isolierten MNC und ihre Verteilung auf Zellen in Abhängigkeit vom Kellgren & Lawrence Score - CD45 negative Zellen in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern	83

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien (Feststoffe)	29
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten, kommerziell erhältlichen Lösungen.	29
Tabelle 3: Angesetzte Lösungen für die Versuchsreihen.	31
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	33
Tabelle 5: Für die Versuche verwendete Geräte.....	35
Tabelle 6: Verwendete Software.....	36
Tabelle 7: Ansätze der Färbungen zur Detektion von Oberflächenmarkern.	42
Tabelle 8: Standardverdünnungsreihe zur Kalibrierung der Messreihe von Öl-Rot-O. .	53
Tabelle 9: Standardverdünnungsreihe zur Kalibrierung der Messreihe bei der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung mit Alizarin-Rot.	55
Tabelle 10: Häufigkeit der verschiedenen Zellpopulationen bei verschiedenen K&L Scores der Donoren.....	84

IV. Danksagung

PD Dr. rer. nat. Marietta Herrmann: Ich möchte dir von ganzem Herzen danken für die exzellente Betreuung während des gesamten Promotionsprozesses. Keine Frage war zu viel und für jedes auftretende Problem wurde eine Lösung gefunden. Weiterhin möchte ich mich bedanken für die vielen Vorschläge zur Verbesserung der vorliegenden Arbeit und das Engagement für das gesamte Projekt. Vielen Dank für alles !!!

Professor Dr. Maximilian Rudert: Ihnen möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen, dafür, dass Sie sich bereit erklärt haben, meine Doktorarbeit mit zu betreuen und mir damit die Möglichkeit gegeben haben, an Ihrer renommierten Klinik über solch ein spannendes Thema zu promovieren.

Theresa Kreuzahler: Vielen herzlichen Dank für die extrem große Unterstützung während der Versuche und auch in der Zeit danach. Es war mir eine Freude mit dir zusammenzuarbeiten.

Drenka Trivanovic, Rita Pereira: Euch beiden vielen Dank für die tolle Unterstützung und fachliche Hilfe während meiner Zeit bei euch im Labor und Büro.

Labor-Team des orthopädischen Zentrums: Beim gesamten Team des orthopädischen Zentrums möchte ich mich bedanken für die gute Zusammenarbeit und den immer freundlichen Umgang im Labor.

Professor Dr. Dr. Boris Holzapfel: Vielen Dank für die anfängliche Betreuung meiner Arbeit und die stetige Unterstützung beim gesamten Studiendesign und bei medizinischen Fragestellungen.

Dem gesamten OP-Team des König-Ludwig-Hauses möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen für die Bereitstellung des Reamings und der damit verbundenen Arbeit. Ohne diese Arbeit wäre das ganze Projekt nicht umsetzbar gewesen. Weiterhin gilt

mein Dank denjenigen, die die Einwilligungsbögen an die Patienten weitergegeben und auch wieder eingesammelt haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und Ulrike danken, die mich, nicht nur während der letzten 8 Jahre, fortwährend tatkräftig unterstützt haben und mir den Rücken immer frei gehalten haben. Ich bin mir zu jeder Zeit bewusst, dass das alles ohne euch nicht möglich gewesen wäre.

V. Lebenslauf

VI. Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Paper:

Immune and stem cell compartments of acetabular and femoral bone marrow in hip osteoarthritis patients

Autoren: Drenka Trivanovic, Janek Harder, Maximilian Leucht, Theresa Kreuzahler, Bianca Schlierf, Boris Holzapfel, Maximilian Rudert, Franz Jakob, Marietta Herrmann
[139]

VII. Muster der Einwilligungserklärung



Einwilligungserklärung

zur Verwendung von Rest-Gewebematerialien für Forschungszwecke am Muskuloskelettalen Centrum Würzburg (MCW)¹.

Patientenaufkleber	<p>Ich bin damit einverstanden, dass meine Rest-Gewebematerialien und Daten, wie in der Patienteninformation beschrieben, an das MCW gegeben und für medizinische Forschungszwecke verwendet werden. Das Eigentum an den Rest-Gewebematerialien übertrage ich an das MCW.</p> <p>Ich habe die Patienteninformation gelesen und hatte die Gelegenheit, Fragen zu stellen.</p> <p>Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.</p>
--------------------	--

Ich bin damit einverstanden, dass ich evtl. zu einem späteren Zeitpunkt erneut kontaktiert werde

zum Zweck der Gewinnung weiterer Informationen/Gewebematerialien	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja
zum Zweck der Einwilligung in den Abgleich mit anderen Datenbanken	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja
zum Zweck der Rückmeldung für mich gesundheitsrelevanter Ergebnisse	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja

Diese Rückmeldung soll erfolgen über die Orthopädische Klinik, König-Ludwig-Haus, in der meine Rest-Gewebematerialien/Daten gewonnen wurden.

Datenschutzerklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Orthopädische Klinik, König-Ludwig-Haus und das MCW, wie in der Patienteninformation beschrieben

- personenbezogene Daten von mir erhebt und speichert,
- weitere Angaben über meine Gesundheit aus meinen Krankenunterlagen entnimmt
- und die Daten gemeinsam mit meinen Rest-Gewebematerialien pseudonymisiert (das heißt verschlüsselt) für medizinische Forschungsvorhaben zur Verfügung stellt.

Die Rest-Gewebematerialien und Daten dürfen für bis zu 30 Jahre für medizinische Forschungsvorhaben verwendet werden.

<p>Ich stimme der Weitergabe meiner Gewebematerialien und Daten in Länder außerhalb der EU auch in den Fällen zu, in denen kein Angemessenheitsbeschluss der Europäischen Kommission vorliegt und keine behördlich genehmigten Datenschutzklauseln angewendet werden. Über die möglichen Risiken einer solchen Weitergabe bin ich aufgeklärt worden.</p>	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> ja
--	-------------------------------	-----------------------------

¹ Zur besseren Lesbarkeit wird im weiteren Verlauf die Abkürzung MCW verwendet

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber dem MCW ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden die verbliebenen Rest-Gewebematerialien automatisch vernichtet und die erhobenen Daten gelöscht oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeführten Analysen können nicht mehr entfernt werden.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt bei in meiner Patientenakte an der Orthopädischen Klinik, König Ludwig Haus, Würzburg.

Name des Patienten in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Patienten einzutragen)

Unterschrift des Patienten

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten eingeholt.

Name des Arztes in Druckbuchstaben (Stempel)

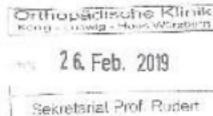
Ort, Datum Unterschrift des Arztes

VIII. Ethikanträge



Ethik-Kommission • Versbacher Str. 9 • 97078 Würzburg

Prof. Dr. med. Maximilian Rudert
Lehrstuhl für Orthopädie
Brettreichstr. 11
97074 Würzburg



Ethik-Kommission
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Versbacher Str. 9
97078 Würzburg

Vorsitzende: Prof. Dr. E.-B. Bröcker
Geschäftsführung: K. Reith, Ass. Jur.
Dr. R. Wölfel
Sekretariat: S. Schmidt, A. Meiner, A. Metzger
Telefon 0049 (0)931 31 46316
Telefax 0049 (0)931 31 87520
ethikkommission@uni-wuerzburg.de

Würzburg, 21.02.2019/am

Unser Zeichen: 186/18 am (bitte bei Schriftwechsel angeben) Tel. Durchwahl: 0901 31 80754

Beratung nach § 15 Berufsordnung für Ärzte in Bayern Ergänzung zum Votum vom 13.11.2018

Studientitel: Verwendung von Rest-Gewebematerialien für Forschungszwecke.
Antragsteller: Prof. Dr. med. Maximilian Rudert, Lehrstuhl für Orthopädie, Brettreichstr. 11, 97074 Würzburg

Sehr geehrter Herr Prof. Rudert,

die Ethik-Kommission hat die unten geisteten ergänzten/geänderten Unterlagen, Ihr Schreiben vom 06.02.2019, Eingang am 06.02.2019, geprüft.

Die Bedingungen aus unserem Votum vom 13.11.2018 sind hiermit erfüllt.

Die Ethik-Kommission wünscht Ihnen für Ihr Vorhaben viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Ausgefertigt im Auftrag

Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker
Seniorprofessorin
Vorsitzende der Ethik-Kommission

Dr. med. Reinhard Wölfel
Stellv. Geschäftsführer der Ethik-Kommission

Unterlagen vom 04.12.2018 (Eingang 04.12.2018)
Einwilligung_V2_markiert.pdf
Einwilligung_V2.pdf
Patienteninformation_V2_markiert.pdf
Patienteninformation_V2.pdf
Studienprotokoll - Rest-Biomaterialien KLH_V2.pdf

Ethik-Kommission • Versbacher Str. 9 • 97078 Würzburg

Prof. Dr. med. Franz Jakob
Lehrstuhl für Orthopädie
Brettreichstr. 11
97074 Würzburg

Ethik-Kommission
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Versbacher Str. 9
97078 Würzburg
Vorsitzende: Prof. Dr. E.-B. Bröcker
Geschäftsführung: K. Reith, Ass. Jur.
Dr. R. Wölfel
Sekretariat: S. Schmidt, A. Meister, A. Metzger
Telefon 0049 (0)931 31 48315
Telefax 0049 (0)931 31 87520
ethikkommission@uni-wuerzburg.de

Würzburg, 21.02.2019/am

unser Zeichen: **187/18**-am (bitte bei Schriftwechsel angeben) Tel. Durchwahl: 0931 31 80764

Beratung nach § 15 Berufsordnung für Ärzte in Bayern

Studientitel: Der Einfluss der Mikroumgebung auf Mesenchymale Stromazellen bei der Frakturheilung
Antragsteller: Prof. Dr. med. Franz Jakob, Lehrstuhl für Orthopädie, Brettreichstr. 11, 97074 Würzburg

Sehr geehrter Herr Prof. Jakob,

die Ethik-Kommission hat Ihren Antrag vom 22.08.2018 auf der Basis der Unterlagen in Anhang 1 geprüft und in der Sitzung am 11.09.2018 beraten.

Es bestehen keine ethisch-rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie.

Die Bewertung erfolgt allerdings **unter der Bedingung**, dass im Rahmen der o.g. Studie die Patienteninformation und Einwilligungserklärung gemäß der Version V4 vom 11.02.2019 aus der Studie 186/18 verwendet werden.

Allgemeine Hinweise:

Sie werden um Beachtung folgender Punkte gebeten:

- Ihrem Antrag entsprechend vorzugehen. Änderungen hierzu sind der Ethik-Kommission zur erneuten Prüfung vorzulegen.
- Die Deklaration des Weltärztebundes in der aktuellen Version hinsichtlich der ethischen und rechtlichen Aspekte biomedizinischer Forschung am Menschen zu beachten.
- Der Ethik-Kommission das Studienende anzuzeigen und einen Kurzbericht über das Ergebnis der Studie vorzulegen.

Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethik-Kommission betrifft unser Votum nur die ethische Beurteilung des Projektes. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt bei den Untersucherinnen/Untersuchern.

Mit freundlichen Grüßen

Auslieferung im Auftrag

Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker
Seniorprofessorin
Vorsitzende der Ethik-Kommission

Dr. med. Heinnard Worell
Stellv. Geschäftsführer der Ethik-Kommission

Anhang 1

Antrag vom 22.08.2018
Anlagen_Mikroumgebung.pdf
Einwilligung_Rest-Biomaterialien.pdf
Ethikantrag_Mikroumgebung.pdf
Patienteninformation_Rest-Biomaterialien.pdf
Studienprotokoll_Mikroumgebung.pdf