Universität Ulm

Orthopädische Universitätsklinik mit Querschnittgelähmtenzentrum
am Rehabilitationskrankenhaus Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Reichel

Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen
Sektionsleiter: Prof. Dr. med. R. Brenner

Systemische Mobilisierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen im Rahmen orthopädischer Routineeingriffe

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Sarah Helen Eichner

Ulm

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Weiss

Tag der Promotion: 13.07.2012

Meinen Eltern

Meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Von der totipotenten Stammzelle zur ausdifferenzierten Zelle..... 2

1.1.1. Eigenschaften…….... 2

1.1.2. Entwicklung..... 2

1.2. Multipotente mesenchymale Stromazellen..... 4

1.2.1. Entdeckung..... 4

1.2.2. Heterogenität..... 5

1.2.3. Differenzierung..... 9

1.2.4. Systemische Mobilisierung..... 10

1.3. Zielsetzung..... 13

2. Material und Methoden 14

2.1. Material..... 14

2.1.1. Patientenkollektiv..... 14

2.1.2. FACS-Antikörper und Isotypkontrollen..... 16

2.1.3. Chemikalien..... 17

2.1.4. Geräte..... 18

2.1.5. Verbrauchsmaterialien..... 19

2.1.6. Zellkulturmedien..... 20

2.1.7. Computerprogramme..... 21

2.2. Methoden..... 22

2.2.1. Isolierung und Kultivierung aus Knochenmarkaspirat..... 22

2.2.2. Isolierung und Kultivierung aus peripherem Blut..... 23

2.2.3. Zellpassagierung und Zellzahlmessung..... 24

2.2.4. Einfrieren und Auftauen..... 25

2.2.5. Zellfärbungen..... 26

2.2.6. Durchflusszytometrie..... 30

2.2.7. Statistische Auswertung..... 37

3. Ergebnisse 38

3.1. Etablierung eines Nachweises systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen..... 38

3.2. Multipotente mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark..... 38
3.2.1. Morphologie..... 38
3.2.2. Typisierung..... 39
3.2.3. Differenzierungspotential..... 44
3.3. Systemische Mobilisierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach orthopädischen Routineeingriffen..... 47
3.3.1. Optimierung der Messbedingungen für die FACS-Analyse.. 47
3.3.2. Charakterisierung mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen mittels Durchflusszytometrie..... 50
3.3.3. Zunahme multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach Operation..... 53
3.4. Kultivierung systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen..... 57
3.4.1. Morphologie..... 57
3.4.2. Differenzierung..... 59
4. Diskussion 61
4.1. Etablierungsphase anhand multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmark..... 62
4.2. Systemische Mobilisierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach orthopädischen Routineeingriffen..... 63
4.2.1. Optimierung der Messbedingungen..... 63
4.2.2. Charakterisierung mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen mittels Durchflusszytometrie und ihrer Ergebnisse..... 64
4.2.3. Zunahme multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach Operation..... 65
4.2.4. Unterschiede der Operationsart auf die systemische Mobilisierung..... 67
4.3. Kultivierung systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen..... 70
4.4. Schlussfolgerung..... 73
5. Zusammenfassung 75
6. Literaturverzeichnis 77
Anhang 88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
$AgNO_3$	Silbernitrat
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BMMSC	bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells
°C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calciumion
CD	cluster of differentiation
CFU-F	colony forming unit-fibroblast
CO_2	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
g	Gramm, Fallbeschleunigung
G-CSF	granulocytes colony stimulating factor
GvHD	graft versus host disease
HMNZ	hämatopoetische mononukleäre Zellen
HTEP	Hüftgelenkstotalendoprothese
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ICM	inner cell mass
IgG	Immunglobulin G
kg	Kilogramm
l	Liter

Li	Lithium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
M	Molar
MAPC	multipotential adult progenitor cells
MASC	multipotential adult stem cells
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesiumion
MIAMI	marrow-isolated adult multilineage inducible cells
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MSZ	mutipotente mesenchymale Stromazellen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OP	Operation
PBMSC	peripheral blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
ph	potentia hydrogenii
rpm	Rotationen pro Minute
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle
u	unit
VSELs	very small embryonic like stem cells
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

1. Stammzellentwicklung
2. Die Stammzellforscher A. Maximow und A. J. Friedenstein
3. Multipotente mesenchymale Stromazellen wandern vom Knochenmark in perivaskuläre Nischen
4. Differenzierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Gewebe aller drei Keimblätter
5. Differenzierungpotenzial multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ)
6. Stammzellmobilisierung
7. Isolierung kernhaltiger Zellen aus Knochenmarkaspirat durch Dichtegradientzentrifugation
8. FACSCalibur™
9. Messküvette eines Durchflusszytometers
10. Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht
11. Optisches System des Durchflusszytometers FACSCalibur™
12. Kultivierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen
13. Positive Oberflächenmarker in der immunhistochemischen Färbung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat
14. Negative Oberflächenmarker in der immunhistochemischen Färbung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat
15. Positive Oberflächenmarker in der FACS-Analyse humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat
16. Negative Oberflächenmarker in der FACS-Analyse humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat
17. Adipogene Differenzierung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat
18. Osteogene Differenzierung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat
19. Vergleich zweier gemessener Antikörperkombinationen (in Prozent) von Blutproben antikoaguliert mit EDTA (dunkelrot) oder Lithiumheparin (hellrot)

20. Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von CD54 positiven Zellen
21. Geeignete Lagerung der Blutproben
22. Haltbarmachen der kernhaltigen Zellschicht aus peripherem Blut mithilfe von einprozentigem Paraformaldehyd (PFA 1%) und Untersuchung mittels FACS-Analyse
23. Beispielhafter Forward-/Side-Scatter mit dazugehörigen Isotypkontrollen der FACS-Analyse aus peripherem Blut
24. Beispielhafte Antikörperkurven der FACS-Analyse kernhaltiger Zellen aus peripherem Blut.
25. Boxplot-Darstellung mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ) vor Operation (prä OP) und nach Operation (post OP)
26. Anstieg der Dreierkombination-Marker von HTEP- und Triple-Osteotomie-Patienten im Vergleich
27. Kultivierte multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut (I)
28. Kultivierte multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut (II)
29. Zehn Tage kultivierte und anschließend adipogen differenzierte multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) aus peripherem Blut

Tabellenverzeichnis

1. Patientenkollektiv für Knochenmarkaspirat
2. Patientenkollektiv für periphere Blutproben
3. Liste der verwendeten FACS-Antikörper
4. Liste der verwendeten Isotypkontrollen
5. Liste der verwendeten Chemikalien
6. Liste der verwendeten Geräte
7. Liste der Verbrauchsmaterialien
8. Liste der verwendeten Computerprogramme
9. Verwendete Primärantikörper
10. Eingesetzte Fluorochrome
11. Pipettierschema
12. Biologische Funktion der verwendeten Oberflächenmarker

"In the beginning there is the stem cell; it's the origin of an organism's life. It is a single cell that can give rise to progeny that differentiate into any of the specialized cells of embryonic or adult tissues; that is, it is totipotent."

Steward Sell, MD (Stem Cells Handbook)

1. Einleitung

Mit der Stammzelle beginnt das Leben. Aus der ersten Stammzelle, der fertilisierten Eizelle, entwickelt sich alles andere menschliche Gewebe. Letztendlich entsteht daraus der gesamte menschliche Organismus. (59)

An der Entstehung und Ausbildung mesenchymalen Gewebes ist in erster Linie die Nachkommenschaft einer sehr kleinen Anzahl von Stammzellen beteiligt, den multipotenten mesenchymalen Stromazellen oder kurz MSZ. (18, 19)
Das Interesse an diesen Zellen wuchs in den letzten Jahren immens, vor allem aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an Reparaturprozessen des menschlichen Körpers, aber auch als künftige zelluläre Basis für Gewebsersatz. (27)

So können MSZ nach Gewebeschädigungen, beziehungsweise verstärkter Beanspruchung aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf mobilisiert werden, um neben ihrer Aufgabe der Sicherstellung der Gewebe-Homöostase die Regeneration geschädigter Gewebe zu erleichtern. (56) Bei zum Beispiel Knochenbrüchen schaffen diese Zellen durch Mitwirkung an Angiogenese und Osteogenese eine optimale Umgebung für Frakturheilungen, was schließlich zu funktioneller Erholung des geschädigten Gewebes führt. (46)

Umgekehrt führt auch die systemische Applikation multipotenter mesenchymaler Stromazellen neben dem Homing in das Knochenmark zu einer Anreicherung in traumatisierten oder ischämischen Geweben. (70) Dabei soll eine Abhängigkeit zwischen proliferativer Kapazität der MSZ einerseits zur Schwere des Traumas, andererseits zum Geschlecht bestehen. Auch eine altersbedingte Abnahme der Anzahl an MSZ wurde von einigen Instituten berichtet, während andere keine Abweichung feststellen konnten. (58)

1.1. Von der totipotenten Stammzelle zur ausdifferenzierten Zelle

1.1.1. Eigenschaften

Die Stammzelle im Allgemeinen ist durch drei charakteristische Eigenschaften definiert, die sie *in vivo* erfüllen muss. (45)

1. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Selbstreplikation):
Es muss immer eine der Tochterzellen als Stammzelle erhalten bleiben um den Bestand für spätere Zellteilungen und so das Überleben des Stammzellpools zu sichern. (45) Dieser Vorgang wird als asymmetrische Zellteilung bezeichnet. (38)

2. Die Fähigkeit zur Proliferation:
Durch viele aufeinanderfolgende Teilungen können sich Stammzellen und ihre Tochterzellen in großem Umfang vervielfältigen. (45)

3. Die Fähigkeit zur Differenzierung:
Unreife Stammzellen und ihre Tochterzellen können sich durch Differenzierung zu ausgereiften, funktionsfähigen Endzellen entwickeln. (45)

1.1.2. Entwicklung

Die ursprünglichste Stammzelle, die Zygote, das Produkt der Verschmelzung einer Eizelle mit einem Spermium, ist totipotent. Diese Urstammzelle besitzt die Fähigkeit, sich in jedes mögliche Gewebe eines Embryos zu entwickeln und zusätzlich das extraembryonale Gewebe der maternalen Plazenta auszubilden. (56) Durch Zellteilung entstehen Tochterzellen, die Blastomeren. Zusammen bilden die Blastomeren eine Zellkugel, bestehend aus 32 Zellen, die Morula. (57) Bereits in dieser Entwicklungsphase haben die Zellen ihre Fähigkeit verloren, plazentares Gewebe auszubilden und werden ab hier als pluripotente Stammzellen bezeichnet. Dennoch besteht weiterhin die Fähigkeit, alles embryonale Gewebe zu entwickeln. (56)
Die wachsende Morula entwickelt sich weiter zur Blastozyste. In ihrem Inneren entsteht die innere Zellmasse (ICM). Aus ihr gehen während der Gastrulation drei unterschiedliche Keimblätter hervor. Vermutet wird, dass die drei Keimblätter

Ektoderm (Aussenschicht), Mesoderm (Mittelschicht) und Endoderm (Innenschicht), aus je einem spezifischen Stammzelltyp gebildet werden. Diese 3 Zelltypen sind nunmehr multipotent. Stammzellen, die Multipotenz besitzen, können also nur noch ein jeweils spezifisches Keimblatt ausbilden. (56) Oftmals werden fälschlicherweise die Begriffe pluripotent und multipotent synonym verwendet. (59) Schließlich entstehen aus den multipotenten die monopotenten Stammzellen. Sie führen die Entwicklung in die verschiedenen Organsysteme und Gewebe des jeweiligen Keimblattes eines Embryos weiter. (57)

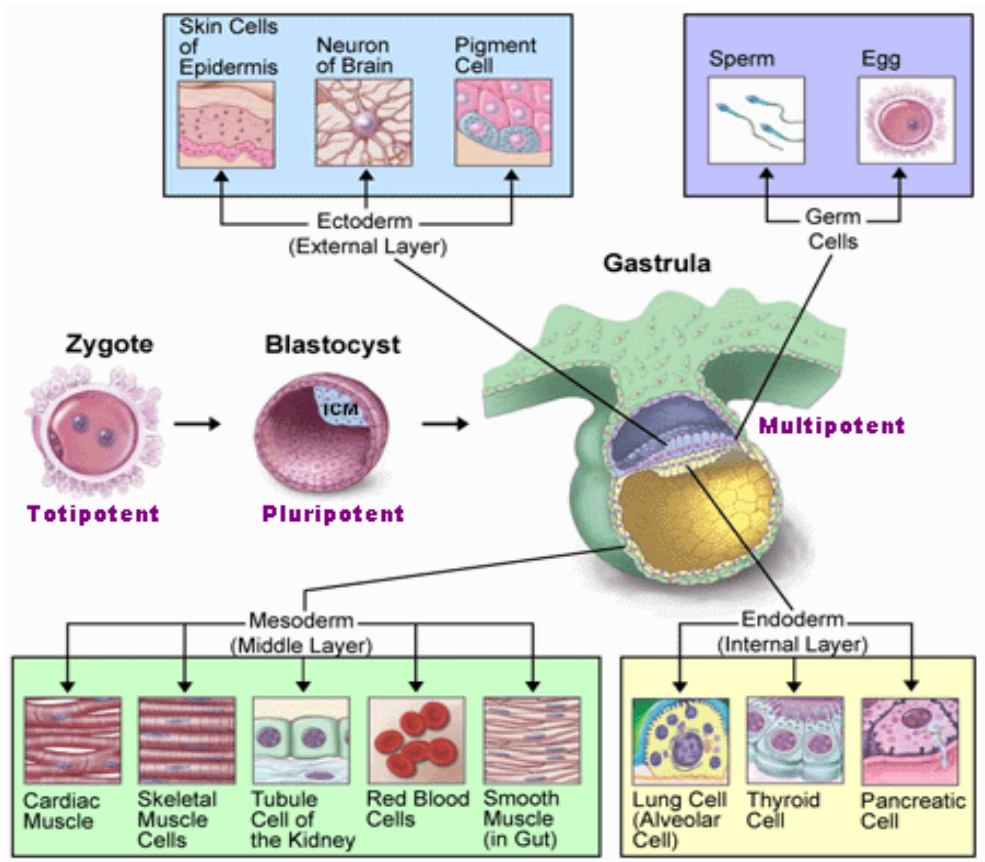


Abb. 1: Stammzellentwicklung: Die Zygote, die befruchtete Eizelle, ist totipotent. Durch 5 Teilungszyklen entsteht die Morula, die sich weiter zur Blastozyste entwickelt. Die Blastozyste enthält die innere Zellmasse (ICM). Aus ihr werden embryonale Stammzellen gewonnen. Morula und Blastozyste enthalten pluripotente Stammzellen. Die Ausbildung der 3 Keimblätter entspricht dem Übergang pluripotenter Stammzellen in multipotente Stammzellen. Diese Zellen bilden monopotente Vorläuferzellen der einzelnen Organe aus. Im Lauf dieser Entwicklung erhöht sich somit die Funktionalität dieser Zellen, während die Differenzierungspotenz abnimmt. Keimzellen bleiben totipotent. Abbildung modifiziert. (1)

Ausser den Keimzellen der Geschlechtsorgane, die lebenslange Totipotenz behalten, verbleiben aber nicht nur monopotente Zellen, sondern auch einige multi- vielleicht sogar pluripotente Stammzellen im adulten Gewebe. (59)
Während embryonale Stammzellen aus der ICM gewonnen werden können, finden sich adulte Stammzellen im ausdifferenzierten Organismus und können beispielsweise aus Nabelschnurrestblut, Blut oder Knochenmark gewonnen werden. (45) Adulte Stammzellen werden sowohl aus ethischen, als auch aus praktischen Aspekten bevorzugt. (40)

1.2. Multipotente mesenchymale Stromazellen

1.2.1. Entdeckung

Dass überhaupt Stammzellen im adulten Organismus existieren, wurde erstmals 1909 von dem russischen Histopathologen A. Maximow (1874-1928) publiziert. Er erstellte eine Theorie über die Rolle von Stammzellen bei der Hämatopoese, die in ihren Grundzügen bis heute Gültigkeit besitzt. (13, 45)
Fast 60 Jahre später, 1968, postulierte A.J. Friedenstein (1924-1998), dass im Knochenmark neben hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) noch eine Gruppe adulter nicht-hämatopoetischer Stammzellen existiert. (13) 1970 isolierte er zum ersten Mal aus dem Knochenmark von Meerschweinchen adhärente, klonogene, fibroblasten-ähnliche Zellen, die in Kolonien zusammenlagen und sich *in vitro* stark vermehren ließen. (31) Zusätzlich konnte Friedenstein zeigen, dass diese Zellen Multipotenz besitzen, indem er sie in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzierte. Er bezeichnete diese Zellen wegen ihres Aussehens als „colony forming unit-fibroblast“ (CFU-F) und später als „mesenchymale Stammzellen“ aufgrund ihres Differenzierungsverhaltens in multiple mesenchymale Zelllinien. (13)

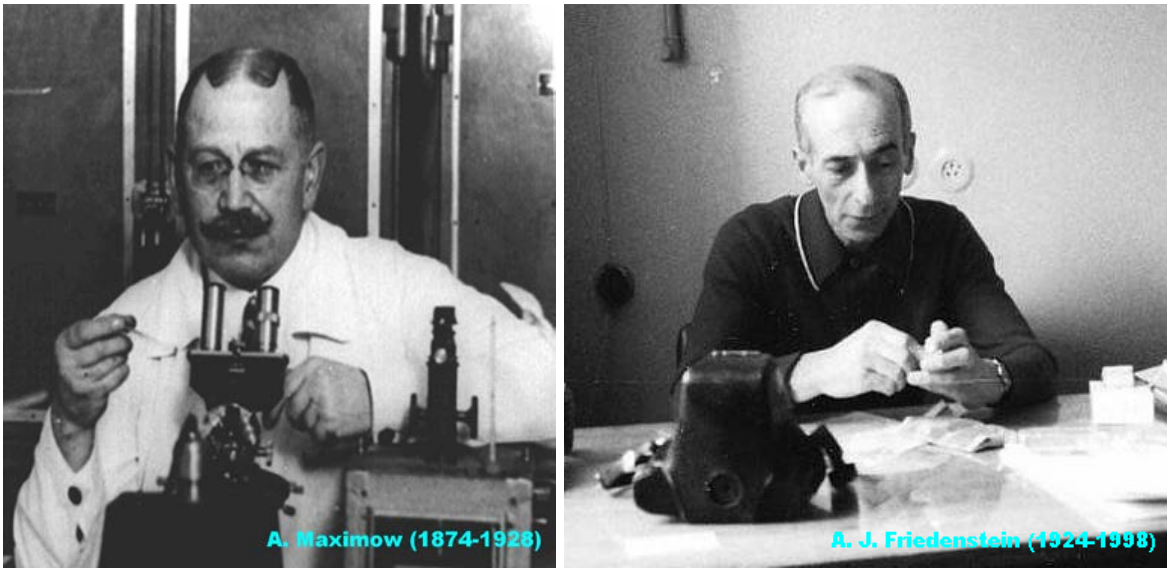


Abb. 2: Die Stammzellforscher A. Maximow und A. J. Friedenstein: A. Maximow publizierte als erster über die Existenz von Stammzellen im adulten Gewebe. Er erstellte eine Theorie über ihre Rolle bei der Hämatopoese, die in ihren Grundzügen bis heute Gültigkeit besitzt. A. J. Friedenstein gilt als der Entdecker der multipotenten mesenchymalen Stromazellen, die er wegen ihres Aussehens zunächst als „colony forming unit-fibroblast“ bezeichnete. Er differenzierte sie in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten und konnte somit ihre Multipotenz beweisen. Abbildungen modifiziert. (13, 45)

1.2.2. Heterogenität

Die multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) stellen sich *in vitro* als sehr kleine heterogene Gruppe innerhalb der nicht-hämatopoetischen Stammzellpopulation dar. Sie befinden sich hauptsächlich in den stromalen Anteilen, einem bindegewebsartigen Geflecht aus vom mesenchymalen System abstammenden Zellen. (74) Dort gehen MSZ eine enge Verbindung mit den hämatopoetischen Zellreihen ein und schaffen so ein angemessenes Umfeld für ihre Proliferation und Differenzierung. (31, 53) MSZ bilden *in vitro* unterschiedlich große Koloniezahlen aus, die jeweils variierende Wachstumsraten, Immunphänotypen und Differenzierungspotenziale besitzen. (74) Diametrale Meinungen existieren unter den einzelnen Forschergruppen, ob es sich bei der heterogenen Population wirklich um multi-, vielleicht sogar pluripotente Zellen handelt, oder aber, ob diese Zellen eine Mischung aus verschiedenen Vorläuferzellen mit jeweils eingeschränktem Potenzial darstellen. (57)

Trotz der wachsenden Kenntnis über den Aufbau von MSZ ist es noch nicht möglich, diese Zellen durch einen einzigen Marker beziehungsweise Antikörper zu charakterisieren. Stattdessen werden Kombinationen, einerseits von verschiedenen Positivmarkern, andererseits von Positiv-, sowie Negativmarkern verwendet, um diese Zellen besser identifizieren zu können. (27) Aus diesem Grund und dem variierenden Differenzierungspotenzial, konnte die genaue Differenzierungsstufe noch nicht restlos verifiziert werden. (31) Die schnelle Proliferationsrate in Kultur mit hoher Selbsterneuerungspotenz, mehrere stammzelltypische Oberflächenmarker und die Differenzierungsfähigkeit in verschiedenste mesenchymale Gewebe auch in individuellen Zellen lassen zur Zeit darauf schließen, dass es sich bei den multipotenten mesenchymalen Stromazellen tatsächlich um multi-, vielleicht auch pluripotente Zellen handeln dürfte. Diese Eigenschaften lassen sich *in vitro* über mehrere Zellpassagierungen nachweisen. (74)

Wohl in erster Linie wegen ihres heterogenen Aussehens *in vitro* und den von Labor zu Labor unterschiedlichen Isolierungsmethoden sind MSZ seit ihrer Entdeckung vor über 40 Jahren unter vielen verschiedenen Namen in der Literatur beschrieben worden. (57) Unter anderem werden sie als „mesenchymale Stammzellen“ (MSC), „multipotente adulte Progenitorzellen“ (MAPC), „marrow-isolated adult multilineage inducible cells“ (MIAMI), „multipotente adulte Stammzellen“ (MASC) und „bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells“ (BMMSC) bezeichnet. (31, 39)

Da es bislang noch nicht auf überzeugende Weise gelang, nicht-hämatopoetische Stammzellen nach Einbringung in eine sich entwickelnde Blastozyste zu Organen und Geweben reifen zu lassen, ihre Differenzierungspotenz *in vivo* somit noch nicht bestätigt ist, schlägt die „International Society for Cellular Therapy“ seit 2005 den Begriff multipotente mesenchymale Stromazelle (MSZ) vor. Vor allem aber im englischsprachigen Raum ist das Synonym „mesenchymale Stammzelle“ weiterhin stark verbreitet. (26, 57)

In den vergangenen drei bis vier Jahren wurde darüber hinaus noch eine weitere seltene Population sehr kleiner, wohl pluripotenter Zellen, die „very small

embryonic like stem cells“ (VSELs) im Knochenmark gefunden. Diese Zellen sind sehr viel kleiner als andere kernhaltige Zellen, kleiner sogar als Erythrozyten, aber größer als periphere Blutplättchen (3,63 ± 0,09 µm im Durchmesser). (72)
Es könnte durchaus sein, dass im Knochenmark, ähnlich der Embryogenese, eine sich entwickelnde Rangfolge von Stammzellen existiert. An oberster Stelle stünden dabei die VSELs als pluripotente Stammzellen. Aus ihnen gehen offenbar als Tochterzellen MSZ und HSZ hervor. (57)
Da sie aufgrund ihrer Größe im Zelldebris zu finden sind, wurden VSELs in der Vergangenheit durch Routineverfahren in der Zellsortierung ausgegrenzt. (72)

Die Hauptquelle multipotenter mesenchymaler Stromazellen befindet sich im Knochenmark. Deren Population ist aber auch dort mit etwa 0,001%-0,01% aller Knochenmarkszellen nur sehr klein. (65)
Unlängst konnten MSZ auch aus zahlreichen peripheren Geweben gewonnen und identifiziert werden. (65) Neben Haut, Fettgewebe und Skelettmuskulatur wurden MSZ auch aus Synovialmembran und Periost isoliert. (27, 54) Zusätzlich wurden sie in Geweben von Leber, Pankreas, Zähnen, Geschlechtsorganen und Gehirn gefunden. (50, 65) In Mäusen wurden MSZ noch in einer Reihe anderer Organe nicht-mesenchymalen Ursprungs, unter anderem in Niere, Lunge, Milz und Thymus entdeckt. (38)

Zur Zeit besteht die begründete Annahme, dass MSZ auch in sogenannten perivaskulären Nischen als „Perizyten“ existieren, dort Blutgefäße des Knochenmarks und auch der Dentalpulpa auskleiden und von dort postnatal in peripheres Gewebe und Organe verbreitet werden. Diese Perizyten sind MSZ, da sie in der Lage sind, sich in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren. (21, 38)
Die Lokalisation der MSZ nahe der Blutgefäße sorgt für eine schnelle Mobilisation in den Blutkreislauf und gewährleistet einen einfachen Zugang in sämtliche Organe und Gewebe. (38)

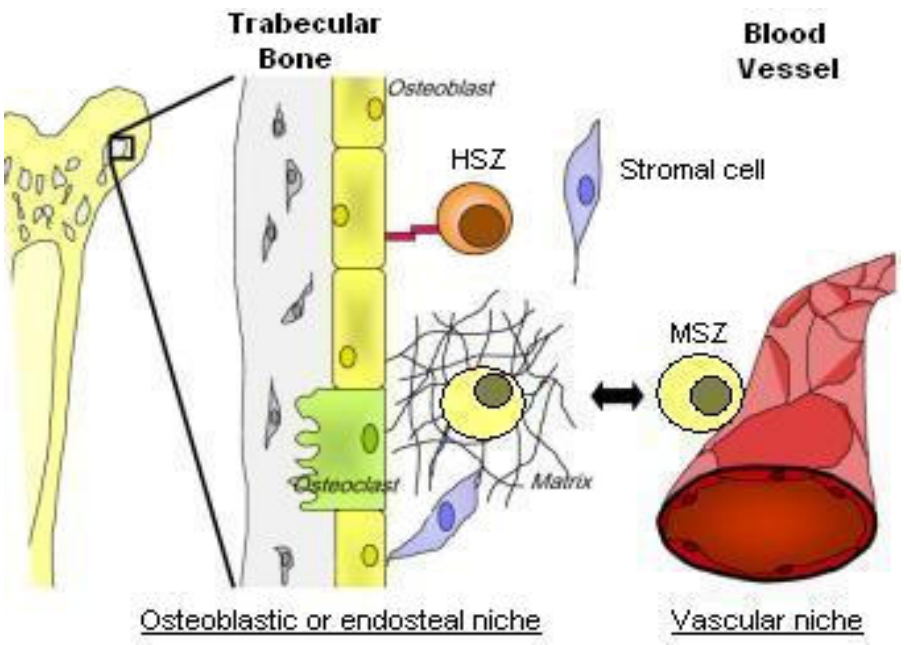


Abb. 3: Multipotente mesenchymale Stromazellen wandern vom Knochenmark in perivaskuläre Nischen: Im Knochenmark befinden sich hämatopoetische Stammzellen (HSZ) neben nicht-hämatopoetischen Stammzellen. Die Ausbreitung multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ) in peripheres Gewebe wird erleichtert durch ihr Vorkommen in perivaskulären Nischen. Abbildung modifiziert. (12)

Die Migration von MSZ aus dem Knochenmark, ihrer eigentlichen „Heimat“ in geschädigte Gewebe wird als Rekrutierung bezeichnet. (17) So konnte auch eine Auswanderung von MSZ in tumoröses Gewebe festgestellt werden. (54) In gesunden Tieren wurde ein Homing nicht nur im Knochenmark, sondern auch in Lunge und Muskel beobachtet. Die Leistungsfähigkeit von MSZ in verschiedene Organe und Gewebe zu migrieren scheint mit ihrer Expression des Oberflächenmarkers Stro-1 zusammenzuhängen. (38) Gleichzeitig verfügen MSZ durch Freisetzung bioaktiver Faktoren über immunmodulatorische Fähigkeiten. (21)

Im Moment sind die Faktoren und Prozesse noch weitgehend unbekannt, die Stammzellen entweder im ursprünglichen Zustand belassen oder zu einer Zelldifferenzierung in den Zielgeweben führen. (38)

1.2.3. Differenzierung

MSZ sind zu ungewöhnlicher Differenzierungsbreite fähig und können sogar in Zellen multipler Organe und Systeme aller drei Keimblätter ausdifferenzieren. (31, 50) Unter experimentellen Bedingungen differenzieren multipotente mesenchymale Stromazellen in Knochen, Knorpel, Fett und fibröses Bindegewebe. (31) Sie sind zur Erneuerung von Muskeln, Sehnen, Ligamenten, und stromalem Gewebe fähig. (74)
Zusätzlich zu mesenchymalen Geweben können MSZ sich in Neurone, Hepatocyten sowie Insulin-produzierende Zellen des Pankreas entwickeln. (50)
In Transplantationsversuchen bildeten sie Gewebe von Knochen, Muskel, Gehirn, Lunge, Herz, Leber, sowie Gewebe des Gastrointestinal-Traktes, aber auch Zellen des hämatopoetischen Systems. (31)

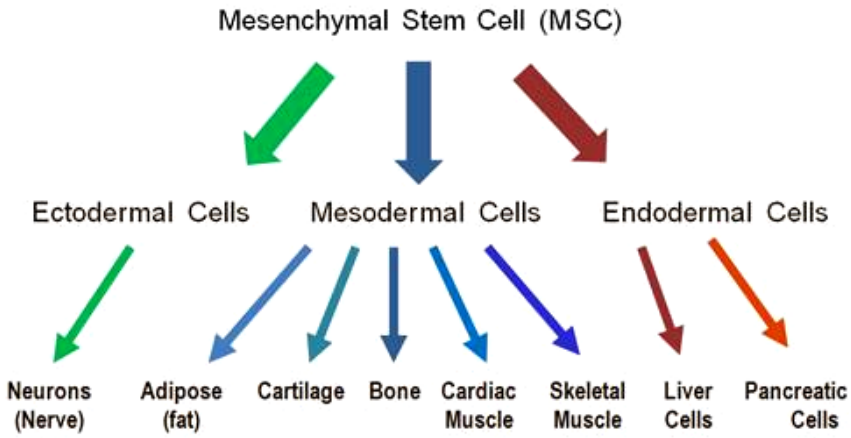


Abb. 4: Differenzierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Gewebe aller drei Keimblätter: MSZ (hier als „Mesenchymal Stem Cell“ bezeichnet) können in verschiedene Gewebe der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm differenzieren. (7)

Die Fähigkeit von Stammzellen, sich je nach umgebendem Stroma zu Zellen eines anderen Organsystems zu entwickeln wird als Stammzell-Plastizität bezeichnet. So können MSZ im Myokard zu Herzzellen reifen, nicht aber in einem anderen Organ wie beispielsweise der Leber. Die Differenzierung von MSZ in ein Zellsystem eines anderen Keimblattes, wie Ekto- oder Endoderm, bezeichnet man als Transdifferenzierung. (45)

Es ist jedoch fraglich, ob die immer wieder beschriebene Transdifferenzierung tatsächlich stattfindet oder ob eine Verunreinigung durch „primitivere“ nicht-hämatopoetische Stammzellen wie beispielsweise den VSELs besteht. Andererseits können – bei hämatopoetischen Stammzellen bewiesen – bereits differenzierte Zellen im Sinne einer Reprogrammierung wieder zu pluripotenten Stammzellen „entdifferenziert“ werden. (56)

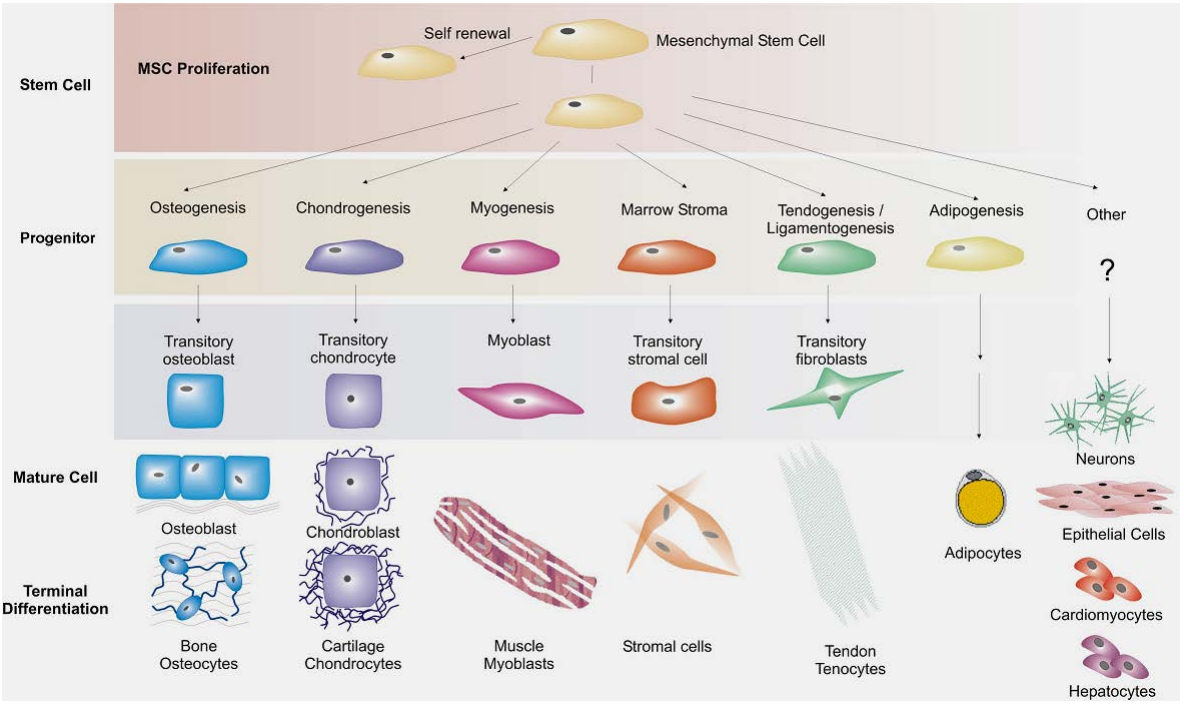


Abb. 5: Differenzierungpotenzial multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ): MSZ sind fähig, sich in eine Anzahl mesenchymaler Gewebe und Zellarten zu differenzieren, einschließlich Knochen, Knorpel, Muskel, Stroma, Sehnen und Fett. Weiterhin wird angenommen, dass sich MSZ zusätzlich in nicht-mesenchymale Gewebe differenzieren können, einschließlich Gewebe von Gehirn, Haut, Herz und Leber. (10)

Da multipotente mesenchymale Stromazellen sowohl im Knochenmark als auch in peripheren Geweben existieren, liegt die Möglichkeit nahe, dass diese Zellen auch im peripheren Blut zu finden sind. (74)

1.2.4. Systemische Mobilisierung

Die Entdeckung multipotenter mesenchymaler Stromazellen in peripherem Blut fand im frühen 20. Jahrhundert statt; zu einem noch früheren Zeitpunkt, als

Friedenstein seine mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark isolierte. Damals schon beobachtete man die vermeintliche Umwandlung von Leukozyten aus dem Blut in Fibroblasten-ähnliche Zellen und deren Weiterentwicklung in fibröses Gewebe. (31)

Multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut, im englischen Sprachgebrauch als „peripheral blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells“ (PBMSC) bezeichnet, sind Zellen, die aus adultem peripheren Blut isoliert werden können. (31)
Ebenso wie MSZ im Knochenmark bilden sie in Kultur heterogene plastik-adhärente Kolonien aus fibroblasten-ähnlichen Zellen, entsprechend den „colony-forming-unit-fibroblast“ (CFU-F), die in Knochenmarkskulturen gefunden werden. (31)

Anfangs wurde vermutet, dass im Blut gefundene MSZ das Ergebnis kontaminierter Blutproben durch Endothelien oder Bindegewebe darstellen. Dieser Verdacht wurde kurz darauf durch Tierversuche mit Kaninchen und Meerschweinchen entkräftet. Es wurden Blutproben einerseits durch mehrere Nadelpunktionen, andererseits durch nur einen Nadeleinstich gesammelt und anschließend die Anzahl der jeweils gebildeten Kolonien aus MSZ aus dem abgenommenen Blut miteinander verglichen. Die Mehrfachpunktionen führten zu keiner Erhöhung der Koloniezahlen multipotenter mesenchymaler Stromazellen, die bei einer Kontamination vermutet worden wäre. (31)

Inzwischen wurden MSZ in peripherem Blut von Meerschweinchen, Kaninchen, Mäuse, Ratten, Hunden und letztendlich auch von Menschen nachgewiesen. Dort sind MSZ aber nur in fast verschwindend geringer Anzahl vorhanden. Während regelmäßig von etwa 5000 – 10 000 kultivierten mononukleären Zellen aus Knochenmarkaspirat eine Kolonie multipotenter mesenchymaler Stromazellen gewonnen werden kann, ist die Ausbeute von MSZ aus peripherem Blut sehr viel geringer. Zudem schwankt die Anzahl von MSZ im peripherem Blut unter den verschiedenen Säugetierarten. Aber auch innerhalb der gleichen Spezies variiert die Zahl beträchtlich. Oftmals können in Blutpräparaten auch gar keine Kolonien

ausfindig gemacht werden. Darüber hinaus ist die Aufrechterhaltung von Kolonien aus peripher kultiviertem Blut sehr schwer. (31)

Allerdings werden MSZ, wie eingangs erwähnt nach Belastung und Verletzungen, sowohl akuter als auch chronischer Art (54) und zusätzlich nach Gabe verschiedener Medikamente sowie nach Injektion knochenmarksmobilisierender Zytokine (z.B. Granulozytenkolonie-stimulierender-Faktor, G-CSF) in höherem Umfang systemisch mobilisiert. (56)
Im Mausmodell sind nach Gewebe- oder Organschäden, sowie nach G-CSF-Gabe etwa fünfmal mehr dieser Zellen im peripheren Blut zu finden als im gesunden Zustand (etwa 100-200 Zellen pro ml). (39)

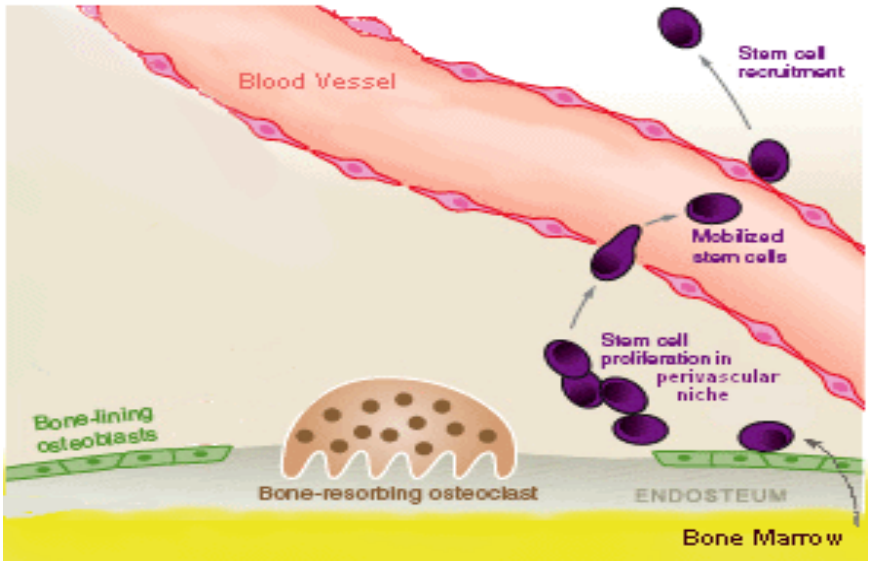


Abb. 6: Stammzellmobilisierung: Unter Normalbedingung sind MSZ nur in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut vorhanden. Nach Trauma und nach Gabe verschiedener Medikamente sowie knochenmarksmobilisierender Stoffe wie G-CSF werden sie in höherem Umfang systemisch mobilisiert. Bei Bedarf werden sie weiter an Orte geschädigten Gewebes rekrutiert. Abbildung modifiziert. (11)

Aus Versuchen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, konnte gezeigt werden, dass im peripheren Blut zirkulierende multipotente mesenchymale Stromazellen in der Lage sind, sich in verschiedene mesenchymale Zelllinien zu differenzieren, darunter in Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, Muskelzellen

und Stromazellen. (31) Zusätzlich konnten MSZ aus peripherem Blut Nervenzellen bilden. (65)
Möglicherweise finden schon in naher Zukunft in geeigneten Patientengruppen *ex vivo*-vermehrte MSZ in Form autologer Transplantation therapeutische Anwendung. (58) Wünschenswert wäre die Übernahme einer entscheidenden Rolle in der regenerativen Medizin durch ihre Beteiligung an Regeneration und Repopulation geschädigter Gewebe. (38, 54)

1.3. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Etablierung eines Nachweises im Blut zirkulierender multipotenter mesenchymaler Stromazellen und deren weitergehender Typisierung und Charakterisierung des Differenzierungspotentials.

Des weiteren sollen der Einfluss der Schwere eines Traumas auf die Anzahl von im Blut nachweisbaren MSZ untersucht werden.
Anhand zweier unterschiedlicher orthopädischer Operationsverfahren mit unterschiedlich altem Patientenkollektiv soll mittels Durchflusszytometrie die Anzahl multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus peripherem Blut sowohl prä- als auch postoperativ bestimmt werden.

Dabei soll gezeigt werden, ob das durch das Operationsverfahren gesetzte Trauma ausreicht, um zu einer Erhöhung der Anzahl von MSZ im peripheren Blut zu führen.

Durch Kultivierung und anschließende Differenzierung soll eine Multipotenz der Stammzellmarker-positiven Zellen nachgewiesen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patientenkollektiv

Für die Durchflusszytometrieanalysen zur Bestimmung der Anzahl mesenchymaler Stammzellen im peripheren Blut sowie für die Kultivierung mesenchymaler Stammzellen aus peripherem Blut wurden je 2 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut ein Tag vor dem geplanten orthopädischen operativen Eingriff, sowie zwei Tage postoperativ asserviert. Die Probenentnahme erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten durch den behandelnden Stationsarzt gemäß den Richtlinien der Ethik-Kommission der Universität Ulm.

Bei den Operationen handelte es sich zum Einen um Umstellungsosteotomien, sogenannte Triple-Osteotomien nach Tönnis und Kalchschmidt (67) bei Patienten mit Hüftpfannendysplasie, zum Anderen um den Einsatz totaler Endoprothesen des Hüftgelenks (HTEP) bei Patienten mit Coxarthrose. Das EDTA-Blut wurde jeweils im Rahmen der Routineblutabnahme morgens auf Station entnommen.

Für die Kultivierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark wurden nach Eröffnung des Markraumes während Triple-Osteotomie-Operationen Knochenmarkaspirate direkt im Operationssaal gewonnen. Diese Entnahme erfolgte nach gesonderter Aufklärung und Zustimmung der Patienten durch den behandelnden Stationsarzt gemäß den Richtlinien der Ethik-Kommission der Universität Ulm.

Zur Etablierung wurde von sechs freiwilligen gesunden Probanden im Alter zwischen 25 und 47 Jahren EDTA-Blut aufbereitet und für FACS-Analysen verwendet.
Tabellen 1 und 2 zeigen eine Spenderübersicht.

Tabelle 1: Patientenkollektiv für Knochenmarkaspirat

Patienten	Geschlecht	Alter	Operation	Verwendung
I	weiblich	22	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
II	männlich	28	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
III	weiblich	28	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie & Differenzierung
IV	weiblich	26	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie & Immunfärbung
V	weiblich	44	Triple-Osteotomie	Immunfärbung
VI	weiblich	26	Triple-Osteotomie	Immunfärbung

Tabelle 2: Patientenkollektiv für periphere Blutproben

Patienten	Geschlecht	Alter	Operation	Verwendung
1	weiblich	18	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
2	weiblich	27	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
3	weiblich	50	HTEP	Durchflusszytometrie
4	weiblich	58	HTEP	Durchflusszytometrie
5	männlich	67	HTEP	Durchflusszytometrie
6	weiblich	72	HTEP	Durchflusszytometrie
7	männlich	63	HTEP	Durchflusszytometrie
8	weiblich	71	HTEP	Durchflusszytometrie
9	weiblich	44	HTEP	Durchflusszytometrie
10	weiblich	59	HTEP	Durchflusszytometrie
11	männlich	80	HTEP	Durchflusszytometrie
12	weiblich	13	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
13	weiblich	12	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
14	weiblich	14	Triple-Osteotomie	Durchflusszytometrie
15	männlich	63	HTEP	Kultivierung
16	weiblich	23	Triple-Osteotomie	Kultivierung
17	weiblich	46	Triple-Osteotomie	Kultivierung
18	männlich	80	HTEP	Kultivierung mit Differenzierung
19	weiblich	22	Triple-Osteotomie	Kultivierung mit Differenzierung
20	weiblich	44	HTEP	Kultivierung mit Differenzierung

2.1.2. FACS-Antikörper und Isotypkontrollen

Tabelle 3: Liste der verwendeten FACS-Antikörper

▪ CD 2, FITC Mouse Anti-Human (Clone: RPA-2.10) ▪ CD 9, FITC Mouse Anti-Human (Clone: M-L13) ▪ CD 45, FITC Mouse Anti-Human (Clone: HI30) ▪ CD 73, PE Mouse Anti-Human (Clone: AD2) ▪ CD 166, PE Mouse Anti-Human (Clone: 3A6) ▪ CD 235a, FITC Mouse Anti-Human (Clone: 6A-R2) ▪ CD 271, PE Mouse Anti-Human (Clone: C40-1457)	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
▪ CD 73, APC Anti-Human (Clone: AD2)	eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA
▪ CD 133/1, APC Mouse Anti-Human (Clone: AC133)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
▪ MSCA-1, APC Anti-Human (Clone: W8B2) ▪ STRO-1, Alexa Fluor® 647 Anti-human (Clone: STRO-1)	Bio Legend, Uithoorn, Niederlande

Tabelle 4: Liste der verwendeten Isotypkontrollen

▪ IgG_1, κ, APC Mouse (Clone: MOPC-21) ▪ IgG_1, κ, FITC Mouse (Clone: MOPC-21) ▪ IgG_1, κ, PE Mouse (Clone: MOPC-21)	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland

▪ IgG_{2b}, κ, FITC Mouse (Clone: MPC-11)	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
▪ IgM, κ, Alexa Fluor® 647 Mouse (Clone: MM-30)	Bio Legend, Uithoorn, Niederlande

2.1.3. Chemikalien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien

▪ AEC Chromogen-Substrat (ready to use) ▪ Biotinilierter Brücken-Antikörper ▪ Blocking Reagent ▪ DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components ▪ Streptavidin	Dako Corporation Cytomation Gmbh, Hamburg, Deutschland
▪ Aluminiumsulfat ▪ Kaiser's Glyceringelatine ▪ Pyrogallol ▪ Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
▪ Ampuwa® Spüllösung Aqua ad iniectabilia	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
▪ Ascorbinsäure -2-Phosphat ▪ Kernechtrot	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
▪ Biocoll Separating Solution (Density 1,077 g/ml) ▪ Dulbecco's modified Eagle Medium low glucose (DMEM) (1,0 g/l D-Glucose ohne L-Gutamin) ▪ Fetales Kälberserum (FKS) ▪ L-Glutamin (200mM) ▪ Penicillin/Streptomycin (10000 U/ 10000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

▪ Trypsin/ EDTA Solution (0,05%/0,02%)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
▪ CASY®clean ▪ CASY®ton isotone Salzlösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
▪ Dexamethason ▪ Formalin nach Lillie ▪ ß-Glycerophosphat ▪ Indomethacin ▪ Isobutylmethylxanthin (IBMX) ▪ Mayer's Hämatoxylin ▪ Oil Red O	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
▪ Dimethylsulfoxid (DMSO) ▪ Silbernitrat	Carl Roth GmbH & CO, Karlsruhe, Deutschland
▪ Dulbecco's Phosphat buffered Saline ohne Ca^{2+}&Mg^{2+}(1x) (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
▪ Isopropanol 99% ▪ Methanol, Fassware	Ölfabrik Schmidt, Ulm, Deutschland
▪ Wasserstoffperoxid 30%	J.T.Baker, Deventer, Niederlande

2.1.4. Geräte

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte

▪ Autoklav	Tuttnauer Europe b.v., Breda, Niederlande
▪ CO_2 - Brutschrank Cytoperm ▪ Sterilbank Hera Safe ▪ Zentrifuge Heraeus 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
▪ Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
▪ Gefrierschrank – 80°C, Modell U85-360	Labotect, Güttingen, Deutschland

▪ Kamera Axio Cam MRc ▪ Mikroskop Axioskop 2 mot plus ▪ Mikroskop Axiovert 35	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
▪ Kamera EOS 300D	Canon, Krefeld, Deutschland
▪ Kühl-Gefrier-Kombination premium nonfrost	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
▪ Schüttelwasserbad GFL-1083	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
▪ Vortexer	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
▪ Waage Precisa 400 M	Altenrath GmbH, Wuppertal, Deutschland
▪ Zellzähler und Analysesystem Casy®1	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
▪ Zentrifuge Allegra™ 64R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Liste der Verbrauchsmaterialien

▪ 4-well Culture Slide ▪ 6-well Zellkulturplatte ▪ 12-well Zellkulturplatte ▪ Petrischalen ▪ Polystyrol Röhrchen 5 ml ▪ Zentrifugenröhrchen 15ml ▪ Zentrifugenröhrchen 50ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
▪ Cryo.s™ Einfrierröhrchen ▪ Zentrifugenröhrchen 14ml	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
▪ Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
▪ Pipetten Discovery Comfort (2 µl - 20 µl)	ABIMED GmbH, Langenfeld, Deutschland

▪ Pipetten Discovery Comfort (20 µl - 200 µl) ▪ Pipetten Discovery Comfort (100 µl - 1000 µl) ▪ Pipettenspitzen TF-20 Maxymum Recovery ▪ Pipettenspitzen TF-200 Maxymum Recovery ▪ Pipettenspitzen TF-1000 Maxymum Recovery	ABIMED GmbH, Langenfeld, Deutschland
▪ Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
▪ Serologische Pipette Costar® 1 ml ▪ Serologische Pipette Costar® 5 ml ▪ Serologische Pipette Costar® 10 ml	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
▪ Standard Reaktionsgefäß 3810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.6. Zellkulturmedien

Basalmedium (Vollmedium):

500 ml Dulbecco's modified Eagle Medium low glucose (1 g/l) (DMEM)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 10% hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (FKS)

Nach jeweils 7 Tagen wurde frisches L-Glutamin (1%) in das Medium gegeben. Das Basalmedium wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

Adipogenes Differenzierungsmedium:

500 ml Dulbecco's modified Eagle Medium low glucose (1 g/l) (DMEM)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 10% hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (FKS)

+ 0,5 µM Dexamethason
+ 0,5 µM Isobutylmethylxanthin (IBMX)
+ 50 µM Indomethacin

Das adipogene Differenzierungsmedium wurde nach Herstellung in Aliquots zu 50 ml abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C eingefroren.

Osteogenes Differenzierungsmedium:

500 ml Dulbecco's modified Eagle Medium low glucose (1 g/l) (DMEM)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
+ 10% hitzeinaktiviertes Fetales Kälberserum (FKS)
+ 50 µg/ml Ascorbinsäure-2-Phosphat
+ 200 µg/ml ß-Glycerophosphat
+ 100 nM Dexamethason

Das osteogene Differenzierungsmedium wurde ebenfalls nach Herstellung in Aliquots zu 50 ml abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C eingefroren.

Hitzeinaktivierung des FKS:

Die Hitzeinaktivierung des FKS erfolgte bei 56 °C für 30 Minuten. Dafür wurde gefrorenes FKS über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und am nächsten Tag hitzeinaktiviert. Anschließend wurden Aliquots von 50 ml portioniert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.

2.1.7. Computerprogramme

Tabelle 8: Liste der verwendeten Computerprogramme

▪ Axiovision Version 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
▪ BD CellQuest™ Pro Version 5	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
▪ EndNote Windows Version X (10.0.2)	Thomson ResearchSoft, San Francisco, CA, USA
▪ Zoom Browser Ex, Version 4.5.1.148	Canon GmbH, Fichtenhain, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung und Kultivierung aus Knochenmarkaspirat

Die Isolation von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) aus Knochenmark erfolgte durch Dichtegradientzentrifugation und Selektion über Plastikadhärenz. (57) Dafür wurde ein Biocoll-Dichtegradient der Dichte 1,077 g/ml aus 6 ml Biocoll-Lösung hergestellt. Der Gradient bildete sich in einem 14 ml Zentrifugenröhrchen durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C bei 13 500 g in der Allegra™ 64R Zentrifuge aus. Er konnte bis zur weiteren Verwendung ein paar Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Das gewonnene Knochenmarkaspirat wurde in einer Petrischale im Verhältnis 1:1 mit Basalmedium verdünnt und durch mehrfaches Resuspendieren gut durchmischt. Jeweils 4 ml des Aspirat-Medium-Gemisches wurden vorsichtig auf den vorbereiteten Biocoll-Dichtegradienten geschichtet. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 4°C und 600 g in der Allegra™ 64R Zentrifuge aufgetrennt. Nach Zentrifugation wurde der Buffy-Coat, die Bande der kernhaltigen Zellen, abgenommen und zusammen mit 10 ml Basalmedium in eine 75 cm^2 -Zellkulturflasche überführt.

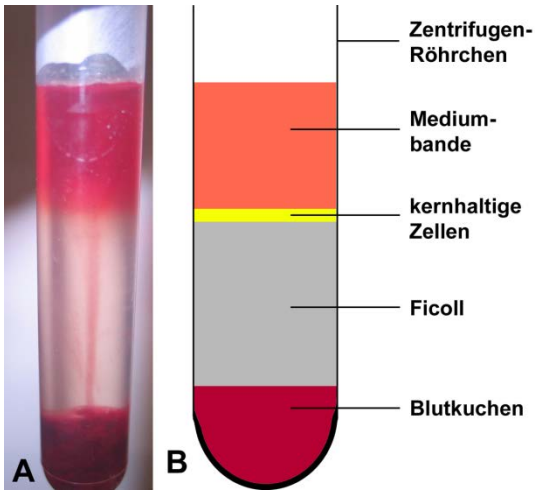


Abb. 7: Isolierung kernhaltiger Zellen aus Knochenmarkaspirat durch Dichtegradientzentrifugation:
A: Biocoll-Röhrchen nach Zentrifugation. B: Schematische Darstellung der einzelnen Schichten innerhalb des Röhrchens. Die kernhaltigen Zellen wurden mit einer serologischen Pipette abgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. (32)

Die abgenommenen Zellen wurden über Nacht bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte im Brutschrank kultiviert.
Am Folgetag wurden die nicht adhärent gewordenen Zellen durch zweimaliges Waschen mit Dulbecco's Phosphat buffered Saline (PBS) abgenommen. Es wurde erneut 10 ml frisches Basalmedium zugegeben. Alle 3 Tage wurde das Basalmedium erneuert.

2.2.2. Isolierung und Kultivierung aus peripherem Blut

Wiederum erfolgte die Separation der multipotenten mesenchymalen Stromazellen mittels Dichtegradientzentrifugation und Selektion über Plastikadhärenz.

Über den, wie im Abschnitt „Isolierung und Kultivierung aus Knochenmarkaspirat" beschriebenen, vorbereiteten Biocoll-Dichtegradienten (Dichte 1,077 g/ml) wurde 2 ml unverdünntes EDTA-Blut gegeben. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Minuten bei 4°C und 600 g in der Allegra™ 64R Zentrifuge.

Die kernhaltige Zellbande wurde abgenommen und in ein 50ml - Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde bis zur 5 ml Marke mit Basalmedium aufgefüllt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen für 15 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur in der Zentrifuge Heraeus 1.0 zentrifugiert.

Der Überstand wurde durch Abkippen entfernt. Das entstandene Zellpellet wurde in 2 ml Basalmedium resuspendiert.

Die resuspendierten Zellen wurden in eine Vertiefung einer 12-well Zellkulturplatte gegeben und bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte im Brutschrank kultiviert. Nach fünf Tagen zeigten sich die ersten spindelförmigen Zellen. Diese wurden zum Teil nach 15 Tagen in Kultur immunhistochemisch gefärbt. Die restlichen Zellen wurden für osteogene und adipogene Differenzierungen verwendet.

2.2.3. Zellpassagierung und Zellzahlmessung

Um eine Differenzierung der multipotenten mesenchymalen Stromazellen zu vermeiden sowie die weitere Proliferation zu ermöglichen, wurde bei Konfluenz der Zellen von etwa 75% passagiert.

Die Konfluenz wurde mikroskopisch an einem Zeiss Axiovert 35 bestimmt.
Nach zweimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Passagierung der Zellen durch eine Trypsin/ EDTA Lösung (0,05% / 0,02%).

Nach 6 min Inkubation in der Trypsin/ EDTA Lösung im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte waren nahezu 100% der Zellen gelöst. Nach optischer Kontrolle erfolgte die Inaktivierung der Trypsin/EDTA Lösung durch Zugabe von Basalmedium. Dabei wurden für 1 ml Trypsin/EDTA Lösung 2 ml Basalmedium verwendet.

Die Zellsuspension wurde abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen gebracht. 100 µl der Zellsuspension wurden für eine Zellzahlbestimmung mit dem Zellzähler Casy®1 entnommen. Die Zellzählung wurde dabei wie folgt durchgeführt. Je 100 µl eines Aliquots einer Zellsuspension wurden in 10 ml einer isotonen Salzlösung, der CASY®ton-Lösung, gebracht. Vor Beginn der Probenmessung wurde der Zellzähler Casy®1 mit reiner CASY®ton-Lösung geeicht. Danach wurde die Zellsuspension gemessen. Gemessen wurde ab einer Zellgröße von 9 µm. Das Ergebnis wurde als Zellen pro ml Flüssigkeit angegeben. Die Probe wurde anschließend verworfen.

Das Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension wurde für 15 min bei 1000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur in der Zentrifuge Heraeus 1.0 zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml Basalmedium resuspendiert und zur weiteren Proliferation erneut im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte kultiviert. Es wurden etwa 2000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Alle 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Zuvor wurde zweimal mit PBS gespült, um eventuell angefallenen Zellschrott zu entfernen. Danach wurde frisches Basalmedium zu den Zellen gegeben.

2.2.4. Einfrieren und Auftauen

Wurden die kultivierten multipotenten mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmarkaspirat zum jeweiligen Zeitpunkt nicht mehr benötigt, wurden sie in Stickstoff eingefroren und auf diesem Weg haltbar gemacht.

Dafür wurden die kultivierten MSZ wie im Kapitel „Zellpassagierung und Zellzahlmessung“ beschrieben, mit Trypsin/ EDTA Lösung (0,05% / 0,02%) abgelöst, mit Casy®1 die Zellzahl bestimmt und anschließend für 15 min bei 1000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur in der Zentrifuge Heraeus 1.0 zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen die Einfrierlösung vorbereitet. Die Lösung bestand aus Basalmedium, welches mit 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt wurde. Mit 1 ml der Einfrierlösung konnten bis zu 5 Mio Zellen eingefroren werden.

Der Überstand der zentrifugierten Zellen wurde verworfen, das Zellpellet wurde je nach Zellzahl in der entsprechenden Menge an Einfrierlösung resuspendiert. Die Suspension wurde in Cryoröhrchen gegeben. Diese wurden für 24 Stunden in die gasförmige Phase eines Stickstoffbehälters gegeben. Nach einem Tag wurden die Röhrchen in die flüssige Phase des Stickstoffbehälters gebracht. Hier konnten die multipotenten mesenchymalen Stromazellen für längere Zeit aufbewahrt werden.

Zum Auftauen wurde das in Stickstoff gefrorene Cryoröhrchen in ein 37°C-Wasserbad überführt. In der Zwischenzeit wurde 10 ml Basalmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Sobald das letzte Eisklümpchen im Cryoröhrchen geschmolzen war, wurde die aufgetaute Zellsuspension rasch in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen gebracht. Das Gemisch wurde gut resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur in der Zentrifuge Heraeus 1.0 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Basalmedium resuspendiert und zur Kultivierung in ein geeignetes Kulturgefäß überführt.

2.2.5. Zellfärbungen

Histologisch:

a. Adipogene Differenzierung und Färbung mit Oil Red

Um die adipogene Differenzierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen zu starten wurde Basalmedium durch adipogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Alle 3 Tage wurde das Differenzierungsmedium erneuert. Sobald sich nach optischer Kontrolle mit dem Mikroskop Axiovert 35, Adipozyten mit den zugehörigen lipidgefüllten Vakuolen ausgebildet hatten, wurden die Lipide mit Oil Red angefärbt.

Für die Herstellung einer Oil Red-Färbelösung wurden 0,5 g Oil Red O in 100 ml 99% Isopropanol gelöst.

24 h vor der Färbung wurde die Oil Red-Färbelösung mit Aqua destillata im Verhältnis 3:2 gemischt und bei Raumtemperatur abgedeckt aufbewahrt.
Kurz vor der Färbung wurde die Oil Red-Färbelösung filtriert.

- Adipogenes Differenzierungsmedium wurde abpipettiert
- Mit Dulbecco's PBS 2 Mal gespült
- Für 2 Minuten mit 4 % Formalin nach Lilie fixiert
- Mit Aqua destillata gespült
- Für 5 Minuten mit 60 % Isopropanol bedeckt
- Für 10 Minuten mit der frisch filtrierten, verdünnten Oil Red-Färbelösung gefärbt
- Mit 60 % Isopropanol gespült
- Mit Aqua destillata gespült
- Für 10 Minuten mit Mayer's Hämatoxylin die Zellkerne gefärbt
- Mit Aqua destillata gespült
- Für 10 Minuten mit normalem Leitungswasser gebläut
- In Kaiser's Glyceringelatine eingebettet
- Mit Deckglas abgedeckt

Mit dieser Färbemethode wurden Lipide durch das Oil Red kräftig rot gefärbt, die Zellkerne färbten sich durch Mayer's Hämatoxylin blau.

b. Osteogene Differenzierung und Färbung mit der Silbermethode nach von Kossa

Entsprechend der adipogenen Differenzierung wurde durch Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium die osteogene Differenzierung gestartet. Der Mediumwechsel fand wieder alle 3 Tage statt. Sobald sich die multipotenten mesenchymalen Stromazellen in Osteoblasten differenziert hatten, konnten die in der Knochenmatrix entstandenen Mineralisationen mit der Silbermethode nach von Kossa angefärbt werden.

Herstellung der Silbernitratlösung:
5 g $AgNO_3$ wurden in 100 ml Aqua destillata gelöst.
Die Silbernitratlösung konnte abgedichtet im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Herstellung der Pyrogalluslösung:
1 g Pyrogallol wurde in 100 ml Aqua destillata gelöst.
Die Pyrogalluslösung musste immer frisch angesetzt werden.

Herstellung der Natriumthiosulfatlösung (= Fixiernatrium):
5 g Natriumthiosulfat Pentahydrat wurden in 100 ml Aqua destillata gelöst. Auch diese Lösung musste frisch hergestellt werden.

Herstellung der Kernechtrot–Aluminiumsulfat–Färbelösung:
5 g Aluminiumsulfat wurden in 100 ml Aqua destillata gelöst. Die Aluminium-sulfatlösung wurde erhitzt und 0,1 g Kernechtrot so lange eingerührt, bis sich der Farbstoff vollständig gelöst hatte. Die Färbelösung musste erkalten und kurz vor der Färbung filtriert werden.

- Osteogenes Differenzierungsmedium wurde abpipettiert
- Mit Dulbecco's PBS 2 Mal gespült
- Für 15 Minuten mit Methanol fixiert
- Mit 5 %iger Silbernitratlösung bedeckt und für 60 Minuten in den Kühlschrank

gestellt

- Mit Aqua destillata gespült
- Für 10 Minuten mit 1 %iger Pyrogalluslösung bedeckt
- Mit Aqua destillata gespült
- Für 5 Minuten mit 5 %iger Fixiernatronlösung bedeckt
- Mit Aqua destillata gespült
- Für 10 Minuten mit der Kernechtrot–Aluminiumsulfat–Färbelösung bedeckt
- Mit Aqua destillata gespült
- In Kaiser's Glyceringelatine eingebettet
- Mit Deckglas abgedeckt

Mit dieser Färbemethode ließen sich mit Kernechtrot Zellkerne rot anfärben. Mineralisationen, die bei der Osteogenese in der Knochenmatrix entstanden, wurden schwarz gefärbt.

Immunhistochemisch:

Herstellung der Primärantikörper - Lösung:
Für die verwendeten 4-well Culture Slides mit einer Grundfläche von je 1,7 cm^2 pro Vertiefung wurden je 300 µl eines Gemisches aus dem jeweils gewünschten Primärantikörper und von DAKO Antikörper Diluent benötigt. Hergestellt wurde das Gemisch im Standard Reaktionsgefäß 3810 der Firma Eppendorf.

Nur die Antikörper Anti-Human CD9, Anti-Human CD45, Anti-Human CD166 und Anti-Human Stro-1 standen als speziell immunhistochemische Antikörper für die Färbung zur Verfügung. Für die immunhistochemische Färbung der restlichen Antikörper wurden diejenigen Antikörper verwendet, die auch für die Durchflusszytometrie benutzt wurden. Diese funktionierten genauso gut. Sie mussten nur in einem anderen Verdünnungsverhältnis angewandt werden.

Verdünnungsverhältnis für Antikörper speziell für die Immunhistochemie:
Der jeweilige Primärantikörper und DAKO Antikörper Diluent wurden im Verhältnis 1:100 verdünnt. Um 300 µl des Gemisches herzustellen, wurden 3 µl Primärantikörper und 297 µl DAKO Antikörper Diluent benötigt.

Verdünnungsverhältnis für Antikörper für die Durchflusszytometrie:
Der jeweilige Primärantikörper und DAKO Antikörper Diluent wurden im Verhältnis 1:14 gemischt. Es wurden jeweils 20 µl Primärantikörper und 280 µl DAKO Antikörper Diluent verwendet. Tabelle 9 zeigt die verwendeten Antikörper.

Tabelle 9: Aufgeführt sind die verwendeten Primärantikörper (AK). Außerdem wurde zwischen Primärantikörpern speziell für die Immunhistochemie, sowie für Immunhistochemie als auch Durchflusszytometrie unterschieden.

	AK speziell für Immunhistochemie	AK für Immunhistochemie & Durchflusszytometrie
Anti-Human CD 2		X
Anti-Human CD 9	X	
Anti-Human CD 45	X	
Anti-Human CD 73		X
Anti-Human CD 133/1		X
Anti-Human CD 166	X	
Anti-Human CD 235a		X
Anti-Human CD 271		X
Anti-Human MSCA-1		X
Anti-Human Stro-1	X	

- Nährmedium wurde abpipettiert
- Mit Dulbecco's PBS 3 Mal gespült
- Für 3 Minuten mit 4 % Formalin nach Lilie fixiert
- Mit Dulbecco's PBS 3 Mal gespült
- Mit Aqua ad iniectabilia 3 Mal gespült
- Für 15 Minuten in 3 % H_2O_2 inkubiert
- Mit Aqua ad iniectabilia 3 Mal gespült
- Mit Dulbecco's PBS 3 Mal gespült
- Für 15 Minuten mit Blocking Reagent (DAKO) bedeckt, danach abgekippt
- Primär Antikörper / DAKO AK Diluent Gemisch wurde dazugeben und für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert
- Mit Dulbecco's PBS 3 Mal gespült
- Für 15 Minuten mit biotinilliertem Brücken- Antikörper bedeckt
- Mit Dulbecco's PBS 3 Mal gespült
- Für 15 Minuten mit Streptavidin (DAKO) bedeckt
- Mit Dulbecco's PBS 3 Mal gespült
- Für 10 Minuten mit AEC Chromogen – Substrat (DAKO) bedeckt
- Mit Aqua ad iniectabilia gespült

- Für 10 Minuten mit Mayer's Hämatoxylin die Zellkerne gefärbt
- Mit Aqua ad iniectabilia gespült
- Für 10 Minuten mit normalem Leitungswasser gebläut
- In Kaiser's Glyceringelatine eingebettet
- Mit Deckglas abgedeckt

2.2.6. Durchflusszytometrie

Messtechnik:

Die Methode der Fluoreszenz-basierten Duchflusszytometrie wurde 1968 von Wolfgang Göhde entwickelt. (4)
Mittlerweile findet diese recht einfache, effiziente Technik in Routinediagnostiken der Hämatologie, Infektiologie, Immunologie und für Forschungszwecke Verwendung. Die Methode der Durchflusszytometrie wird auch als FACS-Analyse, das Gerät als FACS-Gerät oder einfach nur FACS bezeichnet. Die Abkürzung steht für „fluorescence activated cell sorting", auch wenn an sich primär keine Zellsortierung stattfindet. Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson. Messgeschwindigkeiten bis zu 4000 Zellen pro Sekunde sind damit möglich.



Abb. 8: FACSCalibur™: Ein Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson. (2)

Funktionsweise des FACSCalibur:

Die in einer Zellsuspension befindlichen, zu messenden Zellen, werden durch eine Kapillare in die Messküvette gesaugt. Durch eine zusätzliche Trägerflüssigkeit, die die Zellsuspension umhüllt (Hüllstrom), wird eine gleichmäßige laminare Strömung erzeugt. Durch Verringerung des Querschnitts innerhalb der Messküvette wird sowohl die Zellsuspension wie auch der Hüllstrom derart beschleunigt, dass sich die Zellen vereinzeln. Die beiden Strömungen werden dabei aber nicht miteinander vermischt.

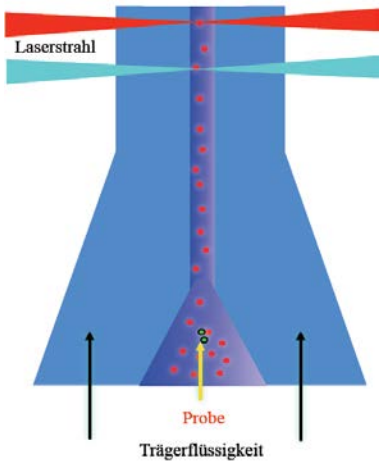


Abb. 9: Messküvette eines Durchflusszytometers: Die Trägerflüssigkeit um die Probe erzeugt eine laminare Strömung. Durch Querschnittsverringerung innerhalb der Messküvette wird die Strömung beschleunigt und so die Zellen vereinzelt. Am Ende der Messküvette passieren die Zellen einzeln die Laserstrahlen. (62)

Am Ende der Messküvette befinden sich zwei Laser. Ein Argon-Laser (488 nm, blau) und ein Dioden-Laser (635 nm, rot). Jede Zelle passiert einzeln den Laserstrahl und wird durch das ausgesendete monochromatische Licht derselben Wellenlänge angeregt. Insofern ist es wichtig, dass sich einzelne Zellen und keine Zellklumpen in der Zellsuspension befinden.

Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht:

Anschließende Detektoren können das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht, welches durch Zellgröße und Zelldichte entsteht, bestimmen. (62)

Das Vorwärtsstreulicht, der „Forward Scatter“ (FSC) wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen. Der Detektor befindet sich somit in einer Linie mit dem Laserstrahl. Durch die Lichtbeugung kann die Zellgröße und Gestalt der analysierten Zelle bestimmt werden. (62)

Mit dem Seitwärtsstreulicht, dem „Side Scatter“ (SSC) wird im 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen. Der Detektor steht dabei senkrecht zum Laserstrahl. Mit ihm kann durch die jeweilige Lichtbrechung und Reflexion die Größe und Struktur des Zellkerns und die Granularität der einzelnen Zelle bestimmt werden. (62)

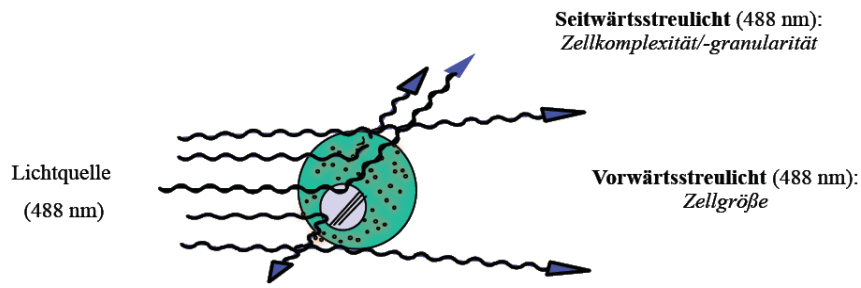


Abb. 10: Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht: Das Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße) während das Seitwärtsstreulicht proportional zur Zellgranularität bzw. Komplexität des Zellinneren ist. Das Vorwärtsstreulicht wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen, das Seitwärtsstreulicht senkrecht zum einfallenden Licht. (62)

Färbungen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern:

Verschiedene Stammzellarten besitzen verschiedene spezifische Oberflächen-merkmale, sogenannte „Clusters of Differentiation“ (CD) auf ihrer Zelloberfläche anhand derer sie indentifiziert werden können. (25)
Durch Anfärbung dieser Oberflächenmoleküle mit Fluoreszenz-markierten Anti-körpern, die vor der Messung der Zellsuspension zugegeben werden, können unterschiedliche Zellarten noch genauer differenziert werden. Dafür stehen eine Reihe an unterschiedlichen fluoreszierenden Farben, sogenannten Fluoro-chromen, zur Verfügung.

Jedes Fluorochrom besitzt ein bestimmtes Absorptionsmaximum, d.h. kann Licht einer bestimmten Wellenlänge besonders gut absorbieren und somit angeregt

werden. Wenn das Absorptiumsmaximum einer speziellen Fluoreszenzfarbe und die von einem Laser ausgesendete Wellenlänge gleich oder zumindest sehr ähnlich ist, kann das jeweilige Fluorochrom optimal angeregt werden. Eine Liste der verwendeten Fluorochrome findet sich in Tabelle 10. (3)

Tabelle 10: Eingesetzte Fluorochrome: Die verschiedenen Fluorochrome sind in der jeweiligen Farbe ihres emittierten Lichtes unterlegt. APC und Alexa Fluor emittieren Licht einer ähnlichen Wellenlänge und werden von demselben Detektor erkannt. Die 2 Fluorochrome können nicht zusammen verwendet werden. FITC und PE werden durch den blauen Argonlaser, APC und AlexaFluor647 durch den roten Diodenlaser angeregt. Das kann anhand der Absorptionsmaxima erkannt werden. (3)

Fluorochrom	Abkürzung	Absorptionsmaximum	Laser	Emmisionsmaximum
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	494	Argonlaser (488 nm)	519
Phycoerythrin	PE	496	Argonlaser (488 nm)	578
Allophycocyanin	APC	650	Diodenlaser (635 nm)	660
Alexa Fluor 647	-	650	Diodenlaser (635 nm)	668

Durch die beiden Laser können Fluorochrome mit unterschiedlichen Absorptions-maxima in der gleichen Messung angeregt werden.

Je nach Fluorochrom wird das absorbierte Laserlicht in unterschiedlicher Wellenlänge wieder abgegeben. Das FACSCalibur besitzt zusätzlich zu den zwei Detektoren für FSC und SSC vier Detektoren, die das emittierte Licht der Fluoreszenzfarben wahrnehmen. So können mit dem FACSCalibur bis zu vier verschiedene Fluoreszenz-markierte Antikörper pro Messung verwendet werden. Mehrere Oberflächenmoleküle einer einzigen Zelle können dabei gleichzeitig bestimmt werden, was die Differenzierung der einzelnen Zellen nochmals verbessert. Die verwendeten Antikörper gegen MSZ-Oberflächenmarker sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Färbungen werden, ebenso wie der SSC, im 90° Winkel gemessen. (62)

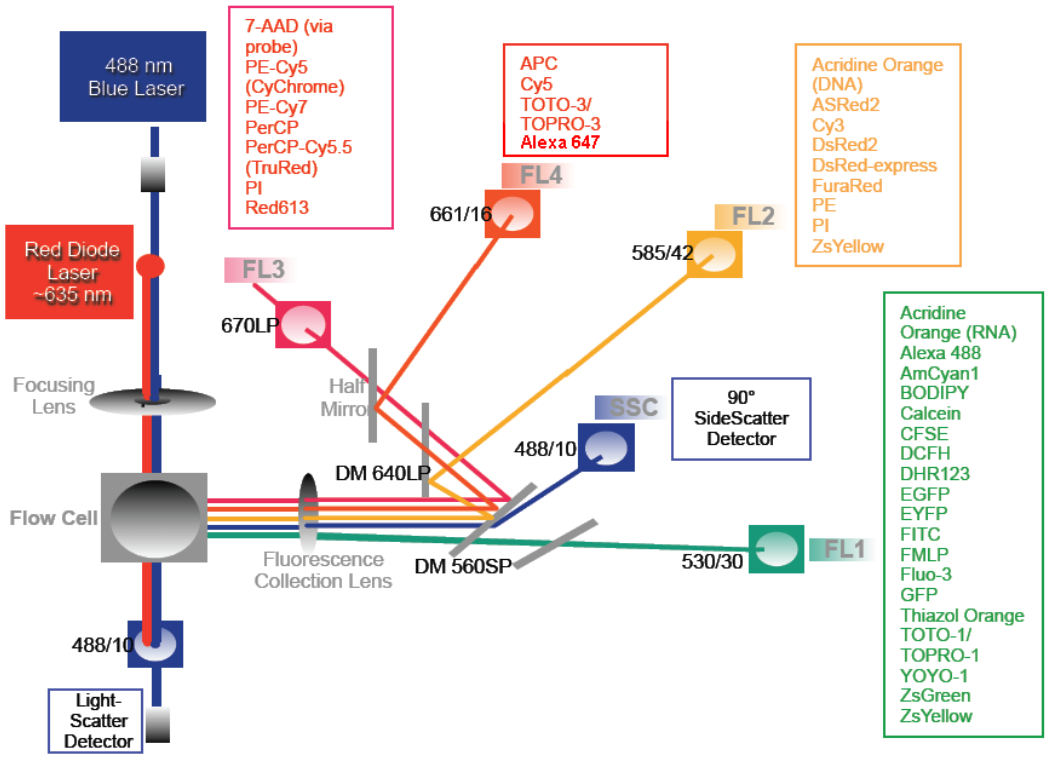


Abb. 11: Optisches System des Durchflusszytometers FACSCalibur™: Die zu messende Zellsuspension wird auf ihrem Weg durch die Messküvette (Flow Cell) von zwei verschiedenen Lasern angeregt. Einem Dioden-Laser (635 nm, rot) und einem Argon-Laser (488 nm, blau). Die anschließend von den Zellen emittierte Wellenlänge wird vom Forward Scatter (hier als Light-Scatter Detector bezeichnet) in einer Achse zu den zwei Lasern wahrgenommen. Der Side Scatter sowie die Detektoren FL1 bis FL4 befinden sich senkrecht zu den Lasern. Die Detektoren FL1 bis FL4 nehmen die Fluoreszenzfarben wahr. Eingerahmt befinden sich eine Anzahl von Fluorochromen, die vom jeweiligen Detektor erkannt werden. Zusätzliche Linsen (Lens) fokussieren und lenken das Licht zu den optischen Detektoren. (62)

Schließlich wandelt das Durchflusszytometer die optischen Signale in Form ausgesendeter Photonen in elektronische Signale (Spannungsimpulse) um. Die elektronischen Signale werden digitalisiert und zur nachfolgenden Analyse an den angeschlossenen Computer übermittelt.

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist so der Erhalt vieler verschiedener Informationen über die einzelne Zelle, sowohl im Hinblick auf ihre physische wie auch ihre chemische Struktur möglich. (4)

Durchflusszytometrische Analyse:

Für Messungen von kultivierten multipotenten mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmarkaspirat mit dem Durchflusszytometer, wurden die Zellen wie im Abschnitt “Zellpassagierung und Zellzahlmessung“ beschrieben, abgelöst. Die Zellen wurden nach Zentrifugation in der Zentrifuge Heraeus 1.0 gemäß nachfolgendem Schema für die FACS-Analyse mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt.

Für die Bestimmung der Anzahl mesenchymaler Stammzellen aus dem peripheren Blut musste die Verarbeitung und anschließende Analyse der Zellen am Tag der Blutabnahme erfolgen. Sonst wurden keine guten Ergebnisse mehr erzielt.

Entsprechend der unter „Isolierung und Kultivierung aus peripherem Blut“ beschriebenen Methode, wurden 2 ml unverdünntes EDTA-Blut vorsichtig über 6 ml vorbereiteten Biocoll-Dichtegradient (Dichte 1,077 g/ml) gegeben. Die Auftrennung der Blutbestandteile erfolgte wiederum für 30 Minuten bei 4°C und 600 g in der Allegra™ 64R Zentrifuge.

Die kernhaltige Zellbande wurde abgenommen und in ein 50 ml - Zentrifugen-röhrchen gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde bis zur 10 ml Marke mit PBS aufgefüllt. 100 µl des Zell-PBS-Gemisches wurden für die Zellzählung mit Casy®1 entnommen. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen für 15 Minuten bei 1000 U/min in der Zentrifuge Heraeus 1.0 abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet wurde in 800 µl PBS resuspendiert.

Die Suspension wurde auf 8 Polystyrol-Röhrchen aufgeteilt. Das ergab je 100 µl Gemisch pro Röhrchen. Antikörper und dazugehörige Isotypkontrollen wurden nach folgendem Schema hinzupipettiert:

Tabelle 11: Pipettierschema

Polystyrol-Röhrchen	FITC-markiert	PE-markiert	APC-markiert	Alexa-Fluor 647-markiert
Isotypkontrollen				
I_I	10 µl Mouse IgG_1, κ	10 µl Mouse IgG_1, κ	5 µl Mouse IgG_1, κ	
II_I	6 µl Mouse IgG_1, κ & 3 µl Mouse IgG_{2b}, κ	10 µl Mouse IgG_1, κ	5 µl Mouse IgG_1, κ	
III_I	10 µl Mouse IgG_1, κ	10 µl Mouse IgG_1, κ		3 µl Mouse IgM, κ
AK-Kombinationen				
I_{AK}	10 µl Anti-Human CD 9	10 µl Anti-Human CD 73	5 µl CD Anti-Human 133/1	
II_{AK}	10 µl Anti-Human CD 9	10 µl Anti-Human CD 166	5 µl Anti-Human MSCA-1	
III_{AK}	10 µl Anti-Human CD 9	10 µl Anti-Human CD 166	5 µl Anti-Human CD 73	
IV_{AK}	3 µl Anti-Human CD 2 & 3 µl Anti-Human CD 45 & 3 µl Anti-Human CD 235a	10 µl Anti-Human CD 166	5 µl Anti-Human CD 73	
V_{AK}	10 µl Anti-Human CD 9	10 µl Anti-Human CD 271		5 µl Anti-Human Stro-1

Die für multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut positiven Oberflächenmarker waren Anti-Human CD 9, Anti-Human CD 73, Anti-Human CD 133/1, Anti-Human CD 166, Anti-Human CD 271, Anti-Human MSCA-1 und Anti-Human Stro-1.

Tabelle 12: Biologische Funktion der verwendeten Oberflächenmarker

Oberflächenmarker	Biologische Funktion
CD 2	Lymphocyte Function-associated Antigen-2 (LFA-2) (60)
CD 9	Mitglied der Transmembran-4 Superfamilie (9)
CD 45	Leukocyte Common Antigen (LCA) (74)
CD 73	Ekto-5'-Nukleotidase (68)
CD 133/1	Prominin-1 (28)
CD 166	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) (5)
CD 235a	Glykophorin A (8)
CD 271	Nerve Growth Factor Receptor (NGFR) (6)
MSCA-1	Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) (61)
Stro-1	Unbekannt (74)

Bei Polystyrol-Röhrchen IV_{AK} fand im FITC-Kanal eine 3-fach negativ Messung statt. Dafür wurden die, für mesenchymale Stammzellen negativen, Marker Anti-Human CD 2, Anti-Human CD 45 und Anti-Human CD 235a gemeinsam verwendet. So konnten Zellen, die für alle drei Oberflächenmarker negativ waren, detektiert werden.

Direkt nach Antikörperzugabe wurden die Polystyrol-Röhrchen für 30 Minuten in einem lichtgeschützen Behälter auf Eis inkubiert. Nach diesen 30 Minuten, kurz

vor der FACS-Analyse, wurden je 800 µl PBS zu der Zellsuspension zugegeben. Bis zur endgültigen Messung verblieben die Röhrchen lichtgeschützt auf Eis.
Gemessen wurden 500 000 Zellen ohne Gate pro Röhrchen.

2.2.7. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft entweder im Balkendiagramm (als Median ±Standardabweichung) oder im Boxplotdiagramm (mit von oben nach unten betrachtet „Maximum, oberes Quantil, Median, unteres Quantil, Minimum“) dargestellt.
Statistische Signifikanz der Unterschiede präoperativer zu postoperativen Werten wurde mit Hilfe eines zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für verbundene Versuchsanordnung beurteilt, wobei ein $\alpha < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurde. Ausreißerwerte wurden mithilfe des Ausreißertestes von Dixon eliminiert. (30)

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines Nachweises systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des Nachweises von im Blut zirkulierenden multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ). Ihre Typisierung erfolgte durchflusszytometrisch aus peripher gewonnenen Blutproben.
Es wurden im Rahmen zweier orthopädischer Routineverfahren, dem Einbau einer Hüftgelenks-Endoprothese sowie der Triple-Osteotomie, Patienten rekrutiert, die im Rahmen der Routineblutabnahmen prä- und postoperativ jeweils 2 ml Blut zur Verfügung stellten. Dabei wurde untersucht, ob überhaupt die Schwere des OP-Traumas ausreicht, genügend MSZ aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Weitergehend, ob der Unterschied zweier verschiedener OP-Methoden, der indirekt Unterschiede im Patientenalter miterfasst, Einfluss auf die Ausschüttung dieser Zellen nimmt. Ferner sollte eine Kultivierung mit immunhistochemischer Färbung und Bestimmung des Differenzierungsverhaltens versucht werden.

3.2. Multipotente mesenchymale Stromazellen aus Knochenmark

Für den Nachweis von im Blut zirkulierenden multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) dienten bereits etablierte MSZ aus Knochenmark als Kontrollzellen. Diese wurden morphologisch untersucht und spezifische Oberflächenmarker mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie bestimmt. Anschließend wurden MSZ aus Knochenmarkaspirat adipogen und osteogen differenziert, um ihre Differenzierungsfähigkeit aufzuzeigen. Alle verwendeten MSZ waren humanen Ursprungs.

3.2.1. Morphologie

Knochenmarkaspirat wurde direkt nach Entnahme verwendet. Die kernhaltige Zellfraktion wurde mittels Biocoll-Dichtegradient isoliert und kultiviert.

Innerhalb der ersten 24 h wurden mikroskopisch adhärente Zellen sichtbar. Diese waren zunächst sehr klein und kugelförmig. Durch Passagierung wurde das Zellbild homogener, es zeigten sich nach fünf Tagen spindelförmige Zellen mit für MSZ typischer Ausziehung an beiden Enden. Abbildung 12 zeigt Knochenmarks-MSZ nach einem und sechs Tagen in Kultur.

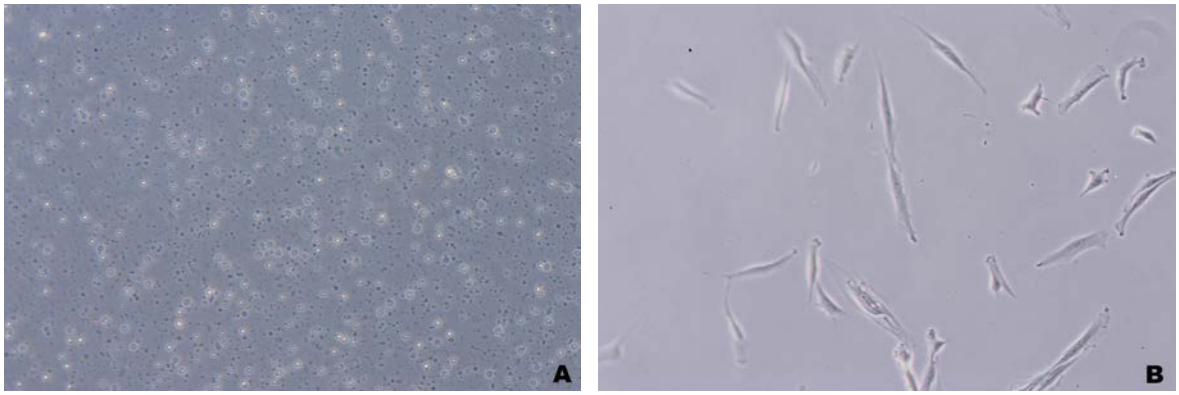


Abb. 12: Kultivierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen. Nach einem Tag in Kultur (A) zeigen sich adhärente, runde, kleine Zellen. Nach sechs Tagen in Kultur (B) haben sich Stromazellen mit typischer Spindelform und beidseits dreieckigen Ausläufern an den Enden ausgebildet.
Vergrößerung 100x (A, B) mit Mikroskop Axiovert 35. Fotografiert mit Canon EOS 350D.

3.2.2. Typisierung

Die Immunphänotypisierung mithilfe spezifischer Oberflächenmarker erfolgte an kultivierten, einmal passagierten MSZ aus Knochenmarkaspirat sowohl immunhistochemisch als auch durch Analysen am Durchflusszytometer.
Bislang ist kein Oberflächenmarkerprotein bekannt, das spezifisch genug wäre, um MSZ ausreichend zu charakterisieren. Daher wurden zwölf allgemein akzeptierte Antikörper ausgewählt. CD 9, CD 54, CD 73, CD 166, CD 271, MSCA-1 und Stro-1 wurden für die Knochenmarks-MSZ als Positivmarker verwendet. CD 2, CD 34, CD 45, CD 133 und CD 235a hingegen als Negativmarker, um sowohl hämatopoetische Zellen, als auch Endothelzellen auszusortieren. (31, 52, 73) Abbildung 13 zeigt die in der immunhistochemischen Färbung positiven Oberflächenmarker. Abbildung 14 präsentiert die Negativmarker, die nicht mit AEC Chromogen – Substrat (DAKO) angefärbt werden. Die Zellen wurden nach 15 Tagen in Kultur und einmaliger Passagierung immunhistochemisch gefärbt.

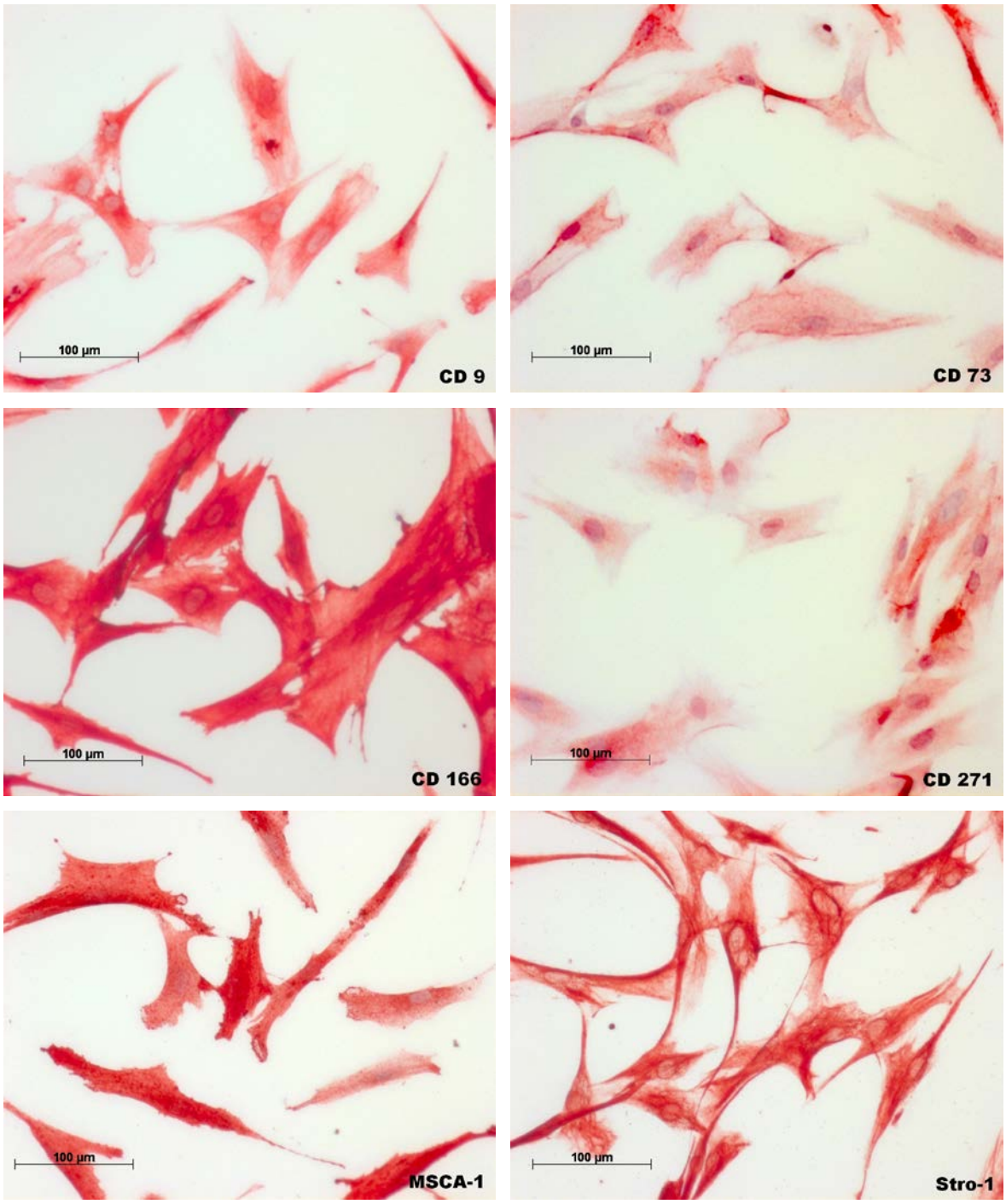


Abb. 13: Positive Oberflächenmarker in der immunhistochemischen Färbung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat. Nach 15 Tagen Kultivierung und einmaliger Passagierung wurden die Zellen gegen CD 9, CD 73, CD 166, CD 271, MSCA-1 und Stro-1 positiv gefärbt.
Vergrößerung 200x mit Mikroskop Axioskop 2 mot plus. Fotografiert mit Axio Cam MRc.

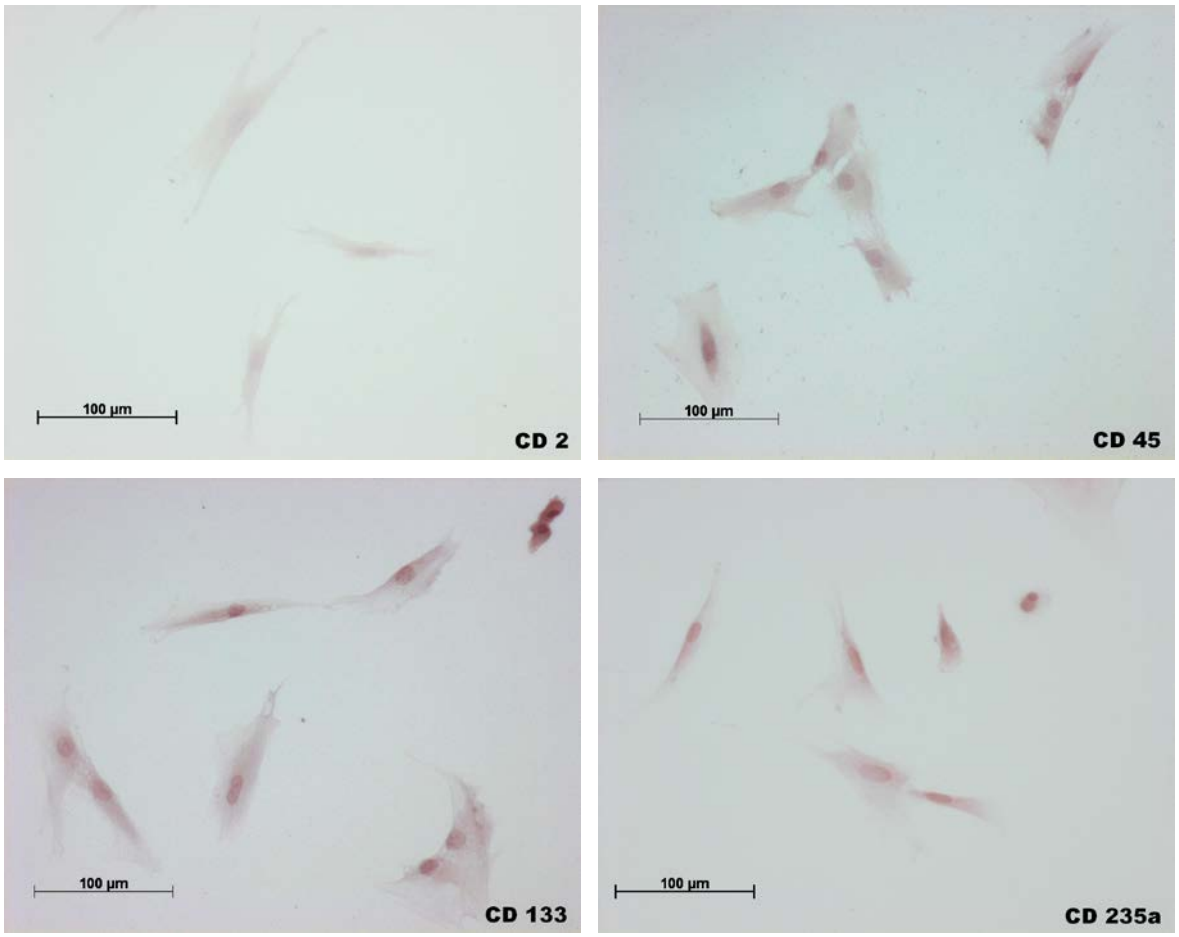
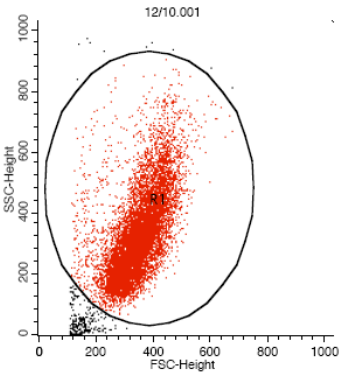


Abb. 14: Negative Oberflächenmarker in der immunhistochemischen Färbung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat. Nach 15 Tagen Kultivierung und einmaliger Passagierung wurden die Zellen gegen CD 2, CD 45, CD 133 und CD 235a negativ gefärbt.
Vergrößerung 200x mit Mikroskop Axioskop 2 mot plus. Fotografiert mit Axio Cam MRc.

In der Durchflusszytometrie bzw. FACS-Analyse zeigten sich die kultivierten multipotenten mesenchymalen Stromazellen nach zehn Tagen in Kultur als relativ homogene Punktwolke im Side- und Forward-Scatter.

Die Histogramm - Analyse zeigte den Isotyp (unter Eliminierung der anderweitig gebundenen zellgebundenen Oberflächenmarker) als deutlichen Peak. Dabei ergab das Kollektiv aus positiv antikörpermarkierten multipotenten mesenchymalen Stromazellen einen auf der x-Achse hinter dem Isotyp gelegenen zweiten Peak. Die negativ antikörpermarkierten multipotenten mesenchymalen Stromazellen lagen auf der x-Achse typischerweise vor dem Isotyp.

Die folgenden Abbildungen verdeutlichen das genannte Erscheinungsbild sowohl in der Durchflusszytometrie wie auch in der auf den jeweiligen Antikörper bezogenen Histogramm-Analyse.

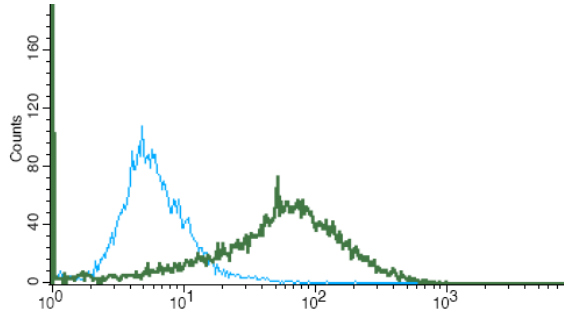


Region Statistics

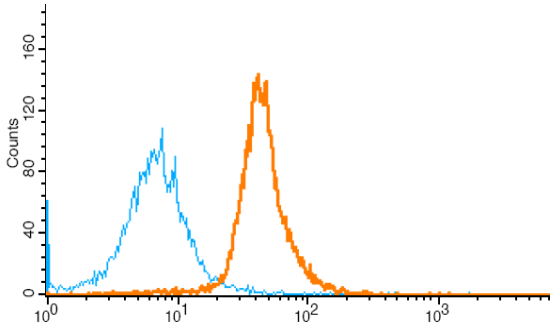
File: 12/10.001
Acquisition Date: 27-Aug-10
Gated Events: 10404
X Parameter: FSC-Height (Linear)
Log Data Units: Linear Va
Gate: No Gate
Total Events: 10404
Y Parameter: SSC-Height

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	10137	97.43	97.43	345.96	325.18

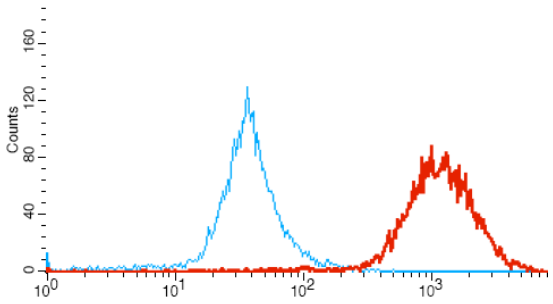
CD 9



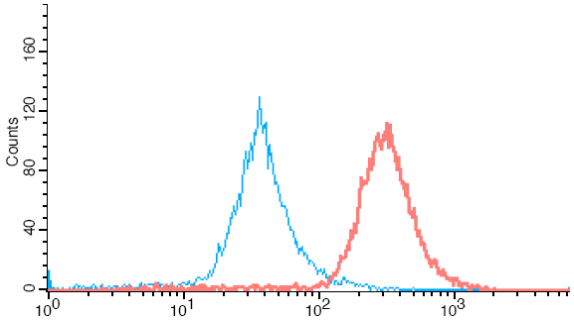
CD54



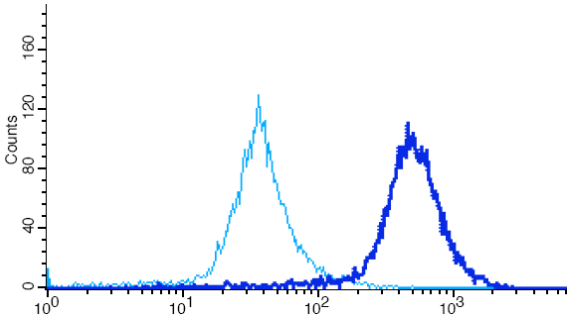
CD73



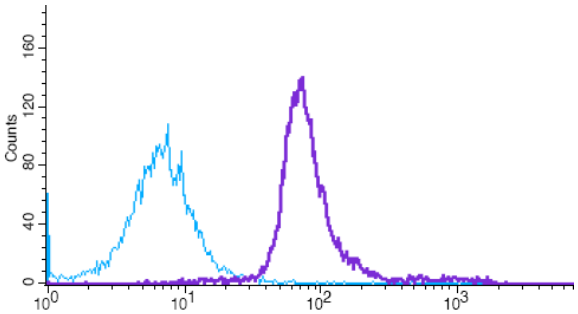
CD166



CD271



MSCA-1



Stro-1

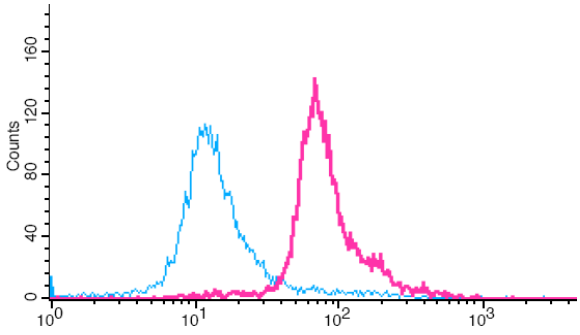
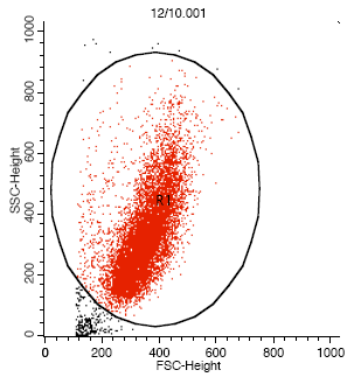


Abb. 15: Positive Oberflächenmarker in der FACS-Analyse humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat. Nach zehn Tagen in Kultur und einmaliger Passagierung wurden die Zellen gegen CD 9, CD 54, CD73, CD166, CD271, MSCA-1 und Stro-1 positiv gefärbt. Gemessen wurden etwa 10 000 Zellen im Gate. Die hellblaue Linie stellt den jeweils dazugehörigen Isotyp dar, andersfarbige Linien geben die verschiedenen Oberflächenmarker wieder. Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

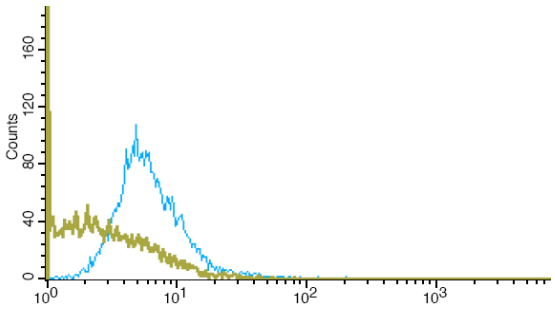


Region Statistics

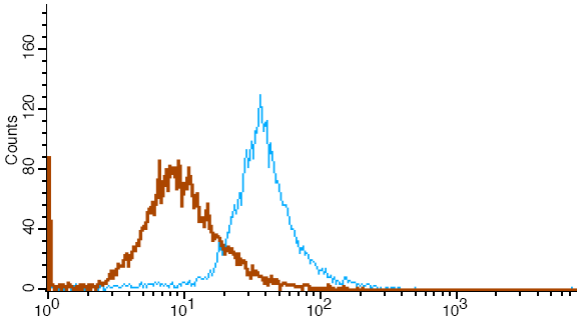
File: 12/10.001
Acquisition Date: 27-Aug-10
Gated Events: 10404
X Parameter: FSC-Height (Linear)
Log Data Units: Linear Va
Gate: No Gate
Total Events: 10404
Y Parameter: SSC-Height

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
R1	10137	97.43	97.43	345.96	325.18

CD2



CD34



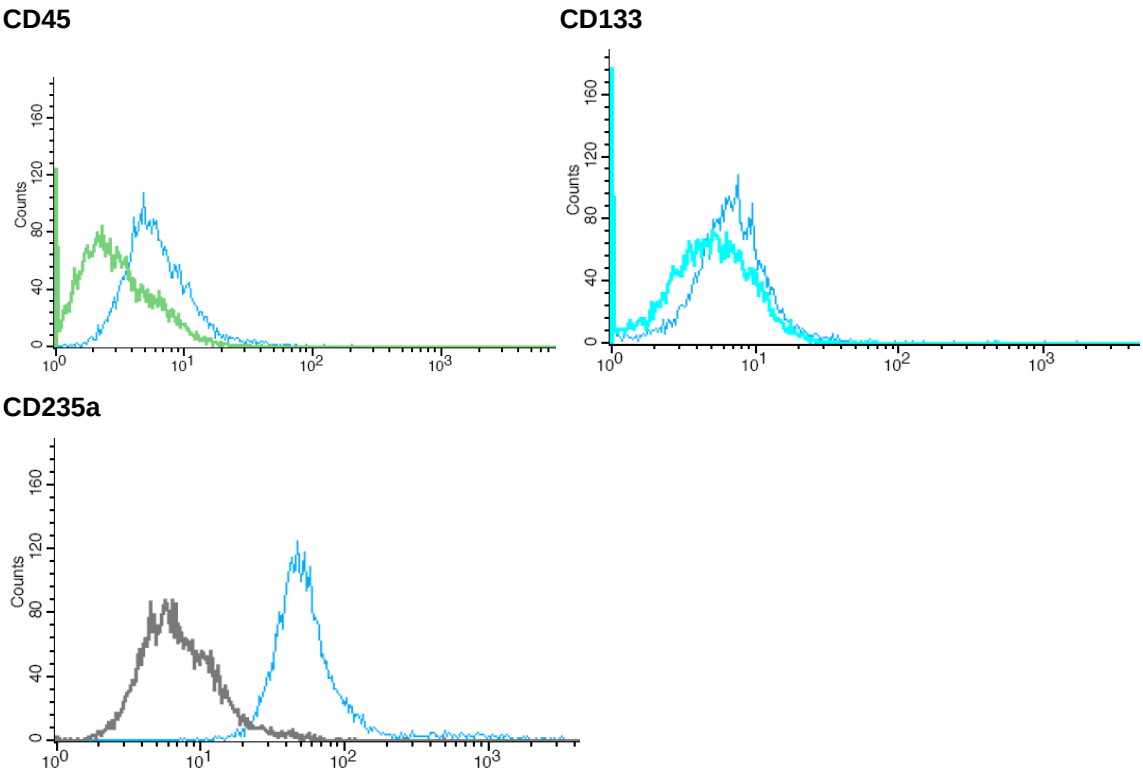


Abb. 16: Negative Oberflächenmarker in der FACS-Analyse humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat. Nach zehn Tagen in Kultur und einmaliger Passagierung wurden die Zellen gegen CD2, CD34, CD45, CD133 und CD235a negativ gefärbt. Gemessen wurden etwa 10 000 Zellen im Gate. Die hellblaue Linie stellt den jeweils dazugehörigen Isotyp dar, andersfarbige Linien geben die verschiedenen Oberflächenmarker wieder. Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

3.2.3. Differenzierungspotential

Kultivierte MSZ aus Knochenmarkaspirat wurden durch Austausch von Basalmedium in Differenzierungsmedium in zwei unterschiedliche mesenchymale Zelllinien differenziert. Damit konnte eindeutig ihr multipotentes Potenzial aufgezeigt werden.

MSZ wurden jeweils nach der ersten Passagierung mit einer Dichte von etwa 2000 Zellen pro cm^2 in 6-wells ausgesät. Durch Zugabe von Isobutylmethylxanthin und Indomethacin wurden die Zellen adipogen differenziert. Mit Ascorbinsäure-2-Phosphat und ß-Glycerophosphat wurde eine osteogene Differenzierung durchgeführt.

Abbildung 17 zeigt die Entstehung von Adipozyten aus MSZ. Die für Adipozyten charakteristischen im Zytoplasma liegenden lipidgefüllten Vakuolen zeigten sich

nach elf Tagen in Kultur mit adipogenem Differenzierungsmedium. Nach 31 Tagen waren etwa 15 Prozent der Zellen differenziert. An Tag 32 fand die Zellfärbung mit Oil Red statt.

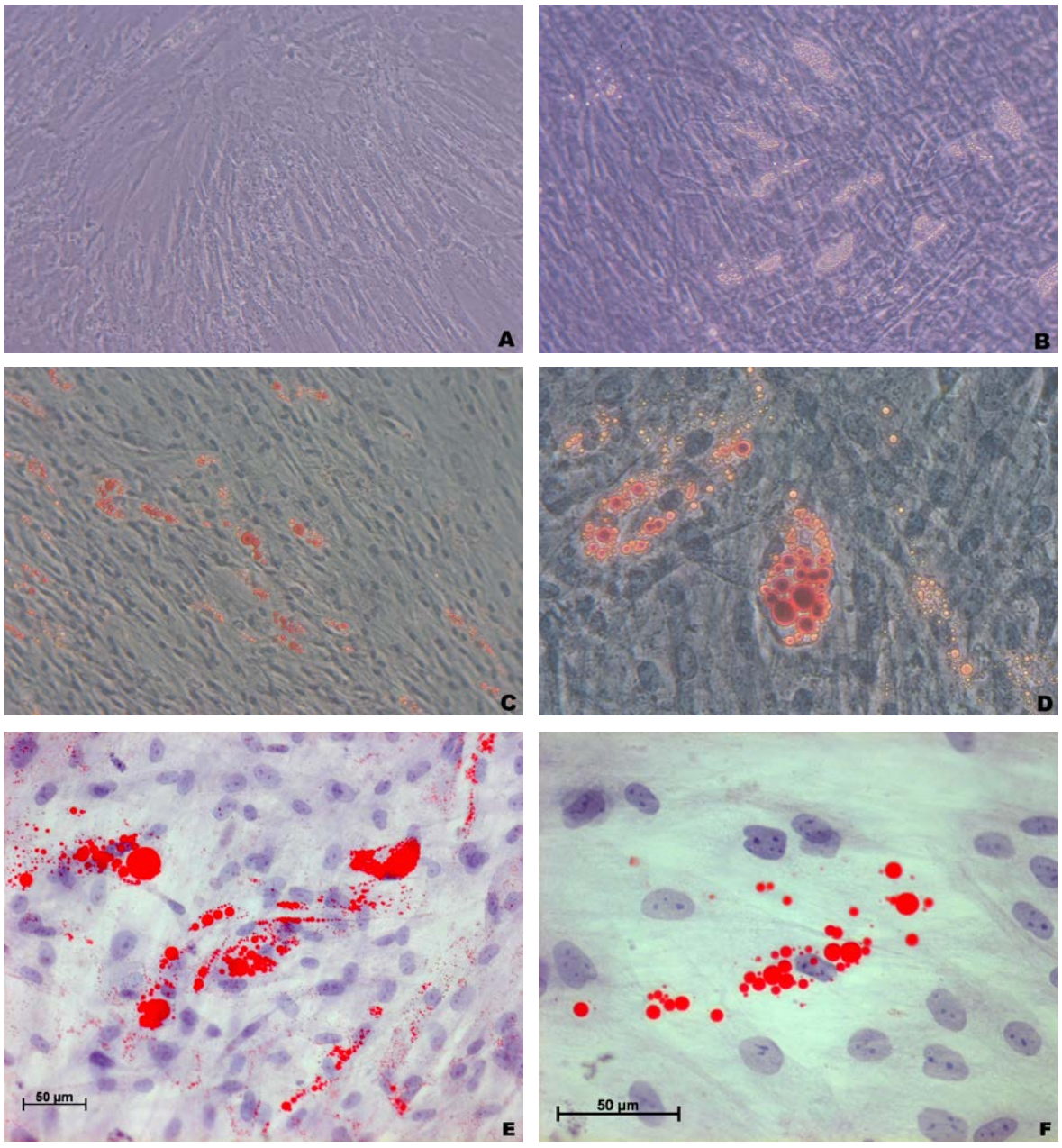


Abb. 17: Adipogene Differenzierung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat. Nach elf Tagen (A) bildeten sich erste lipidgefüllte Vakuolen. Nach 31 Tagen (B) waren etwa 15% der Zellen differenziert. Einen Tag später fand die Färbung mit Oil Red (C-F) statt.

Vergrößerung 100x (A,B.C) und 320x (D) mit Mikroskop Axiovert 35. Fotografiert mit Canon EOS 350D. Vergrößerung 200x (E) und 400x (F) mit Mikroskop Axioskop 2 mot plus. Fotografiert mit Axio Cam MRc.

Die osteogene Differenzierung wurde in Abbildung 18 dargestellt. In den ersten 14 Tagen der Differenzierung erfolgte die Ausrichtung der Zellen bis ein monolithisches Gerüst aus Osteoblasten entstand. Nach etwa 28 Tagen in Kultur mit osteogenem Differenzierungsmedium waren multiple Mineralisationen erkennbar, die auf eine Umwandlung von MSZ in Mineralisationen-bildende Osteoblasten hinwiesen. Die Zellen wurden an Tag 32 nach Starten der Differenzierung mit der Silbermethode nach von Kossa gefärbt.

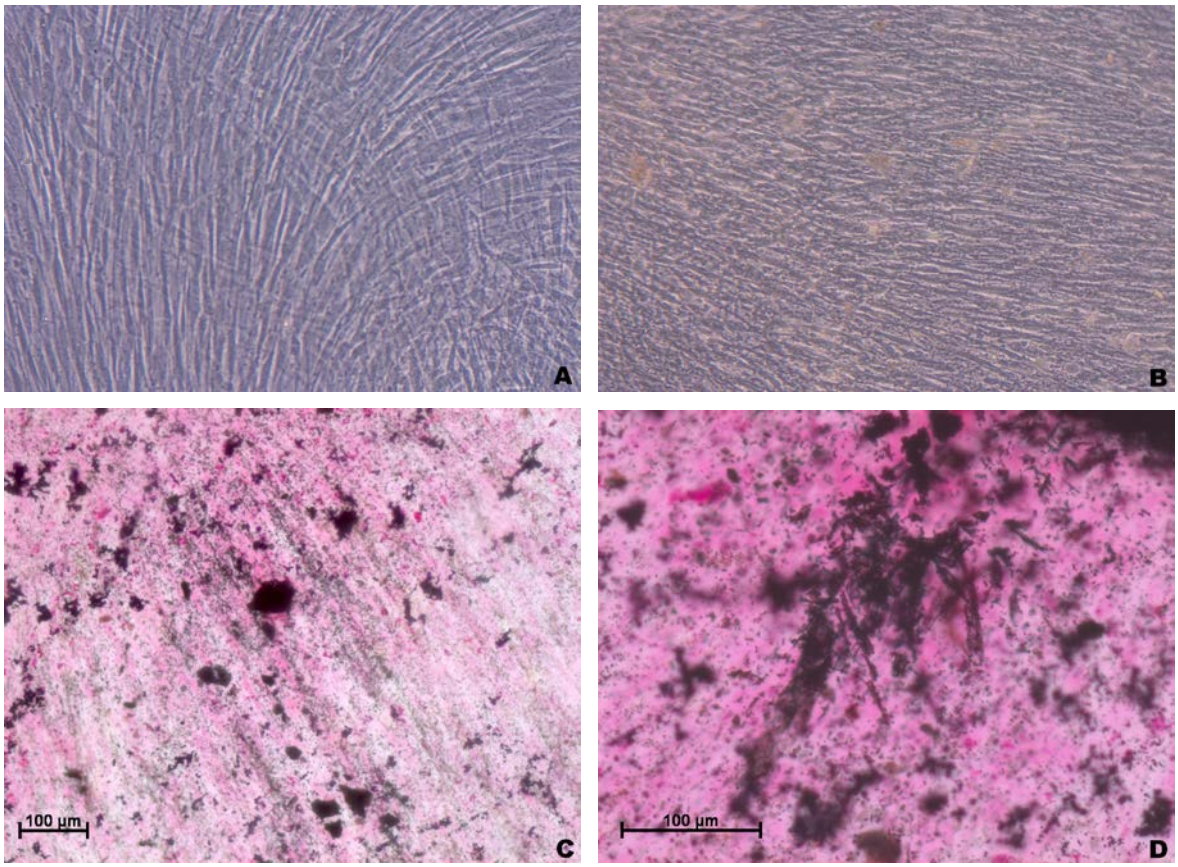


Abb. 18: Osteogene Differenzierung humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat. Ausrichtung der Zellen nach elf Tagen (A), an Tag 28 (B) waren multiple Mineralisationen erkennbar. Färbung der Zellen nach von Kossa an Tag 32 (C,D).
Vergrößerung 100x (A,B) mit Mikroskop Axiovert 35. Fotografiert mit Canon EOS 350D. Vergrößerung 100x (C) und 200x (D) mit Mikroskop Axioskop 2 mot plus. Fotografiert mit Axio Cam MRc.

3.3. Systemische Mobilisierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach orthopädischen Routineeingriffen

3.3.1. Optimierung der Messbedingungen für die FACS-Analyse

Vergleich der Antikoagulantien Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Lithiumheparinat

Um gute Ergebnisse für die FACS-Analysen zu erzielen, mussten Zellverklumpungen im Frischblut vermieden werden. Um das geeignete Antikoagulanz zu finden, wurden von zwei freiwilligen, gesunden Spendern Blutentnahmen mit den Standard-*in-vitro*-Antikoagulantien Ethylendiamintetra-essigsäure (EDTA) und Lithiumheparinat durchgeführt. Es wurden je 2 ml Vollblut pro Blutröhrchen verwendet und durch Dichtegradientzentrifugation die kernhaltige Zellbande isoliert. Die Proben wurden mit Antikörpern inkubiert und mittels FACS-Analyse die jeweilige Anzahl spezifischer Oberflächenmarker für multipotente mesenchymale Stromazellen bestimmt. Verglich man anhand der gemessenen Antikörper-Dreierkombinationen CD9/73/54 und CD9/166/54 EDTA mit Lithiumheparin, so fiel auf, dass in den mit EDTA vorbereiteten Blutproben wesentlich mehr Zellen gemessen wurden als im Lithium-Heparin-Röhrchen. Alle nachfolgenden Messungen aus peripherem Blut wurden deshalb mit EDTA-antikoaguliertem Blut durchgeführt. Abbildung 19 stellt den Zusammenhang von EDTA und Lithiumheparin dar.

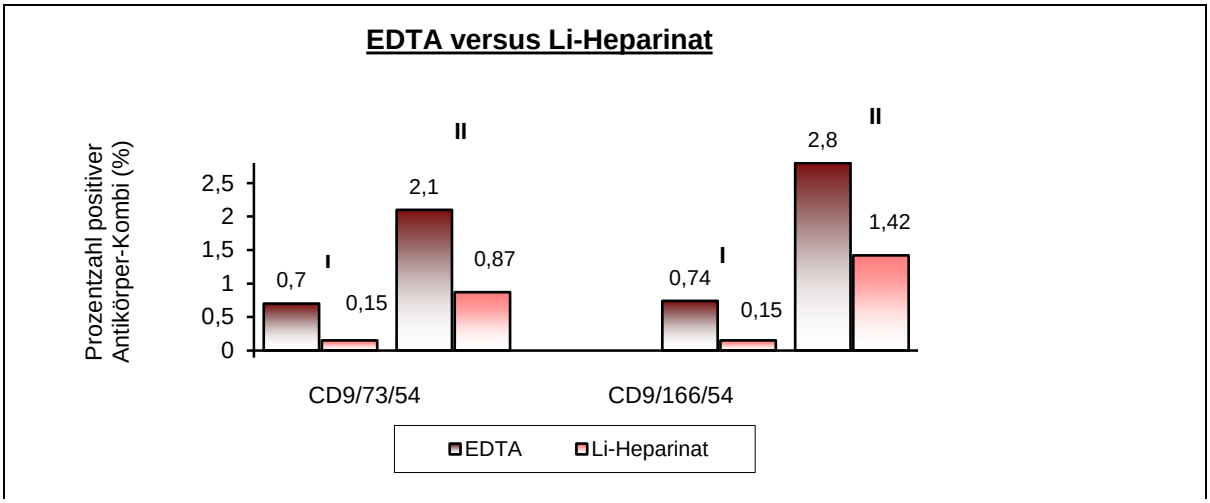


Abb. 19: Vergleich zweier gemessener Antikörperkombinationen (in Prozent) von Blutproben antikoaguliert mit EDTA (dunkelrot) oder Lithiumheparinat (hellrot). I und II geben die beiden verschiedenen Spender an. Es befindet sich eine deutlich höhere Prozentzahl an positiven Dreierkombinationen in dem mit EDTA bearbeiteten Blut.
Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

Da Anti-human CD 54 annähernd 100 Prozent aller gemessenen kernhaltigen Zellen inklusive nichtaussortierter Lymphozyten und Granulozyten positiv anfärbte (siehe Abbildung 20), wurde dieser Antikörper für die späteren Messungen verworfen. Die undifferenzierte Anfärbung erklärte die ungewöhnlich hohe Prozentzahl der in Abbildung 19 dargestellten Werte.

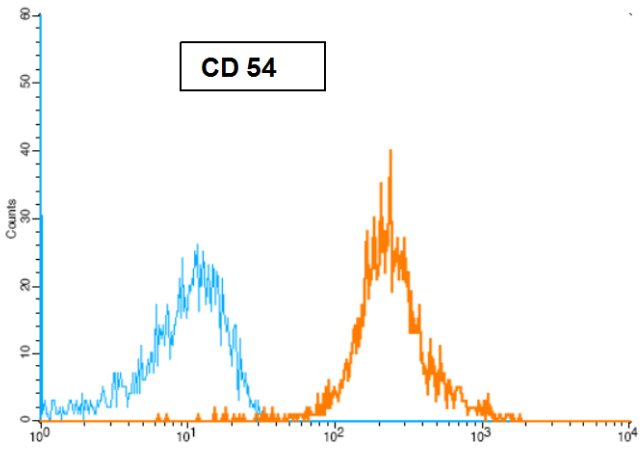


Abb. 20: Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von CD 54 positiven Zellen. Es wurde die kernhaltige Zellfraktion in peripherem Blut einer Kontrollperson ohne Trauma verwendet. Die hellblaue Linie stellt die Isotypkontrolle dar, orange wurden die CD 54 positiven Zellen aufgetragen. Nahezu 100 Prozent der gesamten kernhaltigen Zellfraktion war CD 54 positiv.
Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

Lagerung und Haltbarmachung der Zellen mit Paraformaldehyd

Um die Lagerungsfähigkeit zu untersuchen, wurden mit EDTA antikoagulierte Blutproben freiwilliger Kontrollpersonen ohne Trauma sowohl bei Raumtemperatur, als auch im Kühlschrank aufbewahrt und durchflusszytometrisch die Antikörperkombination CD9/73 in der mit dem Biocoll-Dichtegradient isolierten kernhaltigen Zellfraktion bestimmt. Als Kontrolle wurde vom jeweils selben Spender ein Teil des erhaltenen Blutes sofort verarbeitet und gemessen.

Abbildung 21 gibt beispielhaft die Ergebnisse von jeweils einem Spender wieder. Dabei zeigte sich, dass sich die für CD9/73 positiven Zellen sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Aufbewahrung im Kühlschrank für 24 h stark gegenüber der sofort gemessenen Blutproben verringerten. Die Lagerung bei Raumtemperatur lieferte jedoch 24 h nach Blutabnahme eine höhere Anzahl CD 9/73 markierter Zellen als die Lagerung im Kühlschrank und war damit die geeignetere Aufbewahrungsmethode.

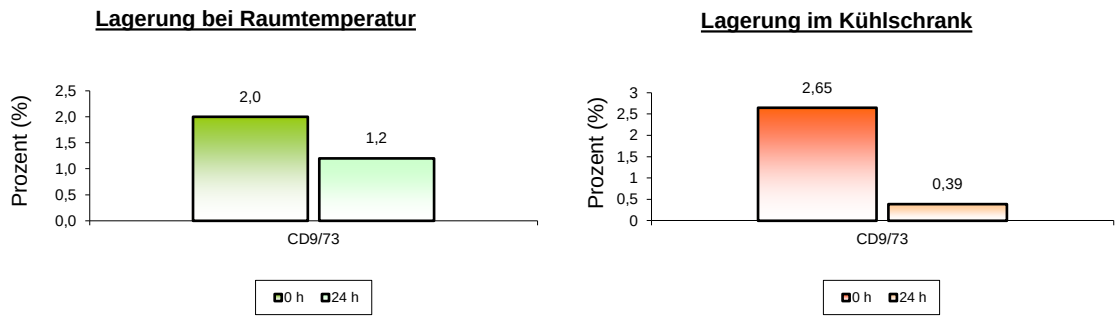


Abb. 21: Geeignete Lagerung der Blutproben. Um die Lagerungsfähigkeit zu untersuchen, wurden mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) antikoagulierte Blutproben freiwilliger Kontrollpersonen ohne Trauma bei Raumtemperatur und im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Teil der Blutproben wurde als Kontrolle sofort verarbeitet, der Rest wurde für 24 h gelagert und danach verarbeitet. Mittels FACS-Analyse wurde die für CD9/73-positive Zellfraktion bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Lagerung bei Raumtemperatur weitaus bessere Ergebnisse liefert, als die Lagerung im Kühlschrank.
Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur^{TM} der Firma Becton Dickinson.

Um die Haltbarkeit der multipotenten mesechymalen Stromazellen weiter zu optimieren, wurde die Haltbarmachung der Zellen mit einprozentigem Paraformaldehyd (PFA 1%) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde die kernhaltige Zellschicht aus drei EDTA-Blutröhrchen des gleichen Spenders isoliert. Ein Röhrchen wurde wie gewohnt verarbeitet und als Kontrollmessung ohne PFA 1% sofort gemessen. Dem zweiten Röhrchen wurde direkt nach Dichtegradientzentrifugation 150 µl PFA 1% zugegeben, die Zellen wurden wie gewohnt weiterverarbeitet und sofort gemessen. Das dritte Röhrchen wurde wie gewohnt verarbeitet und erst nach Antikörperzugabe wurden 150 µl PFA 1% zugefügt. Es fand eine sofortige Messung statt und eine Messung nach 24 h. Hier allerdings wurde das Röhrchen wegen des darin enthaltenen Paraformaldehyds im Kühlschrank aufbewahrt. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse.

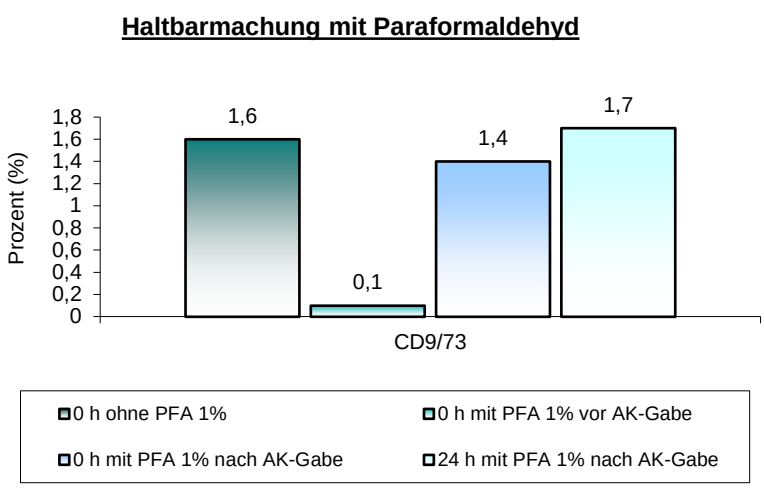


Abb. 22: Haltbarmachen der kernhaltigen Zellschicht aus peripherem Blut mithilfe von einprozentigem Paraformaldehyd (PFA 1%) und Untersuchung mittels FACS-Analyse. Die Kontrollmessung fand sofort ohne PFA 1% statt (0 h ohne PFA 1%). Einer Messung wurde direkt nach Isolation der kernhaltigen Zellfraktion und vor Zugabe der Antikörper (AK) PFA 1 % zugegeben und sofort gemessen (0 h mit PFA 1 % vor AK-Gabe). Die letzte Bestimmung erfolgte mit PFA 1 % nach der vollständigen Verarbeitung der Zellen. Diese Probe wurde sofort (0 h mit PFA 1 % nach AK-Gabe) und nach 24 h (24 h mit PFA 1 % nach AK-Gabe) analysiert.
Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

Im Vergleich zur Kontrollmessung lieferte die Haltbarmachung mit PFA 1 % nach Zugabe der Antikörper das beste Ergebnis. Mit der Zugabe von PFA 1 % vor der Antikörpergabe ließen sich nur wenige Zellen messen. Da die Zugabe des PFA 1 % nach Antikörperzugabe unmittelbar nach Abnahme des Blutes nicht möglich war, wurde EDTA-Blut bei Raumtemperatur gelagert. Alle gemessenen peripheren Blutproben wurden spätestens 12 h nach Blutabnahme verarbeitet und sofort im Anschluss gemessen.

3.3.2. Charakterisierung mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus peripherem Blut erfolgte anhand verschiedener Dreierkombinationen multipotenter mesenchymaler Stromazellmarker, um MSZ genauer charakterisieren zu können. Die Dreierkombinationen wurden aus Verknüpfungen einzelner gemessener Antikörper berechnet. Um falschgebundene Antikörper nicht mit zu berechnen, wurden Isotypkontrollen bestimmt und die Werte davon

abgezogen. Beispielhafte Isotypkontrollen sowie die verwendeten Antikörper sind in den FACS-Analysen in Abbildung 23 und 24 verdeutlicht.

Der Forward-/Side-Scatter zeigt das typische Bild kernhaltiger Zellen im Blut in nebeneinanderliegenden Punktwolken. Dabei sind neben Debris Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten repräsentiert. Da die Position der mutipotenten mesenchymalen Stromazellen innerhalb dieser Fraktionen nicht eindeutig zu bestimmen ist, wurden je 500 000 Zellen ohne Gate ausgezählt. Eine beispielhafte Darstellung kernhaltiger Zellen im Forward-/Side-Scatter mit der ungefähren Lage der häufigsten kernhaltigen Zellfraktionen in peripherem Blut zeigt Abbildung 23.

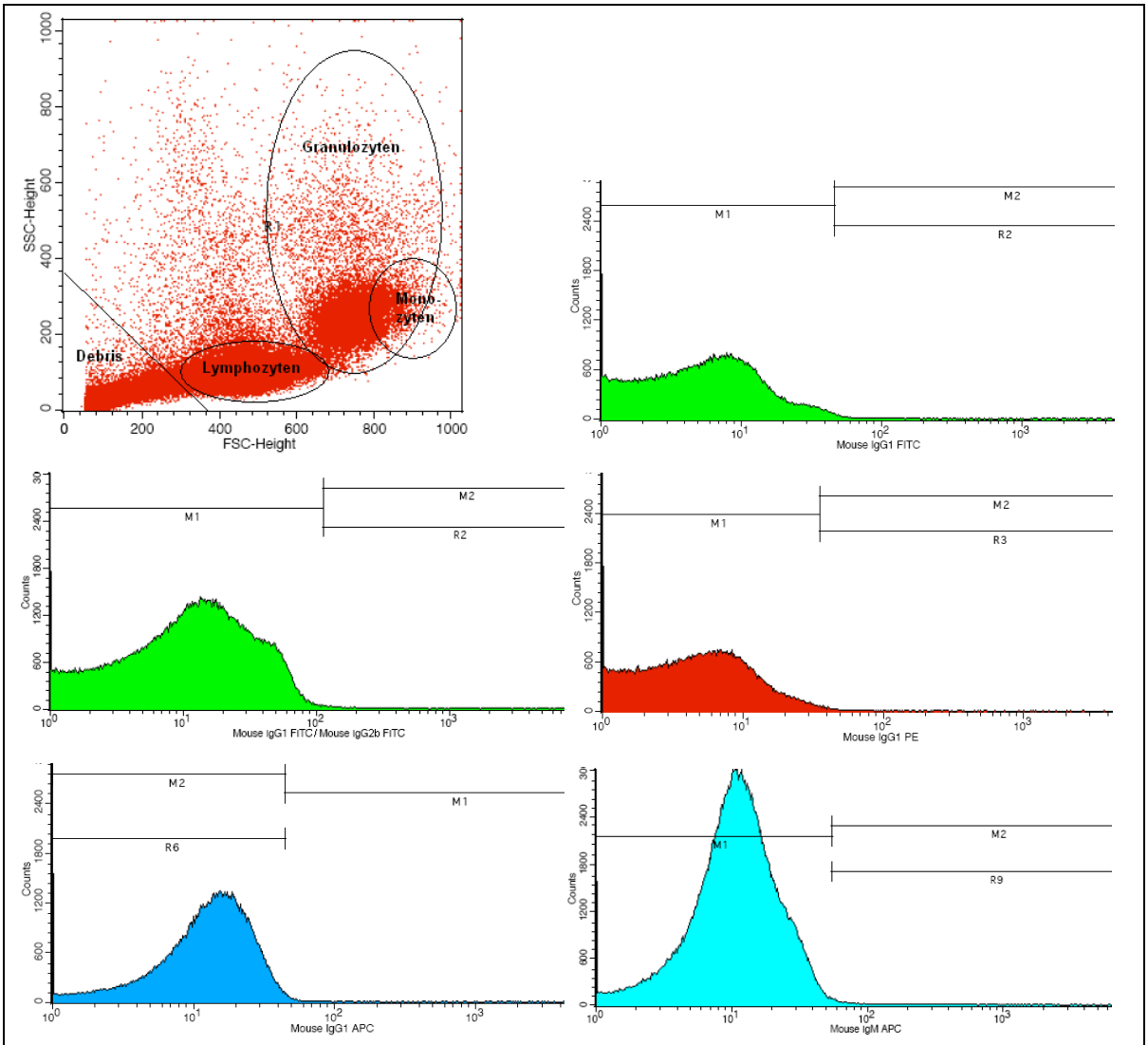


Abb. 23: Beispielhafter Forward-/Side-Scatter mit dazugehörigen Isotypkontrollen der FACS-Analyse aus peripherem Blut. Die farbigen Flächen der Isotyp-Kontrollen stehen für positiv markierte Zellen. Im Forward-/Side-Scatter ist die ungefähre Lage der kernhaltigen Zellen aus

peripherem Blut in den einzelnen Punktwolken dargestellt. Da die Lage multipotenter mesenchymaler Stromazellen innerhalb dieser Wolken nicht zu ermitteln war, wurden 500 000 Zellen ohne Gate gemessen.
Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson.

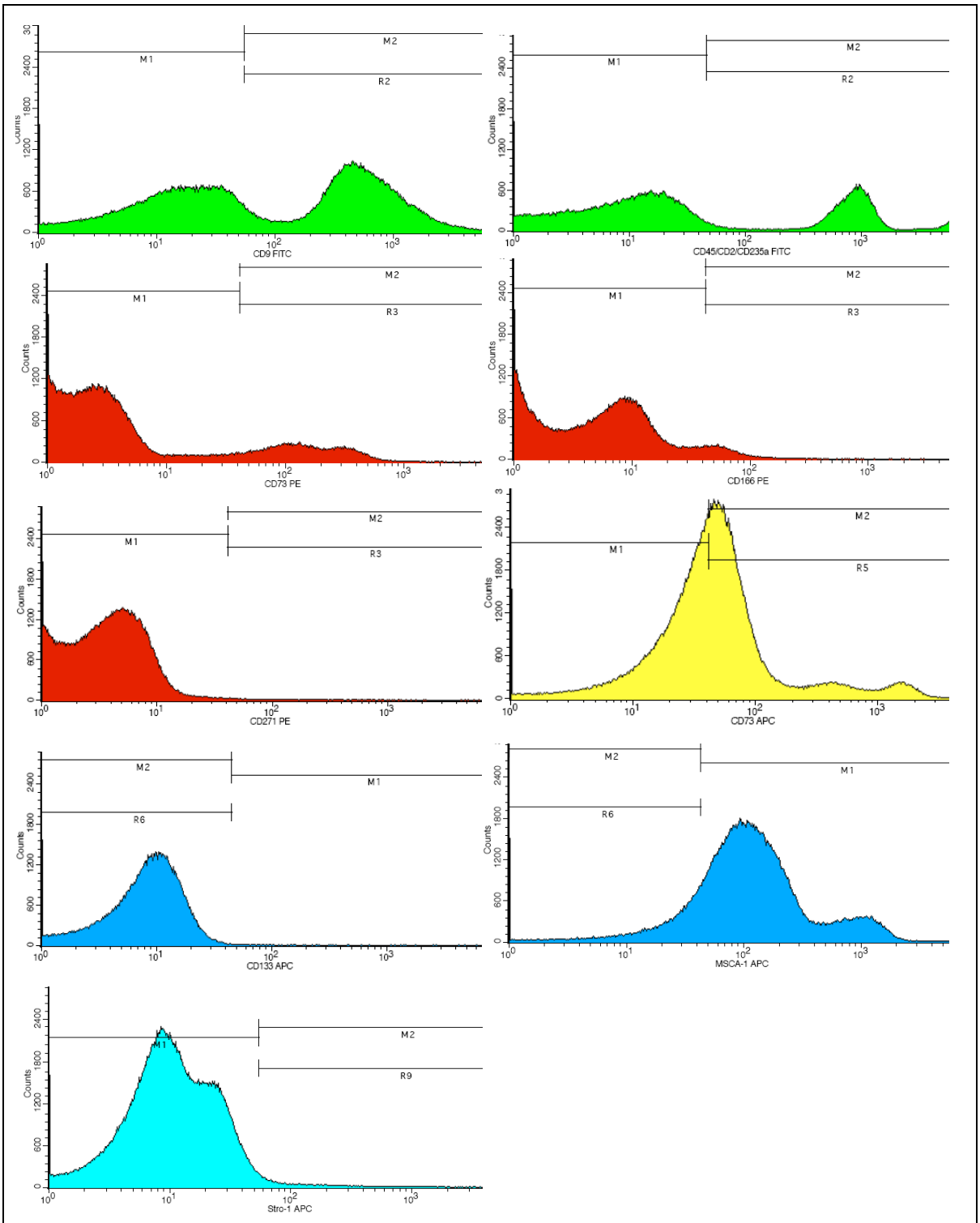


Abb. 24: Beispielhafte Antikörperkurven der FACS-Analyse kernhaltiger Zellen aus peripherem Blut. Hier sind die verschiedenen Antikörper dargestellt, die an kernhaltige Zellen gebunden haben. Die farbigen Flächen stellen die mit Antikörper markierten Zellen dar. Mithilfe der Isotypkontrollen aus Abb. 23 und Verknüpfungen einzelner Antikörper können verschiedene Antikörper-Dreierkombinationen positiv markierter Zellen angezeigt werden.
Das verwendete Durchflusszytometer ist das FACSCalibur^{TM} der Firma Becton Dickinson.

3.3.3. Zunahme multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach Operation

Die Anzahl systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ) aus peripherem Blut wurde mittels FACS-Analyse von diversen Antikörper-Dreierkombinationen jeweils vor Operation und zwei Tage danach bestimmt. Die Darstellung der Werte erfolgte in Boxplots, siehe Abbildung 25.
Ausreißer wurden mithilfe des Ausreißertests nach Dixon berechnet und ausgesondert. Dieser Ausreißertest eignet sich besonders für kleine Stichprobenumfänge unter etwa 30 Werten. (30)

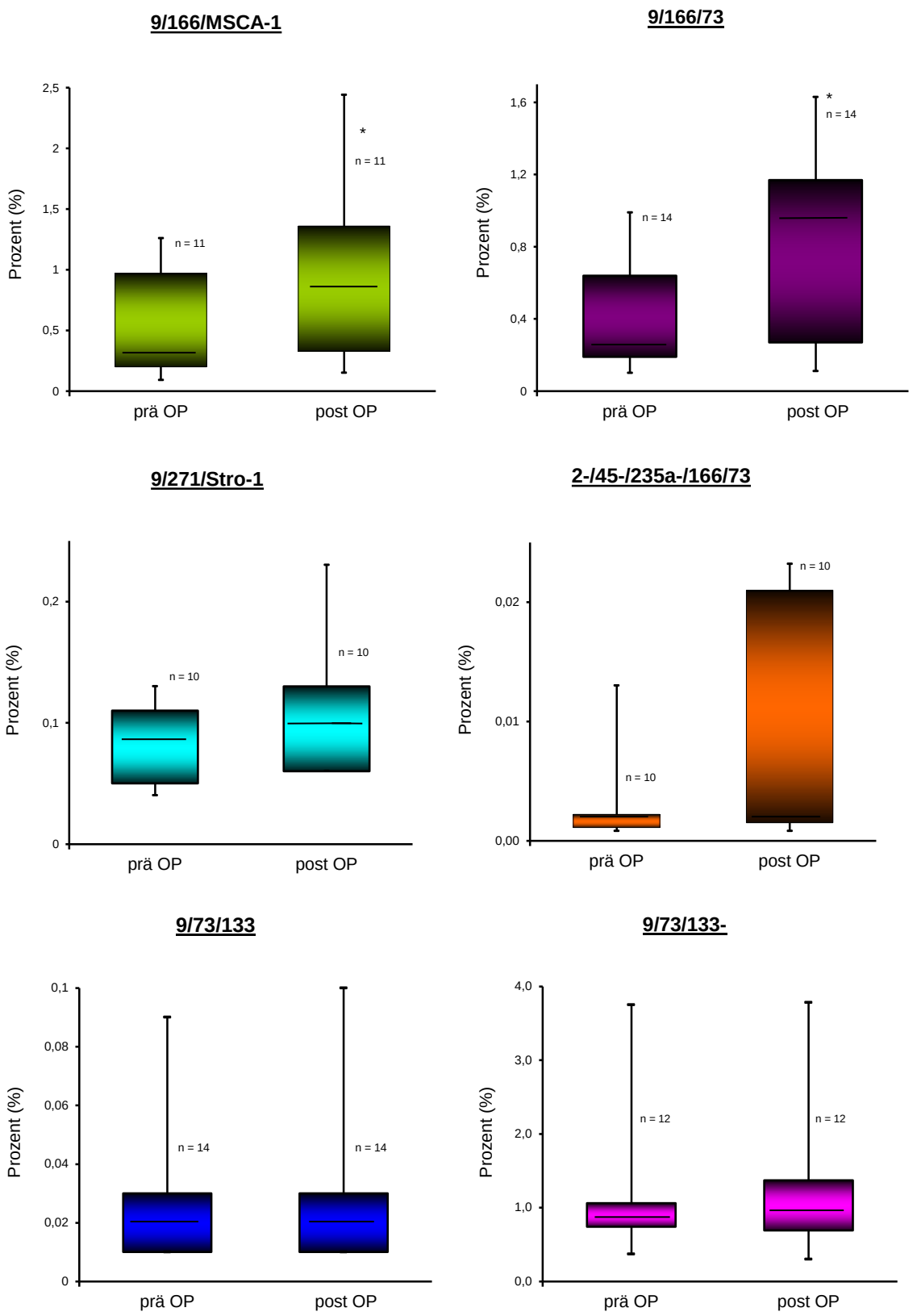


Abb. 25: Boxplot-Darstellung mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ) vor Operation (prä OP) und nach Operation (post OP) in Prozent von insgesamt 500 000 gemessenen kernhaltigen Zellen in peripherem Blut. Ausreißer wurden mithilfe des

Ausreißertests nach Dixon eliminiert. Die mit * markierten Antikörperkombinationen zeigen eine signifikante Mobilisierung von MSZ postoperativ.

In den postoperativen Proben zeigte sich in fast allen Antikörper-Kombinationen eine z. T. deutliche Zunahme multipotenter mesenchymaler Stromazellen. Am deutlichsten ließ sich dies signifikant in den Kombinaten 9/166/MSCA-1 sowie 9/166/73 nachweisen.

Um Unterschiede in der Ausschüttung von MSZ in peripheres Blut zwischen der Triple-Osteotomie und dem Einbau einer HTEP nachzuweisen, wurde der Median mit Standardabweichung der beiden Operationsarten in Bezug auf die Antikörper-Dreierkombinationen in Abbildung 26 dargestellt. Indirekt wurde damit das unterschiedliche Patientenalter miterfasst, da Triple-Osteotomie-Patienten im Durchschnitt 46 Jahre jünger als die untersuchten Patienten mit Einbau einer HTEP waren.
Auch hier wurden Ausreißerwerte mit dem Ausreißertest nach Dixon ausgenommen.

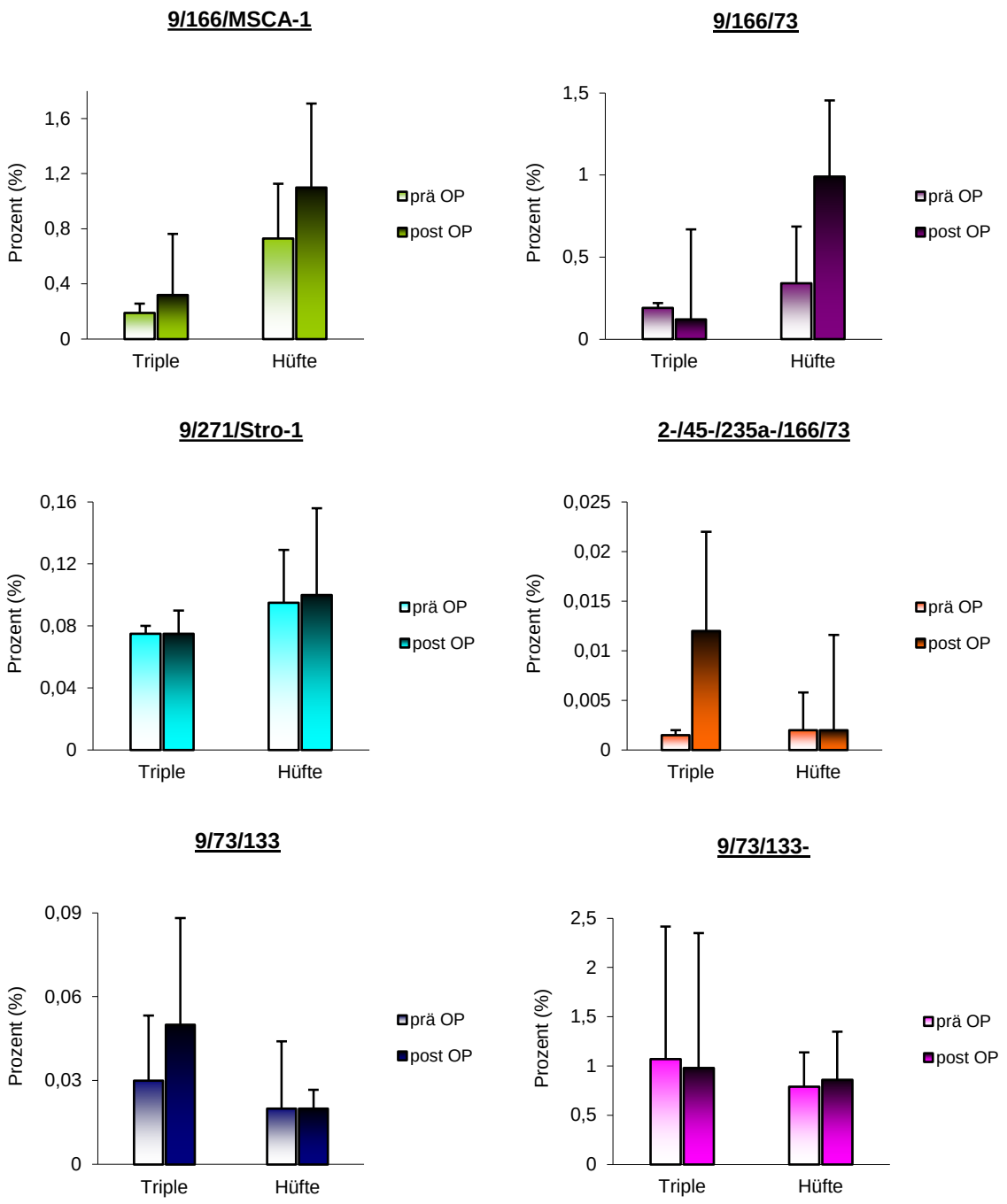


Abb. 26: Anstieg der Dreierkombination-Marker von HTEP- und Triple-Osteotomie- Patienten im Vergleich. Der erste Balken gibt die im Blut gemessenen Ausgangswerte an, der zweite Balken steht für die Messungen nach unterschiedlicher Operation. Gemessen wurden Zellen mit positiver Dreierkombination in Bezug auf die gesamte gemessene Zellzahl von 500 000 gemessenen kernhaltigen Zellen. Gezeigt wird der Median als Balken, die schwarzen Striche stellen die Standardabweichung dar. Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach Dixon entfernt.

Beim Vergleich der Tripleosteotomie mit der HTEP zeigten sich je nach Antikörper-Dreierkombination Unterschiede in der postoperativen Anzahl der MSZ.

3.4. Kultivierung systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen

Um letztendlich zu beweisen, dass die verwendeten Antikörperkombinationen tatsächlich zuließen, systemisch mobilisierte multipotente mesenchymale Stromazellen zu bestimmen, wurden diese kultiviert und mikroskopisch klassifiziert.

3.4.1. Morphologie

Morphologisch zeigte sich, in Abbildung 27 dargestellt, zunächst (nach einem Tag in Kultur) ein äußerst heterogenes Bild der mit Biocoll – Dichtegradient isolierten kernhaltigen Zellen. Nach sechs Tagen fanden sich zahlreiche typische, morphologisch nicht von MSZ aus Knochenmark zu unterscheidende Stromazellen, die partiell nach neun Tagen abzusterben begannen. Nach 14 Tagen in Kultur zeigten sich neben zahlreichen abgestorbenen, fragmentierten Zellen zunehmend größer gewordene vielgestaltige Stromazellen. Die Isolation dieser Zellen durch Passagierung mittels Trypsinierung und deren Quantifizierung mittels FACS-Analyse gelang nicht, da sie unmittelbar nach Ablösung aus ihrem „gewohnten“ Zellverband mit den übrigen kernhaltigen Zellen abstarben. Auch die Anwendung eines mit Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF) versetzten Mediums brachte keine Lebensverlängerung oder weitere Vermehrung.

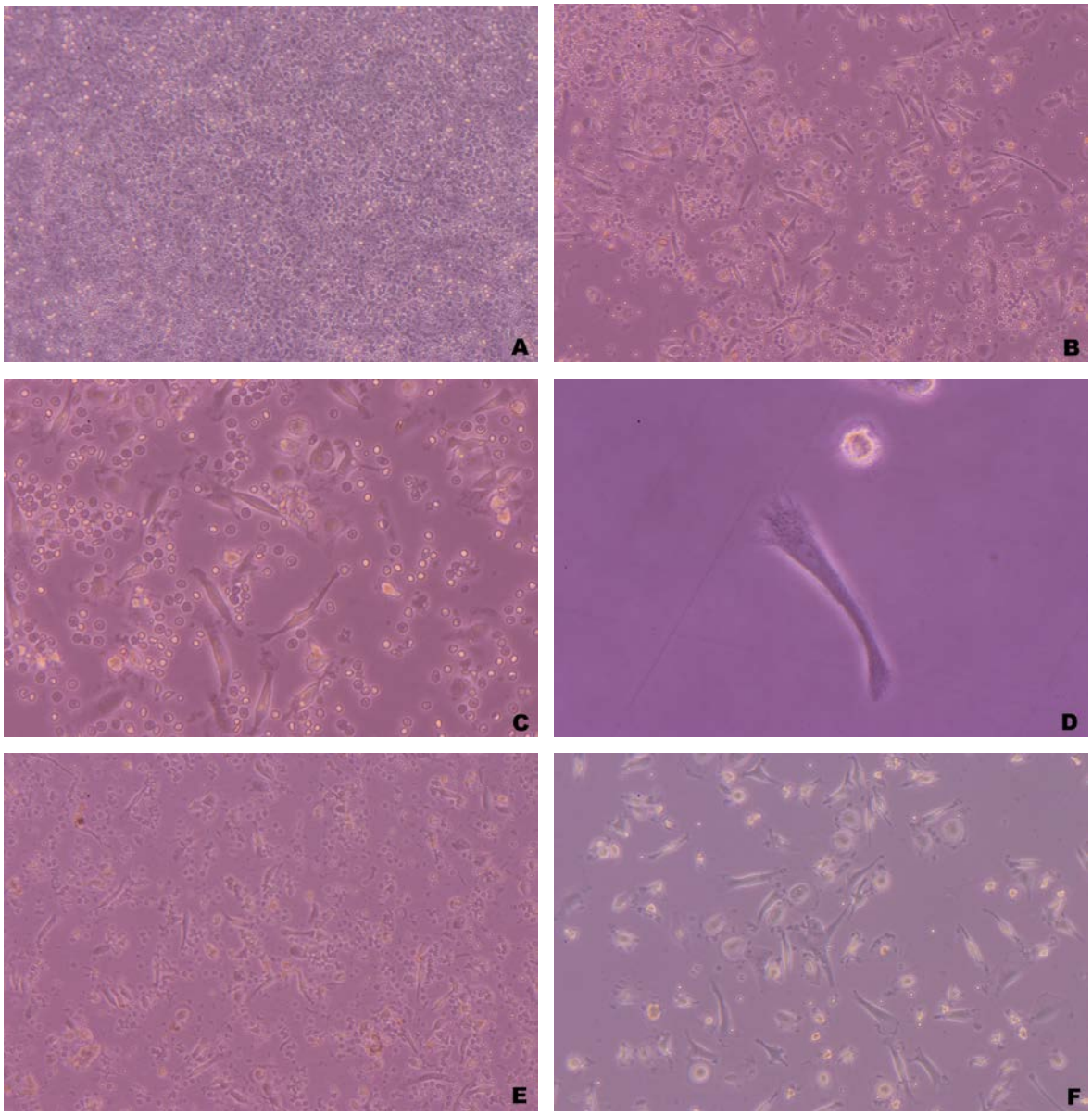


Abb. 27: Kultivierte multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut (I). Nach einem Tag in Kultur (A) zeigte sich ein sehr heterogenes Bild adhärenter Zellen. Nach sechs Tagen in Kultur (B,C,D) zeigten sich neben kugelförmigen Zellen zahlreiche längliche Stromazellen mit typischer Ausziehung an den Zellenden. Nach neun Tagen in Kultur (E) zeigten einzelne Zellen den beginnenden Zelltod durch Unschärfe, zunehmende Unregelmäßigkeit und Einschrumpfen. Nach 14 Tagen in Kultur (F) verblieben neben Zellfragmenten größere und polymorph geformte multipotente mesenchymale Stromazellen.
Vergrößerung 100x (A,B,E,F), Vergrößerung 200x (C), Vergrößerung 320x (D) mit Mikroskop Axiovert 35. Fotografiert mit Canon EOS 350D.

Interessanterweise zeigten sich (Abbildung 28) nach etwa 15 Tagen in Kultur mehrfach makrophagenartige, riesige Gebilde, die die offenbar abgestorbenen

multipotenten mesenchymalen Stromazellen einschlossen und im Sinne einer Hämophagozytose „auffraßen“.

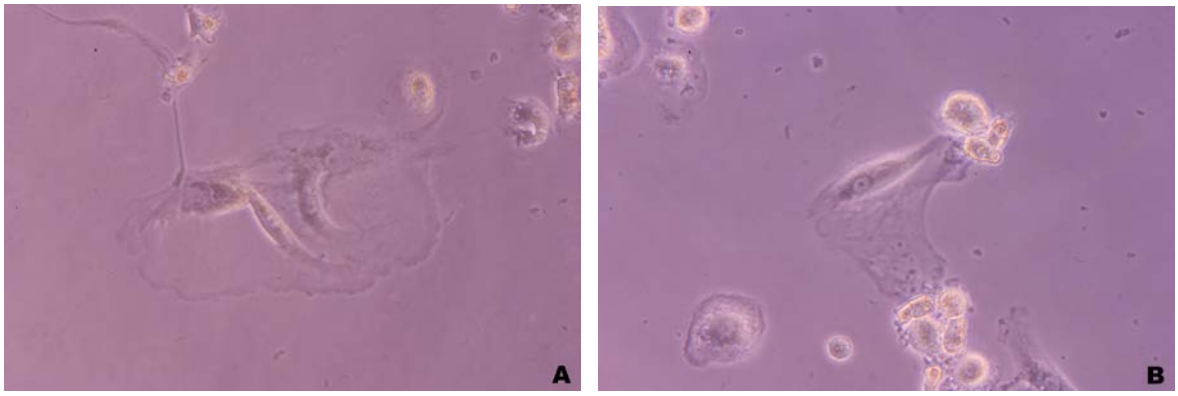


Abb. 28: Kultivierte multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut (II). Nach etwa 15 Tagen in Kultur zeigten sich vermehrt riesige makrophagenartige Gebilde, die multipotente mesenchymale Stromazellen einschlossen und sie spätestens zwei Tage nach Einschluss fragmentiert hatten.
Vergrößerung 200x (A,B) mit Mikroskop Axiovert 35. Fotografiert mit Canon EOS 350D.

3.4.2. Differenzierung

Um aufzuzeigen, dass multipotente mesenchymale Stromazellen ebenso wie ihre Verwandten aus Knochenmark multipotente Fertigkeit besitzen, wurde ihre Differenzierungsfähigkeit in osteogener und adipogener Richtung untersucht. Hierfür wurden zehn Tage alte Zellen differenziert.

Osteogen ließen sich die Zellen nicht differenzieren. In mehreren Ansätzen starben die Zellen auch trotz Einsetzen eines neu angesetzten osteogenen Differenzierungsmediums innerhalb weniger Tage komplett ab.

In der adipogenen Differenzierung zeigten sich nach vier Tagen Differenzierung erste Zellvakuolen, nach weiteren zehn Tagen zeigten sich viele Vakuolen in einigen Zellen, wobei zu diesem Zeitpunkt aber nur noch einzelne Zellen verblieben waren. Eine Zellfärbung mit Oil Red konnte nicht mehr stattfinden. Abbildung 29 zeigt die adipogene Differenzierung von systemisch mobilisierten MSZ.

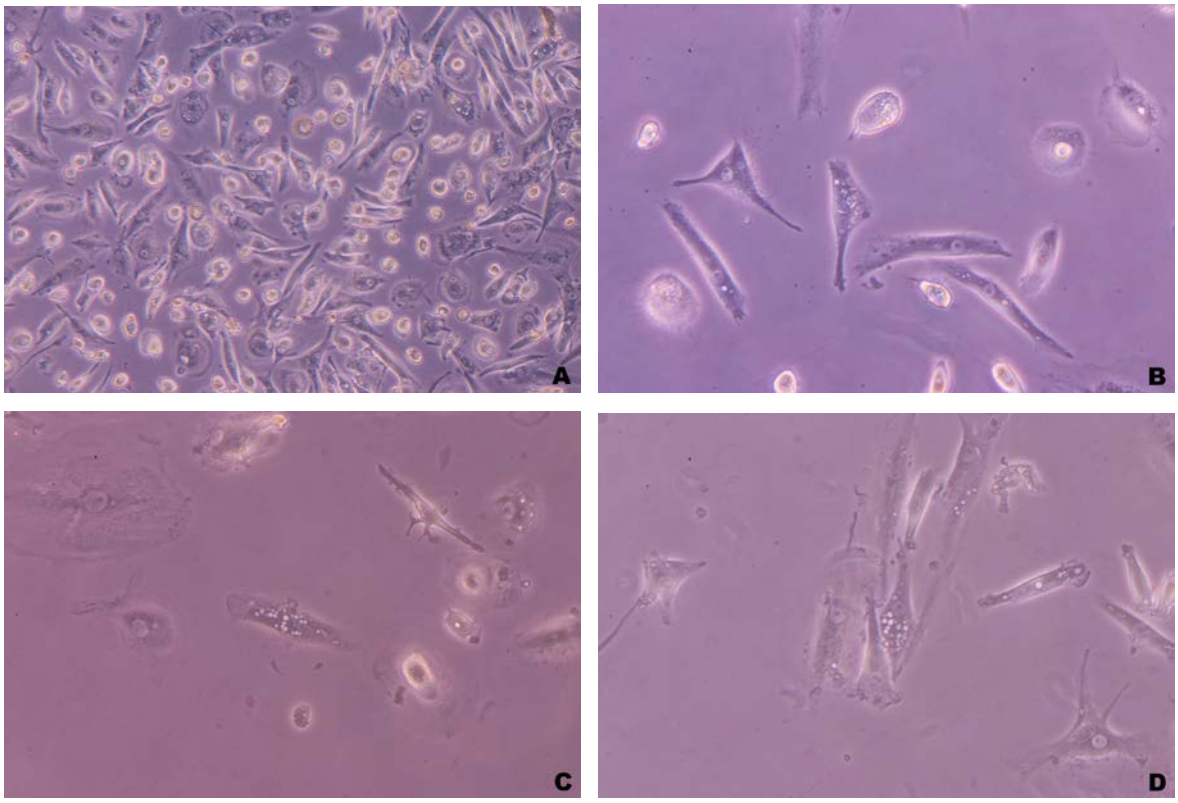


Abb. 29: Zehn Tage kultivierte und anschließend adipogen differenzierte multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) aus peripherem Blut. Übersicht und Vergrößerung vier Tage nach Beginn der Differenzierung (A,B). Hier zeigten sich erste vereinzelte Zellvakuolen in MSZ. Es lässt sich gut die inhomogene Zellgruppe erkennen, bestehend aus MSZ inmitten anderer kernhaltiger Zellfraktionen. Nach weiteren zehn Tagen Differenzierung (C,D) waren nur noch vereinzelt MSZ zu erkennen. In ihrem Zellinneren sind teilweise sehr viele Vakuolen entstanden. In C ist außerdem im linken oberen Bildabschnitt eine wie in Abb. 29 beschriebene makrophagenartige Riesenzelle zu erkennen.
Vergrößerung 100x (A), Vergrößerung 200x (B,C,D) mit Mikroskop Axiovert 35. Fotografiert mit Canon EOS 350D.

4. Diskussion

Seit ihrer Entdeckung von A.J. Friedenstein vor etwas über 30 Jahren im Knochenmark, wurden multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) oft und ausgedehnt erforscht und fast ebenso oft umbenannt. Mittlerweile sind diese Stammzellen, die wohl nicht nur mesenchymale Zelllinien hervorbringen können, von diversen Säugetieren aus unterschiedlichsten Organen, vor allem aber auch aus peripherem Blut isoliert und kultiviert worden. (31) Knochenmark ist das zellreichste und verlässlichste Reservoir für MSZ, wenn sie auch dort nur in geringer Konzentration von 0,001% - 0,01% existieren. (31, 65) Letztendlich noch nicht vollständig bewiesen, wird vor allem aus Versuchen *ex vivo* vermehrter MSZ, die systemisch appliziert wurden und in lädierte Gewebe und in Knochenmark wanderten, angenommen, dass im Knochenmark beheimatete MSZ auch in peripherem Blut zirkulieren können und bei Gewebeschädigung systemisch mobilisiert werden. Kaninchen wurden in einem Osteotomie-Model der Ulna nach Setzen einer Ulnafraktur *ex vivo*-markierte MSZ in die Knochenmarkshöhle des Tibiaknochens implantiert. Diese markierten MSZ wurden 3 Wochen später in dem neugebildeten Kallus der Ulnafraktur gefunden (31), was den Schluss auf eine systemische Mobilisierung aus dem Knochenmark nach Knochenfrakturen und ähnlich traumatischen Geschehnissen zulässt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer geeigneten Methode, zirkulierende MSZ in peripherem Blut nachzuweisen und im Rahmen orthopädischer Routineeingriffe, der Hüfttotalendoprothese (HTEP) sowie der Tripleosteotomie eine systemische Mobilisierung dieser MSZ aufzuzeigen. Ferner sollte die Kultivierung von im Blut zirkulierenden MSZ untersucht werden.
Vorgegangen wurde dabei nach den Kriterien des „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee“ der „International Society for Cellular Therapy“, die MSZ über drei Eigenschaften definieren: Spezielle Oberflächenmarker, Plastikadhärenz und multipotentes Differenzierungspotential. (26)

4.1. Etablierungsphase anhand multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmark

Für die Etablierung geeigneter Oberflächenmarker wurden multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) aus Knochenmark verwendet. Die dort bestimmten Positiv- und Negativmarker wurden später auf periphere Blut-MSZ übertragen, da es bislang nicht gelang eine homogene Population an MSZ aus peripherem Blut zu isolieren und zu kultivieren. Unklar ist allerdings, ob in peripherem Blut zirkulierende MSZ gleiche Oberflächenmarker besitzen wie Knochenmark-MSZ, oder ob diese Oberflächenmarker-Kombinationen durch noch unklare andere Bedingungen in anderem Milieu verändert werden, es sich bei zirkulierenden MSZ in peripherem Blut möglicherweise auch nur um bestimmte Subgruppen von Knochenmarks-MSZ handelt, die fähig sind aus Knochenmark auszuwandern. Am besten erforscht ist dieses Problem an den Markern Stro-1 und CD 133. Stro-1 gilt als Positivmarker für mesenchymale multipotente Stromazellen aus dem Knochenmark. Für MSZ in peripherem Blut zeigten sich dabei unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits zeigte sich Stro-1 als Positivmarker, andererseits waren in einer anderen Veröffentlichung MSZ in peripherem Blut negativ für Stro-1. (74, 13) CD 133 gilt als Negativmarker für Knochenmarks-MSZ und Marker hämatopoetischer Zellen. (15) Gleichzeitig konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass CD 133 - positive Zellfraktionen aus peripherem Blut in Kultur MSZ mit deutlich erhöhtem Proliferationspotential gegenüber unselektionierten Blutzellen hervorbringen. Somit ist CD 133 möglicherweise ein Oberflächenmarker, der mit einem wegen der erhöhten Proliferationsrate primitiveren Stammzellphänotyp assoziiert ist. Möglicherweise beinhaltet die CD 133 - positive Fraktion neben mesenchymalen auch hämatopoetische Zellen (65), die durch Ausschüttung von z.B. Wachstumsfaktoren die Proliferationsrate der MSZ in Kultur erhöhen. Auch könnten Unterschiede in der Oberflächenmarkerexpression von nativen und kultivierten MSZ existieren. In dieser Arbeit wurde angenommen, dass es sich bei MSZ in Knochenmark und in peripherem Blut um die gleichen Zellen handelt, die Etablierung an kultivierten Knochenmarkszellen somit möglich ist. Wie in vorangegangener Literatur beschrieben, waren in dieser Arbeit die Oberflächenmarker CD 9, CD 73, CD 166, CD 271, MSCA-1 und Stro-1 positiv für MSZ aus Knochenmark. CD 2, CD 45, CD

133 und CD 235a waren Negativmarker. (31, 65, 73) Der zu führende Beweis sollte durch Kultivierung und anschließende Differenzierung von MSZ aus peripherem Blut erfolgen.

4.2. Systemische Mobilisierung multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach orthopädischen Routineeingriffen

4.2.1. Optimierung der Messbedingungen

Blutproben wurden während Routineblutabnahmen gesammelt. Die Blutproben wurden zwei Tage nach Operation asserviert, also innerhalb der als günstig erachteten Zeitspanne von etwa 48 bis 72 Stunden. In diesem Zeitraum der frühen Knochenheilungsphase läuft eine Entzündungskaskade ab, die zur Mobilisierung der multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) beiträgt. (14) Die Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Verarbeitung der Zellen unterschied sich zwischen der Blutabnahme präoperativ und postoperativ. Die präoperative Blutabnahme fand einen Tag vor Operation statt. Die stationäre Aufnahme der Patienten erfolgte gegen Vormittag, die präoperative Blutabnahme fand um den frühen Nachmittag statt. Am zweiten Tag nach Operation wurde die postoperative Blutabnahme routinemäßig gegen 7 Uhr morgens abgenommen. Da aus zeitlichen Gründen bei postoperativen Blutproben keine frühere Verarbeitung möglich war, wurden diese im Schnitt 6 h später verarbeitet als präoperative Blutproben. Dass die Zeit zwischen Blutabnahme und Verarbeitung entscheidend für die Anzüchtung von MSZ ist, wurde schon früher beschrieben. (65) Es ist auch gelungen an der Innenwand verworfener Knochenmark-Aufbewahrungsbeutel, sogenannter „collection sets“, die nach Abschluss filtrierten Knochenmarks-explantationen zur Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen im Rahmen von Transplantationen verwendet wurden, an der Wand adhärente MSZ in hoher Anzahl zu isolieren. (20) Somit stellt sich die Frage, ob MSZ auch unter den in unserem Versuchsaufbau gegebenen Bedingungen adhärieren können, teilweise schon in der Phase zwischen Blutabnahme und Verarbeitung an den Innenwänden von Blutröhrchen adhärent geworden sind. Wenn ja, ob weitere sechs Stunden Differenz zwischen Abnahme und Verarbeitung ausreichen, um die Anzahl an MSZ postoperativ verarbeiteter Blutproben im Gegensatz präoperativer

Proben deutlich zu senken, vielleicht auch durch Veränderungen des Elektrolythaushaltes und somit des ph-Wertes.
Für durchflusszytometrische Messungen und die Kultivierung von MSZ aus peripherem Blut, wurden prä- und postoperativ jeweils nur 2 ml Blut erhalten. Da nicht nur die Zeit bis zur Verarbeitung sondern auch das Blutvolumen eine entscheidende Rolle vor allem für die Anzüchtung der MSZ spielt (65), könnten 2 ml Blut zu wenig gewesen sein, da durch diverse Waschschritte während der Aufbereitung regelmäßig Zellen verloren gehen. In anderen Forschungsansätzen wurden 500 ml antikoaguliertes humanes Blut von Transfusionszentren verwendet und angenommen, dass in dieser Menge einige Tausende MSZ vorhanden sein müssten. (74)
Die besten Ergebnisse wurden für mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) antikoaguliertes Blut, das bei Raumtemperatur aufbewahrt und am selben Tag verarbeitet wurde erzielt. Diese Methode wurde bei allen unseren Messungen angewandt. In anderen Arbeiten wurde die Art der Antikoagulation überwiegend nicht angegeben, zum Teil wurde ebenfalls EDTA, zum Teil auch Lysepuffer der Firma Becton Dickinson verwendet. (39, 54, 65, 74)

4.2.2. Charakterisierung mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen mittels Durchflusszytometrie

Die Schwere des Traumas spielt eine entscheidende Rolle in der Proliferation und der Reservoirzunahme von MSZ im Knochenmark. So wurden in Patienten mit multiplem Trauma starke Proliferations- und Reservoirzunahme multipotenter mesenchymaler Stromazellen in Knochenmark bei gleichzeitig stark erhöhten Werten verschiedener Wachstumsfaktoren im Serum festgestellt. In Patienten mit Monofrakturen konnte eine Abnahme des Reservoirs bei gleichbleibenden Proliferationsraten festgestellt werden. Das geringere Trauma führte möglicherweise nur zu einer Mobilisierung aus dem Knochenmark an Orte geschädigter Gewebe, ohne große Neuproduktion der Zellen und ohne systemischen Release von Wachstumsfaktoren. (58) Der einfachste Weg an geschädigte Orte zu gelangen ist dabei der Blutweg.

4.2.3. Zunahme multipotenter mesenchymaler Stromazellen nach Operation

Die erste Frage, die beantwortet wurde, war: zirkulieren überhaupt ständig MSZ in peripherem Blut. Hierzu wurde präoperatives Blut analysiert. Als zweite Frage stellte sich, ob nach Operation im Vergleich zu präoperativen Werten durch systemische Mobilisierung höhere Werte an für MSZ positiven Oberflächenmarker-tragenden Zellen durchflusszytometrisch festgestellt werden können.

In Vorarbeiten wurden schon MSZ aus peripherem Blut in gesunden Kontrollgruppen festgestellt. (65) Auch in unserem Versuchsaufbau mit 2 ml EDTA-Blut konnten präoperativ Zellen mit für mesenchymale Stromazellen positiven dreifach Oberflächenmarkerkombinationen gemessen werden. Allerdings konnte in der Forward- und Side-Scatter Einstellung diesen Zellen keine eindeutige Punktwolke zugeordnet werden, weswegen ohne Gate gemessen wurde. Anderen Forschungsgruppen gelang wohl eine genauere Einstellung allerdings von MSZ-Vorläufern, den VSELs, mithilfe von sechs verschieden großen Bead-Partikeln. (57) Möglicherweise sind native MSZ zu heterogen in ihrer Zellgröße und Dichte, oder aber es waren zu wenige Zellen in unseren Proben vorhanden.

Für alle Dreierkombinationen ließen sich zumindest Zellen in peripherem Blut anfärben. Die Anzahl gemessener Zellen zwischen den verschiedenen Dreierkombinationen schwankte aber beträchtlich, im Mittel zwischen 0,003 ±0,003 (2-/45-/235a-/166/73) und 1,09 ±0,86 (9/73/133-). Für die anderen Werte lag das Mittel bei 0,53 ±0,41 (9/166/MSCA-1), 0,41 ±0,32 (9/166/73), 0,08 ±0,03 (9/271/Stro-1) und 0,03 ±0,02 (9/73/133) (alle Werte in Prozent). Möglicherweise wurden mit den Dreierkombinationen eine unterschiedliche Anzahl anderer in der Messsuspension befindlicher Zellen mit angefärbt oder aber es fanden sich eine unterschiedlich große Anzahl verschiedener MSZ-Subpopulationen in peripherem Blut. (74) Die hohe Standardabweichung erklärt sich durch die individuell stark variierende Anzahl an nachgewiesenen MSZ in peripherem Blut. (31)

Vergleicht man präoperative wie postoperative Anstiege an positiven Dreierkombinationen, so führt sowohl die Kombination 9/166/MSCA-1 wie auch die Kombination 9/166/73 zu einem signifikanten Zellzahl-Anstieg ($\alpha < 0.5$).

Das Mittel steigt dabei um 0,38 auf 0,91 ±0,64 (9/166/MSCA-1) sowie um 0,35 auf 0,76 ±0,51 (9/166/73). Ein nicht-signifikanter Anstieg erfolgte um 0,03 auf 0,11 ±0,05 (9/271/Stro-1), um 0,007 auf 0,01 ±0,009 (2-/45-/235a-/166/73) und um 0,07 auf 1,16 ±0,9 (9/73/133-). Einzig die Kombination 9/73/133 führte zu keinem Anstieg bei einem Mittel von 0,03 ±0,02. Alle berechneten Werte sind Prozentwerte. Diese Dreierkombination blieb außer einer leichten Erhöhung des Maximalwertes völlig konstant. Möglicherweise sind die mobilisierten MSZ für CD 133 doch negativ oder CD 133 positive Zellen bilden doch einen primitiveren Stammzellphänotyp, der nicht mit aus dem Knochenmark ausgeschüttet wurde. (65) Es wurde festgestellt, dass CD 133 positive Zellen vor allem bei der Vasculogenese und dort im Sinne einer Stimulation eine Rolle spielen und außerdem die Blutperfusion und die Dichte von Kapillargefäßen verbessern. (42) Möglicherweise spielen diese Zellen bei anderen Arten von „Trauma“, beispielsweise bei Ischämien eine Rolle, sodass in unserem Modell, in dem die Osteogenese im Vordergrund steht, andere Untergruppen von MSZ mobilisiert wurden. Das würde auch erklären, dass die mit MSCA-1 ermittelte Markerkombination höhere Werte ergab, als z.B. die Kombination, in der CD 271 mitgemessen wurde. MSCA-1 repräsentiert die „Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase“, die vor allem eine erhöhte Osteoblastenaktivität indiziert. CD 271 dagegen entspricht dem „Nerve Growth Factor Receptor“, der dementsprechend bei der Osteogenese eine eher untergeordnete Rolle spielt. (6, 61)

Es zeigte sich jedenfalls in unseren Ergebnissen, dass eine systemische Mobilisierung nach traumatischen Ereignissen stattfand und dass das Trauma, das die beiden orthopädischen Routineoperationen setzten doch ausreichte, MSZ aus Knochenmark zu mobilisieren. Dabei führten die Kombinationen 9/166/MSCA-1 und 9/166/73 zu einem signifikanten Anstieg. Möglicherweise war die Patientenanzahl zu gering, um auch signifikante Werte in anderen Kombinationen zu erhalten, wobei durchaus ein eindeutiger Trend in Richtung Anstieg zu ermitteln ist. Offensichtlich wurden MSZ-Populationen die diese Oberflächenmarker trugen, besonders stark mobilisiert. Bei beiden Kombinationen war der prozentuale Anstieg in etwa gleich stark. Diese Konstanz und die Signifikanz ließ auf gute Antikörperkombinationen bei der Bestimmung zirkulierender multipotenter mesenchymaler Stromazellen schließen. Da festgestellt wurde, dass Stro-1 für eigentlich zirkulierende MSZ zum Großteil negativ zu sein schien (74), könnte nur

eine sehr kleine Gruppe Stro-1 positiver MSZ in peripherem Blut vorhanden gewesen sein, was die geringere prozentuale Anzahl und den nicht so starken postoperativen Anstieg hätte erklären können. Unklar war die verschwindend geringe Anzahl an 2-/45-/235a-/166/73 – markierten Zellen in der FACS-Analyse. Möglicherweise sorgte die dreifach Negativantikörperkombination für eine starke Aussortierung hämatopoetischer Zellen und diese dreifach Selektion spiegelte den tatsächlichen Anteil an MSZ in peripherem Blut wieder. Dass die dreifach Negativkombinationen in einem FACS-Kanal tatsächlich messtechnisch funktioniert, wurde festgestellt. (73)

Da unklar war, wie sich MSZ in peripherem Blut gegenüber den Oberflächenmarkern Stro-1 und CD 133 verhalten (31, 65), wurden diese Kombinationen zur Bestimmung von im Blut zirkulierenden MSZ herangezogen. Wie sich in der Arbeit zeigte waren diese jedoch nicht gut geeignet. Gute Kombinationen, die signifikante Werte erbrachten und typische Oberflächenmarker für MSZ enthielten (15), waren folglich die verwendeten Kombinationen 9/166/MSCA-1 und 9/166/73.

4.2.4. Unterschiede der Operationsart auf die systemische Mobilisierung

Unterscheidet man zwischen den beiden verschiedenen Operationen, spielte indirekt das Patientenalter eine Rolle, welches Auswirkung auf die Mobilisation haben könnte. (58)

In der Gegenüberstellung des Medians der Operationstypen unterschieden sich die Dreierkombinationen ganz erheblich voneinander. Prinzipiell bestand außer in den Kombination 9/73/133 und 9/73/133- für die HTEP-Operation eine schon präoperativ stark erhöhte Anzahl zirkulierender Zellen für die übrigen Markerkombinationen.

Es wurde beobachtet, dass inflammatorische Zytokine und Chemokine wie beispielsweise Interleukin-6 zu einer erhöhten Migrationsrate von Knochenmarks-MSZ in Matrigelen führen. (64) Da Tripleosteotomien eher bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen durchgeführt werden, um einer Arthrosebildung und damit einer ständigen Entzündungsreaktion des jeweilig betroffenen Gelenkes vorzubeugen, eine HTEP aber bei vorwiegend alten, komorbiden Patienten mit unter anderem chronisch geschädigten und deshalb chronisch entzündeten

Hüftgelenken eingebaut wird, dürfte im Arthrosekollektiv schon vorweg eine inflammatorische Immunitätslage vorliegen, die mit generell erhöhten zirkulierenden MSZ-Werten im Blut einhergeht. (64) Welche Operationsart an sich das größere Trauma bewirkt ist schwer zu sagen. Vielleicht könnten anhand des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein zusammen mit einer Erhöhung von Leukozytenwerten oder auch der Länge des Krankenhausaufenthaltes weitere Schlüsse gezogen werden. Dies wäre im Hinblick auf nachfolgende Arbeiten ein lohnenswertes Thema.

Verglich man bei 9/166/MSCA-1 die Operationsarten, so stieg in beiden Fällen die postoperative Zellanzahl. Dabei stieg der Median bei der Tripleosteotomie um 0,13% von 0,19 ±0,07 auf 0,32 ±0,44, bei der HTEP-Operation auf fast den 3-fachen Wert, nämlich um 0,37% von 0,73 ±0,40 auf 1,1 ±0,61. Für die Kombination 9/166/73 fiel dagegen der Median bei der Tripleosteotomie um 0,07% von 0,19 ±0,03 auf 0,12 ±0,55, dabei stieg er bei der HTEP-Operation enorm an, um 0,65% von 0,34 ±0,35 auf 0,99 ±0,46. Bei 9/271/Stro-1 kam es bei der Tripleosteotomie zu keinem Anstieg bei einem Median von 0,08, bei der HTEP-Operation kam es zu einem minimalen Anstieg um 0,01% von 0,09 ±0,03 auf 0,01±0,06. In der Kombination 2-/45-/235a-/166/73 stieg bei der Tripleosteotomie der Median um 0,01% von 0,002 ±0,001 auf 0,012 ±0,01, bei der HTEP-Operation dagegen blieb der Median bei 0,02. In dieser Kombination stieg in der Tripleosteotomie-Fraktion der Wert postoperativ auf das sechsfache. In der Kombination 9/73/133 kam es zu einem Anstieg des Medians bei der Tripleosteotomie um 0,02% von 0,03 ±0,02 auf 0,05 ±0,04, bei der HTEP-Operation blieb der Median konstant bei 0,02. Letztendlich kam es bei der Tripleosteotomie in der Kombination 9/73/133- zu einem Abfall des Medians um 0,09% von 1,07 ±1,34 auf 0,98 ±1,37, während bei der HTEP-Operation ein Anstieg um 0,07% von 0,79 ±0,35 auf 0,86 ±0,49 des Medians gezeigt werden konnte. Fraglich ist, warum die einzelnen Marker in Bezug auf die OP-Art ein so unterschiedliches Ergebnis lieferten. Zu erwarten gewesen wäre bei der HTEP zum Einen eine Verringerung zirkulierender MSZ gegenüber der Tripleosteotomie, zum Anderen eine verringerte systemische Mobilisierung in Verbindung mit einer erhöhten Anzahl von Apoptosezeichen. (22) Einige Forschungsergebnisse ließen auf vermindertes Proliferationspotential multipotenter mesenchymaler Stromazellen in älteren Patienten schließen. (22,

23) Wiederum andere Ergebnisse konnten keine Unterschiede bezüglich der „zellulären Tauglichkeit“ von MSZ von Spendern unterschiedlichen Alters feststellen. Allerdings wurden hier eher Kinder (8 Monate - 6 Jahre) mit Erwachsenen (38 Jahre - 58 Jahre) verglichen (43), während Patienten dieses Versuchsaufbaus zwischen 12 und 27 Jahren für Tripleosteotomien und zwischen 44 und 80 Jahren für HTEP-Operationen lagen. Möglicherweise werden in unterschiedlich alten Patienten aus noch unbekannten Gründen unterschiedliche Subgruppen an MSZ mobilisiert.

Trotz der mehrfach berichteten Reduktion an MSZ im Alter (22, 23) stand in unserer FACS-Analyse eine eher erhöhte Zirkulation und Mobilisation von MSZ in peripherem Blut bei der älteren Patientengruppe mit HTEP im Vordergrund. Möglicherweise stellt für jüngere Patienten ein operativer Eingriff ein weniger großes Trauma dar.

Sowohl das unterschiedliche Patientenalter, als auch die unterschiedliche OP-Methode könnten eine Rolle in der Mobilisation von MSZ spielen. Beide Einflussfaktoren konnten nicht voneinander getrennt werden. Außerdem unterschied sich die Patientenanzahl zwischen den OP-Arten beträchtlich. Während bei der HTEP-Operation peripheres Blut von acht (2-/45-/235a-/166/73; 9/271/Stro-1) bzw. neun (9/166/MSCA-1; 9/166/73; 9/73/133; 9/73/133-) Spendern gemessen werden konnte, waren es bei der Tripleosteotomie nur zwei (2-/45-/235a-/166/73;9/271/Stro-1), drei (9/166/73;9/73/133-) und fünf (9/166/MSCA-1; 9/73/133) Spender, die analysiert werden konnten. Fraglich ist, ob diese geringe Anzahl der Tripleosteotomiepatienten überhaupt verwertbare Werte hervorbringen konnte. Die geringe Patientenanzahl dieser OP-Methode lag zum Teil an internen Gründen, zum Teil an Ausreißerwerten, die sich allesamt in den Blutproben von Tripleosteotomiepatienten befanden. Ausreißerwerte wurden mithilfe des Ausreißertests nach Dixon berechnet und ausgesondert. Der Ausreißertest ist geeignet für kleine Stichprobenumfänge unter etwa 30 Werten. (30) Ursächlich dafür, dass sich die Ausreißerwerte in der Gruppe der Tripleosteotomiepatienten fanden, könnte die jeweils unterschiedlich starke Traumatisierung der Patienten dieser eher individuell ausgeführten OP-Methode sein im Gegensatz zum „standardisierteren“ Verfahren der HTEP – Implantation. Da davon ausgegangen wurde, dass MSZ in einzelnen Individuen in unterschiedlich hoher Anzahl gefunden werden (31), wurden Ausreißerwerte nur aus der Differenz

postoperativer zu präoperativer Messung berechnet, nicht aber aus Werten der einzelnen Messungen. Ausreißerwerte fanden sich in den Kombinationen 2-/45-/235a-/166/73 sowie 9/271/Stro-1 (jeweils ein Ausreißerwert) und 9/73/133- (zwei Ausreißerwerte). In den übrigen drei Kombinationen fanden sich keine Ausreißer, was wiederum für 9/166/MSCA-1 und 9/166/73 als gute Oberflächen-markerkombination sprach.

Gezeigt werden konnte, dass für MSZ typische oberflächenmarkertragende Zellen in peripherem Blut zirkulieren, und sich die Anzahl dieser Zellpopulation nach orthopädischen Routineoperationen im Sinne einer systemischen Mobilisierung erhöhte. Dabei bildeten vor allem die Antikörperkombinationen 9/166/MSCA-1 und 9/166/73 eine konstante und auch signifikante Aussage über diese Zellpopulation.

4.3. Kultivierung systemisch mobilisierter multipotenter mesenchymaler Stromazellen

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) sind nur spärlich in peripherem Blut vorhanden. (65) Versuche MSZ aus peripherem Blut zu isolieren und zu kultivieren verliefen oft frustran. (65, 74) Mit Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) mobilisiertes Blut schien für die Kultivierung von peripheren MSZ am Besten geeignet. (65) MSZ aus peripherem Blut, obwohl rein morphologisch den Knochenmarks-MSZ vergleichbar, ließen sich auch mit unserer Methode nur schwer kultivieren und überlebten nur im Zellverband mit anderen kernhaltigen Zellen. Beim Versuch ihrer Isolation mittels Passagierung durch Trypsinierung starben sie meist innerhalb eines Tages ab. Ein erster Ansatzpunkt für das Problem der mühsamen Kultivierung dieser Zellen im Gegensatz zu Knochenmarks-MSZ, könnte sein, dass MSZ zu Beginn ihrer Proliferationsphase in Kultur mindestens vier verschiedene Wachstumsfaktoren benötigen: platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- β und epidermal growth factor. (31) Diese Wachstumsfaktoren werden bei Kultivierung der MSZ aus Knochenmark wohl ausreichend von den übrigen in Kultur befindlichen hämatopoetischen mononukleären Zellen (HMNZ) produziert. Möglicherweise benötigen periphere MSZ andere Wachstumsfaktoren zum Proliferationsbeginn oder aber kultivierte HMNZ aus Knochenmark unterscheiden

sich von kultivierten HMNZ aus peripherem Blut in der Expression ihrer Wachstumsfaktoren oder aber die Bildung dieser Faktoren ist bei peripher isolierten HMNZ verringert. (31) Eventuell findet die Proliferationsphase multipotenter mesenchymaler Stromazellen, ebenso wie bei hämatopoetischen Zelllinien, fast ausschließlich im Knochenmark statt, von wo aus sie dann in jeweils nur geringer Anzahl in peripheres Blut ausgeschüttet werden, während eine Proliferationsphase der MSZ aus peripherem Blut in Kultur ausbleibt. (31) MSZ Kulturen aus peripherem Blut benötigen etwa 1 x 10^6 Zellen pro cm^2 zum Starten der Kultur, bei MSZ Kulturen aus Knochenmark sind es dabei nur etwa 1 x 10^4 Zellen. (65) Eventuell war die Blutmenge zu gering, um einen ordentlichen Proliferationsbeginn einzuleiten und mit Wegnahme der Wachstumsfaktoren durch den Versuch der Isolation mittels Trypsinierung blieb der Proliferationsbeginn vollständig aus. Bekannt ist, dass sich die Zellen durchaus auch in entgegengesetzter Richtung beeinflussen. B-Zell-Vorläufer benötigen für ihr Wachstum und Reifung ebenso engen Kontakt zu MSZ aus Knochenmark, auch T-Zellen werden in ihrer Aktivierung und Proliferation beeinflusst von MSZ. (48, 74)

Aus welchen Gründen auch immer das Überleben der MSZ aus peripherem Blut von anderen kernhaltigen Zellen abzuhängen scheint, erwiesen ist, dass das verwendete Medium für das Wachstum hämatopoetischer Zellen wie Lymphozyten oder Monozyten nicht förderlich ist. Mit dem Absterben hämatopoetischer Zellreihen könnten somit auch MSZ aus peripherem Blut mit untergehen. (74) Möglicherweise benötigen MSZ aus peripherem Blut andere oder weitere Supplemente im Kulturmedium. (66) Es könnte sein, dass das im Medium enthaltene Kälberserum in peripherer Blutkultur befindliche ausgereifte T-Zellen aktiviert und eine Immunreaktion mit Ausschüttung von Zytokinen stattfindet, die MSZ in ihrem Wachstum schaden könnten. (47) Ebenso könnte auch hier die Zeit bis zur Verarbeitung der Proben und die Temperatur eine wichtige Rolle spielen. (35, 41) Möglicherweise müssen für eine Isolation von MSZ aus peripherem Blut andere Methoden als Trypsin in Betracht gezogen werden. Dass Trypsin auf jeden Fall Auswirkung auf die Zellen hat, ist erwiesen. (55)

Auch die Anwendung verschiedener Dichtegradienten erbringt unterschiedliche Ergebnisse. (74) Für die vorliegende Arbeit wurde ein Biocoll-Dichtegradient der

Dichte 1,077 g/ml verwendet. Möglicherweise hätte eine Erythrozytenlyse bessere Ergebnisse erbracht, da die Gefahr Zellen durch Dichtegradientzentrifugation zu verlieren, wegfällt. Auf die Erthrozytenlyse wurde in vorliegender Arbeit bewusst verzichtet, da möglicherweise das frei werdende Kalium aus zerstörten Erythrozyten mit nachfolgender Auswirkung auf den ph-Wert schädlich für MSZ gewesen wäre. Möglicherweise wären dann „very small embryonic like stem cells“ (VSELs), als Vorläuferzellen von MSZ noch verblieben, sodass letztlich bessere Ergebnisse in FACS-Analyse und Kultivierung erzielt worden wären. Aufgrund ihrer geringen Größe (kleiner als Erythrozyten) wurden die VSELs durch die in vorliegender Arbeit angewandte Dichtegradientzentrifugation eliminiert. (72)
Auffällig ist, dass MSZ beim Versuch der osteogenen Differenzierung sofort abstarben, während eine adipogene Differenzierung durchaus für eine bestimmte Zeit Erfolg hatte. Interessant war, dass nach mehreren Tagen makrophagenähnliche Riesenzellen offenbar abgestorbene MSZ im Sinne einer Hämophagozytose eliminierten. Diese ist bislang beschrieben bei mehreren angeborenen Immundefekten bei Kindern, bei Viruserkrankungen der Herpesgruppe, bei malignen Lymphomen insbesondere bei Erwachsenen, bei rheumatischen Erkrankungen, bei einem Hanta – Virusinfekt und einmal auch bei einer pneumonischen Infektion mit Acinetobacter baumanii. (34, 71) Letztlich verbleibt hier noch reichlich Raum für künftige Forschungsarbeiten.

Tatsache ist, dass MSZ aus peripherem Blut unter den gleichen Bedingungen sehr viel schwerer zu kultivieren sind als Knochenmarks-MSZ. Was allerdings die genaue Ursache ist konnte bislang noch nicht ausreichend geklärt werden. Bei sehr geringer Zellzahl könnten schon leichte Verunreinigungen, Verschiebungen im ph-Wert sowie Zellnoxen wie Trypsin eine hohe Auswirkung auf MSZ in peripherem Blut besitzen. (65)

4.4. Schlussfolgerung

Prozentzahlen von z.B. 0,02 % bei 500 000 gemessenen Zellen in 2 ml verwendeten Blutes erscheinen zunächst gering. Bei einem Körperblutvolumen von etwa 70 ml pro kg Körpergewicht errechnet sich bei einem erwachsenen Mann mit einem Körpergewicht von 85 kg ein Blutvolumen von rund 6 l. (33) Hochgerechnet auf das Gesamtkörperblutvolumen würden somit rund 300 000 multipotente mesenchymale Stromazellen zirkulieren. Berücksichtigt man zusätzlich, dass nicht die ganzen 2 ml vorhandenes Blut in ein einziges Messröhrchen für die Durchflusszytometrie gelangte, sondern insgesamt auf 8 Röhrchen aufgeteilt wurde, ergibt sich immerhin eine Zahl von rund 2,4 Mio zirkulierender Zellen.

Blut stellt schon jetzt eine wichtige Quelle für hämatopoetische Stammzellen in z.B. Zelltherapien nach Chemotherapie dar. (65) Knochenmarks-MSZ werden schon heute bei Krankheiten wie der kongenitalen Tibiapseudarthrose erfolgreich im Rahmen der Verbesserung der Knochenstruktur und Normalisierung der Knochenumgestaltung eingesetzt. (63) Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich zirkulierende MSZ auch in peripherem Blut befinden und bei Trauma, z.B. im Rahmen von orthopädischen Operationen, in erhöhtem Umfang in peripheres Blut mobilisiert werden. MSZ tragen nach Trauma dazu bei geschädigtes Gewebe - in der vorliegenden Arbeit Knochengewebe nach iatrogener Fraktur - zu reparieren und zu remodellieren und eine gute Knochenhomöostase wieder herzustellen. (18, 19) Durch gezielten Einsatz dieser Zellen können möglicherweise nicht nur ein akutes Trauma, sondern auch degenerative Gewebsuntergänge, z.B. im Rahmen einer Arthrose, vielleicht auch der Osteoporose in neuen Dimensionen therapiert werden. (27)
Multipotente mesenchymale Stromazellen aus peripherem Blut dürften aufgrund ihrer leichteren Gewinnung als Knochenmarks-MSZ zu interessanten Zellen für weitere Anwendungen im Bereich der Zelltherapie und des Tissue Engineering werden. (31) MSZ greifen in die unterschiedlichsten Pathologien des Körpers ein, sie wirken sich positiv auf Tumorelimination bei z.B. Fibrosarkomen (69) oder Pancreas-Ca (37) aus, nehmen ebenso Einfluss auf veränderte Immunitätslagen wie beispielsweise bei M. Crohn (16) und GvHD-Reaktionen (36), aber auch auf

Erbkrankheiten wie der dystrophen Epidermolysis bullosa. (24) Auch in Organen, die bislang als nicht sonderlich regenerationsfähig erachtet wurden, wie z.B. Herzmuskel und Gehirn, konnten MSZ dank ihrer Fähigkeit in verschiedenste Zelllinien zu differenzieren, bei der Regeneration von untergegangenem Gewebe z.B. bei ischämischen Vorgängen, nachgewiesen werden. (29, 44, 49) Nach heutigem Wissensstand müssen MSZ für therapeutische Ansätze aus Knochenmark entnommen werden und *in vitro* vermehrt werden. Dieser Weg ist schmerzhaft und langwierig und birgt auch Gefahren für den Patienten, da z.B. mit Kälberserum versetztes Medium, das üblicherweise zur Kultivierung von MSZ verwendet wird, zur Übertragung infektiöser Agentien, aber auch zu heftigen Immunreaktionen durch Fremdantigene führen kann. (47) Da nachgewiesen werden konnte, dass eine systemische Mobilisierung bei Trauma durchaus stattfinden kann, kann möglicherweise auch eine Mobilisierung durch noch unerforschte Stoffe stattfinden. Die durch diese Technik einfach aus dem Blut entnommenen MSZ könnten schnell und effizient für therapeutische Zwecke unterschiedlichster Art benutzt werden. Dieses Terrain ist jedoch noch in weiten Teilen unerforscht und bedarf unbedingt weiterer nachhaltiger Forschung. Nach wie vor können auch Nachteile in der Verwendung multipotenter mesenchymaler Stromazellen wie beispielsweise eine maligne Transformation in Tumorzellen bei heutigem Wissensstand nicht ausgeschlossen werden. (51)

5. Zusammenfassung

Entstehung und Ausbildung mesenchymalen Gewebes beruht überwiegend auf der Population einer sehr kleinen Anzahl multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ), die in den letzten Jahren zunehmend aufgrund ihrer Beteiligung an Reparaturprozessen des menschlichen Körpers, aber auch als künftige zelluläre Basis für Gewebsersatz in das wissenschaftliche Interesse gerückt sind. Diese vorwiegend im Knochenmark nachweisbaren Zellen sind insbesondere nach traumatischen Ereignissen auch systemisch im peripheren Blut nachweisbar.

Ziel und Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der prä- und postoperative Nachweis im Blut zirkulierender MSZ, anhand zweier Operationsverfahren (Triple-Osteotomie und Hüfttotalendoprothese, kurz HTEP) mit unterschiedlich altem Patientenkollektiv. Die Anzahl im Blut nachweisbarer MSZ wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei dienten bereits etablierte MSZ aus Knochenmark als Kontrollzellen.

Vorarbeiten für die Messmethodik im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren u. a. die Optimierung der Messbedingungen für die FACS-Analyse sowie die Untersuchung der Lagerungsfähigkeit der Zellen. Die besten Ergebnisse lieferte mit Ethylendiamintetraessigsäure antikoaguliertes Blut, das bei Raumtemperatur aufbewahrt und am selben Tag verarbeitet wurde. Diese Methode wurde bei allen Messungen angewandt. Bislang ist kein spezifisches Oberflächenmarkerprotein bekannt, um MSZ ausreichend zu charakterisieren. Daher wurden zehn allgemein akzeptierte Antikörper in sechs Antikörper-Dreierkombinationen ausgewählt. Die Anzahl systemisch mobilisierter MSZ wurde mittels FACS-Analyse jeweils vor und zwei Tage nach Operation bestimmt. In den postoperativen Proben zeigte sich in fast allen Antikörper-Kombinationen eine z. T. deutliche Zunahme von MSZ, wobei die Kombinationen 9/166/MSCA-1 sowie 9/166/73 aufgrund ihres signifikanten postoperativen Anstieges als besonders geeignet identifiziert wurden.

In der Gegenüberstellung der Operationstypen besteht überwiegend für die HTEP eine schon präoperativ stark erhöhte Anzahl zirkulierender MSZ. Da Tripleosteotomien bei Jugendlichen durchgeführt werden um einer Arthrosebildung mit ständiger Entzündungsreaktion vorzubeugen, eine HTEP aber bei vorwiegend alten, komorbiden Patienten mit arthrotischen, chronisch

entzündeten Hüftgelenken implantiert wird, liegt bei HTEP-Patienten schon vorweg eine inflammatorische Immunitätslage vor, die generell erhöhte MSZ - Werte im Blut bedingt. Dementsprechend zeigt sich trotz der mehrfach berichteten Reduktion an MSZ im Alter, in unserer FACS-Analyse bei der älteren HTEP-Patientengruppe eine eher erhöhte Zirkulation und Mobilisation von MSZ in peripherem Blut. Möglicherweise stellt für jüngere Patienten ein operativer Eingriff auch ein weniger großes Trauma dar. Sowohl das unterschiedliche Patientenalter, als auch die unterschiedliche OP-Methode spielt eine Rolle in der Mobilisation von MSZ. Beide Einflussfaktoren sind jedoch nicht voneinander zu trennen.

MSZ aus Knochenmarkaspirat wurden erfolgreich adipogen und osteogen differenziert. Um zu beweisen, dass die verwendeten Antikörperkombinationen tatsächlich zulassen, auch systemisch mobilisierte MSZ zu bestimmen, wurden diese kultiviert, was bislang nur selten gelang. Nach sechs Tagen fanden sich zahlreiche typische, morphologisch nicht von MSZ aus Knochenmark zu unterscheidende Stromazellen. Diese waren hinsichtlich ihrer Ablösung aus ihrem „gewohnten“ Zellverband jedoch sehr sensibel. Auch die Anwendung eines mit Wachstumsfaktor versetzten Mediums brachte keine Lebensverlängerung oder weitere Vermehrung. In der adipogenen Differenzierung zeigten sich im Verlauf zahlreiche Zellvakuolen, wobei zu diesem Zeitpunkt aber nur noch einzelne Zellen verblieben. Eine Zellfärbung konnte nicht mehr erfolgen. Osteogen ließen sich die Zellen nicht differenzieren. In mehreren Ansätzen starben die Zellen innerhalb weniger Tage vollständig ab. Interessanterweise zeigten sich nach etwa 15 Tagen in Kultur mehrfach makrophagenartige, riesige Gebilde, die die offenbar abgestorbenen MSZ einschlossen und „hämophagozytierten“.

Blut stellt schon jetzt eine wichtige Quelle für hämatopoetische Stammzellen dar. Knochenmarks-MSZ werden schon heute im Rahmen der Verbesserung der Knochenstruktur und Normalisierung der Knochenumgestaltung eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich leicht isolierbare MSZ in peripherem Blut befinden und bei Trauma zusätzlich mobilisiert werden. Diese MSZ bieten sich an für weitere Anwendungen im Bereich der Zelltherapie und des Tissue Engineering. Dieses noch in weiten Teilen unerforschte Terrain bedarf weiterer nachhaltiger Forschung. Nach wie vor können auch Nachteile in der Verwendung von MSZ, beispielsweise eine maligne Transformation in Tumorzellen, bei heutigem Wissensstand nicht ausgeschlossen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. All Things Stem Cell: The Three Germ Layers, 2009, <http://www.allthingsstemcell.com/wp-content/uploads/2009/03/gastrula_layers_mesenchymal.gif> (28.03.2010)

2. BD Biosciences: FACSCalibur, 2011, <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/index.jsp> (08.04.2010)

3. BD Biosciences: Fluorochrome Reference Chart 2011, <http://www.icmb.utexas.edu/core/Microscopy/pdf/bd-fluorochrome-info.pdf> (08.04.2010)

4. Beckman Coulter: Principle of flow cytometry, 2011, <http://www.coulterflow.com/bciflow/history.php> (08.04.2010)

5. BioLegend: PE anti-human CD166, Product Data Sheet, 2011, <http://www.biolegend.com/pe-anti-human-cd166-antibody-6055.html> (17.11.2011)

6. BioLegend: PE anti-human CD271 (NGFR), Product Data Sheet, 2011, <http://www.biolegend.com/pe-anti-human-cd271-ngfr-antibody-6428.html> (17.11.2011)

7. Cytopeutics Sdn. Bhd Pioneering Stem Cell Treatment and Research Mesenchymal Stem Cell 2009, <http://www.cytopeutics.com/Images/MSC.jpg> (28.03.2010)

8. Ebioscience: Human-CD235a, Product Data Sheet, 2011, <http://www.ebioscience.com/human-cd235a-antibody-apc-hir2.htm> (17.11.2011)

9. Ebioscience: Mouse-CD9 Antibody, Product Data Sheet 2011, <http://www.ebioscience.com/mouse-cd9-antibody-fitc-ebiokmc8.htm> (17.11.2011)

10. Osteocord bone from blood: MSC Multilineage Differentiation Potential, 2005, <http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/osteogenesis.html> (28.03.2010)

11. Weizmann Institute of Science: Bone-resorbing osteoclasts induce stem cell mobilization in response to inflammatory and other stress signals, 2008, <www.weizmann.ac.il/imm/LapidotPage.html> (28.03.2010)

12. Zentrum für Regenerationsbiologie und Regenerative Medizin Universitätsklinikum Tübingen: The stem cell niche, 2007, <http://www.regmed.uni-tuebingen.de/files/3the_stem_cell_niche_338x252.jpg> (28.03.2010)

13. Afanasyev, B., Elstner, E., Zander, A.: A.J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept, Cell Ther and Transplant.; 1:e.000029.01. doi:10.3205/ctt-2009-en-000029.01, 1-3, 2009

14. Alm, J. J., Koivu, H. M., Heino, T. J., Hentunen, T. A., Laitinen, S., Aro, H. T.: Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients, J Orthop Res, 28, 1634-1642, 2010

15. Battula, V. L., Treml, S., Bareiss, P. M., Gieseke, F., Roelofs, H., de Zwart, P., Muller, I., Schewe, B., Skutella, T., Fibbe, W. E., Kanz, L., Buhring, H. J.: Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1, Haematologica, 94, 173-184, 2009

16. Bernardo, M. E., Avanzini, M. A., Ciccocioppo, R., Perotti, C., Cometa, A. M., Moretta, A., Marconi, M., Valli, M., Novara, F., Bonetti, F., Zuffardi, O., Maccario, R., Corazza, G. R., Locatelli, F.: Phenotypical/functional characterization of in vitro-expanded mesenchymal stromal cells from patients with Crohn's disease, Cytotherapy, 11, 825-836, 2009

17. Bittira, B., Shum-Tim, D., Al-Khaldi, A., Chiu, R. C.: Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction, Eur J Cardiothorac Surg, 24, 393-398, 2003

18. Bobis, S., Jarocha, D., Majka, M.: Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications, Folia Histochem Cytobiol, 44, 215-230, 2006

19. Bruder, S. P., Fink, D. J., Caplan, A. I.: Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy, J Cell Biochem, 56, 283-294, 1994

20. Capelli, C., Salvade, A., Pedrini, O., Barbui, V., Gotti, E., Borleri, G., Cabiati, B., Belotti, D., Perseghin, P., Bellavita, P., Biondi, A., Biagi, E., Rambaldi, A., Golay, J., Introna, M.: The washouts of discarded bone marrow collection bags and filters are a very abundant source of hMSCs, Cytotherapy, 11, 403-413, 2009

21. Caplan, A. I.: Why are MSCs therapeutic? New data: new insight, J Pathol, 217, 318-324, 2009

22. Choumerianou, D. M., Martimianaki, G., Stiakaki, E., Kalmanti, L., Kalmanti, M., Dimitriou, H.: Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults, Cytotherapy, 12, 881-887, 2010

23. Coipeau, P., Rosset, P., Langonne, A., Gaillard, J., Delorme, B., Rico, A., Domenech, J., Charbord, P., Sensebe, L.: Impaired differentiation potential of human trabecular bone mesenchymal stromal cells from elderly patients, Cytotherapy, 11, 584-594, 2009

24. Conget, P., Rodriguez, F., Kramer, S., Allers, C., Simon, V., Palisson, F., Gonzalez, S., Yubero, M. J.: Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa, Cytotherapy, 12, 429-431, 2010

25. Deans, R. J., Moseley, A. B.: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses, Exp Hematol, 28, 875-884, 2000

26. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, Cytotherapy, 8, 315-317, 2006

27. Fickert, S., Fiedler, J., Brenner, R. E.: Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting, Osteoarthritis Cartilage, 11, 790-800, 2003

28. Florek, M., Haase, M., Marzesco, A. M., Freund, D., Ehninger, G., Huttner, W. B., Corbeil, D.: Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer, Cell and tissue research, 319, 15-26, 2005

29. Habisch, H. J., Liebau, S., Lenk, T., Ludolph, A. C., Brenner, R., Storch, A.: Neuroectodermally converted human mesenchymal stromal cells provide cytoprotective effects on neural stem cells and inhibit their glial differentiation, Cytotherapy, 12, 491-504, 2010

30. Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H.: Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik, Oldenbourg, München, 14, 83-87|243|269-380, 2005

31. He, Q., Wan, C., Li, G.: Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood, Stem Cells, 25, 69-77, 2007

32. Heckmann, L.: Gewebeersatz von Sehnen und Bändern: Untersuchungen zum Einfluss löslicher Faktoren und verschiedener Matrices auf humane multipotente mesenchymale Stromazellen, Humanbiologische Dissertation, Universität Ulm, 2007

33. Herold, G.: Innere Medizin, Herold, Gerd, Köln, 7, 20, 2011

34. Janka, G. E.: Hemophagocytic syndromes, Blood reviews, 21, 245-253, 2007

35. Jansen, J., Nolan, P. L., Reeves, M. I., Morgan, J. A., Akard, L. P., Thompson, J. M., Dugan, M. J., Hanks, S. G.: Transportation of peripheral blood progenitor cell products: effect of ambient temperature, Cytotherapy, 12, 919-923, 2010

36. Joo, S. Y., Cho, K. A., Jung, Y. J., Kim, H. S., Park, S. Y., Choi, Y. B., Hong, K. M., Woo, S. Y., Seoh, J. Y., Cho, S. J., Ryu, K. H.: Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner, Cytotherapy, 12, 361-370, 2010

37. Kidd, S., Caldwell, L., Dietrich, M., Samudio, I., Spaeth, E. L., Watson, K., Shi, Y., Abbruzzese, J., Konopleva, M., Andreeff, M., Marini, F. C.: Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment, Cytotherapy, 12, 615-625, 2010

38. Kolf, C. M., Cho, E., Tuan, R. S.: Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation, Arthritis Res Ther, 9, 204, 2007

39. Kucia, M. J., Wysoczynski, M., Wu, W., Zuba-Surma, E. K., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z.: Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood, Stem Cells, 26, 2083-2092, 2008

40. Le Blanc, K., Pittenger, M.: Mesenchymal stem cells: progress toward promise, Cytotherapy, 7, 36-45, 2005

41. Lee, K. A., Shim, W., Paik, M. J., Lee, S. C., Shin, J. Y., Ahn, Y. H., Park, K., Kim, J. H., Choi, S., Lee, G.: Analysis of changes in the viability and gene expression profiles of human mesenchymal stromal cells over time, Cytotherapy, 11, 688-697, 2009

42. Lopez-Holgado, N., Alberca, M., Sanchez-Guijo, F. M., Villaron, E. M., Rivas, J. V., Lopez-Novoa, J. M., Brinon, J. G., Arevalo, M. A., Oterino, E., Santamaria, C., San Miguel, J. F., del Canizo, M. C.: Prospective comparative analysis of the angiogenic capacity of monocytes and CD133+ cells in a murine model of hind limb ischemia, Cytotherapy, 11, 1041-1051, 2009

43. Lund, T. C., Kobs, A., Blazar, B. R., Tolar, J.: Mesenchymal stromal cells from donors varying widely in age are of equal cellular fitness after in vitro expansion under hypoxic conditions, Cytotherapy, 12, 971-981, 2010

44. Lushaj, E. B., Anstadt, E., Haworth, R., Roenneburg, D., Kim, J., Hematti, P., Kohmoto, T.: Mesenchymal stromal cells are present in the heart and promote growth of adult stem cells in vitro, Cytotherapy, 13, 400-406, 2011

45. Martin, H., Hoelzer, D.: J. W. G. Universität: Forschung Frankfurt, Frankfurt am Main, 20, 31-35, 2002

46. Matsumoto, T., Kuroda, R., Mifune, Y., Kawamoto, A., Shoji, T., Miwa, M., Asahara, T., Kurosaka, M.: Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing, Bone, 43, 434-439, 2008

47. Montzka, K., Fuhrmann, T., Woltje, M., Brook, G. A.: Expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: serum-reduced medium is better than conventional medium, Cytotherapy, 12, 587-592, 2010

48. Najar, M., Rouas, R., Raicevic, G., Boufker, H. I., Lewalle, P., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., Martiat, P., Lagneaux, L.: Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6, Cytotherapy, 11, 570-583, 2009

49. Peran, M., Marchal, J. A., Lopez, E., Jimenez-Navarro, M., Boulaiz, H., Rodriguez-Serrano, F., Carrillo, E., Sanchez-Espin, G., de Teresa, E., Tosh, D., Aranega, A.: Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes, Cytotherapy, 12, 332-337, 2010

50. Porada, C. D., Zanjani, E. D., Almeida-Porad, G.: Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications, Curr Stem Cell Res Ther, 1, 365-369, 2006

51. Prockop, D. J., Brenner, M., Fibbe, W. E., Horwitz, E., Le Blanc, K., Phinney, D. G., Simmons, P. J., Sensebe, L., Keating, A.: Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy, Cytotherapy, 12, 576-578, 2010

52. Psaltis, P. J., Paton, S., See, F., Arthur, A., Martin, S., Itescu, S., Worthley, S. G., Gronthos, S., Zannettino, A. C.: Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations, Journal of cellular physiology, 223, 530-540, 2010

53. Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., Pistoia, V.: Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche, Stem Cells, 26, 151-162, 2008

54. Ramirez, M., Lucia, A., Gomez-Gallego, F., Esteve-Lanao, J., Perez-Martinez, A., Foster, C., Andreu, A. L., Martin, M. A., Madero, L., Arenas, J., Garcia-Castro, J.: Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury, Br J Sports Med, 40, 719-722, 2006

55. Rasmussen, J. G., Frobert, O., Pilgaard, L., Kastrup, J., Simonsen, U., Zachar, V., Fink, T.: Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells, Cytotherapy, 13, 318-328, 2011

56. Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E. K., Machalinski, B., Kucia, M.: Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity?, J Appl Genet, 48, 307-319, 2007

57. Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E. K., Wysoczynski, M., Ratajczak, J., Kucia, M.: Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance, Exp Hematol, 36, 742-751, 2008

58. Seebach, C., Henrich, D., Tewksbury, R., Wilhelm, K., Marzi, I.: Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions, Calcif Tissue Int, 80, 294-300, 2007

59. Sell, S.: Stem Cells Handbook Humana Press, Totowa, New Jersey, 1, 1-18|107-117, 2003

60. Sewell, W. A., Brown, M. H., Dunne, J., Owen, M. J., Crumpton, M. J.: Molecular cloning of the human T-lymphocyte surface CD2 (T11) antigen, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83, 8718-8722, 1986

61. Sobiesiak, M., Sivasubramaniyan, K., Hermann, C., Tan, C., Orgel, M., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Ochs, U., Muller, C. A., Gargett, C. E., Kalbacher, H., Buhring, H. J.: The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase, Stem cells and development, 19, 669-677, 2009

62. Speck, U.: Durchflusszytometrie, BD Biosciences, Präsentation, 05.08.2008

63. Tikkanen, J., Leskela, H. V., Lehtonen, S. T., Vahasarja, V., Melkko, J., Ahvenjarvi, L., Paakko, E., Vaananen, K., Lehenkari, P.: Attempt to treat congenital pseudarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation, Cytotherapy, 12, 593-604, 2010

64. Tondreau, T., Meuleman, N., Stamatopoulos, B., De Bruyn, C., Delforge, A., Dejeneffe, M., Martiat, P., Bron, D., Lagneaux, L.: In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues, Cytotherapy, 11, 559-569, 2009

65. Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D., Lagneaux, L.: Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity, Stem Cells, 23, 1105-1112, 2005

66. Turnovcova, K., Ruzickova, K., Vanecek, V., Sykova, E., Jendelova, P.: Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media, Cytotherapy, 11, 874-885, 2009

67. von Bremen-Kuhne, R., de la Vega-Salgado, H., Steffen, R.: [Triple pelvic osteotomy (according to Tonnis and Kalchschmidt) in the treatment of acetabular dysplasia--medium-term results], Z Orthop Ihre Grenzgeb, 144, 484-491, 2006

68. Wieten, E., van der Linden-Schrever, B. E., Sonneveld, E., Veerman, A. J., Pieters, R.: CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia, Leukemia, 25, 1374-1376, 2011

69. Xiang, J., Tang, J., Song, C., Yang, Z., Hirst, D. G., Zheng, Q. J., Li, G.: Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma, Cytotherapy, 11, 516-526, 2009

70. Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R. G., Kobayashi, N., Yarmush, M. L.: Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing, Cell Transplant, 19, 667-679, 2010

71. Young, P., Peroni, J., Finn, B. C., Venditti, J. E., Preiti, V., Bullorsky, E., Bruetman, J. E.: [Hemophagocytic syndrome. Report of four cases], Revista medica de Chile, 139, 224-229, 2011

72. Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., Dawn, B., Hall, B., Singh, R., Lillard, J. W., Jr., Ratajczak, M. Z.: Morphological characterization of very small embryonic-like stem cells (VSELs) by ImageStream system analysis, J Cell Mol Med, 12, 292-303, 2008

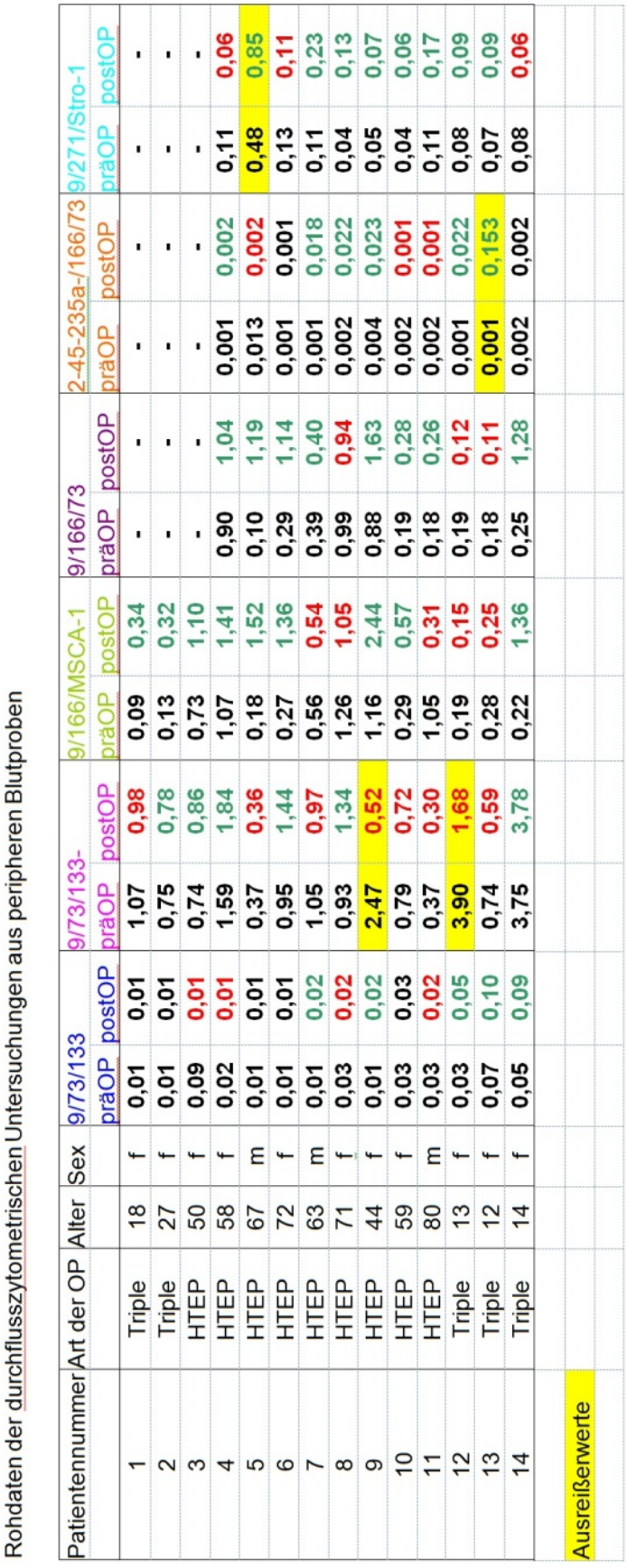
73. Zuba-Surma, E. K., Ratajczak, M. Z.: Overview of very small embryonic-like stem cells (VSELs) and methodology of their identification and isolation by flow cytometric methods, 9, 9-29, 2010

74. Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A., Maini, R. N.: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals, Arthritis Res, 2, 477-488, 2000

„Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder das Unmögliche versucht werden“

Hermann Hesse (1877-1962)

Anhang



Rohdaten der durchflusszytometrischen Untersuchungen aus peripheren Blutproben

Patientennummer	Art der OP	Alter	Sex	9/73/133		9/73/133-		9/166/MSCA-1		9/166/73		2-45-235a-/166/73		9/271/Stro-1	
				präOP	postOP	präOP	postOP	präOP	postOP	präOP	postOP	präOP	postOP	präOP	postOP
1	Triple	18	f	0,01	0,01	1,07	0,98	0,09	0,34	-	-	-	-	-	-
2	Triple	27	f	0,01	0,01	0,75	0,78	0,13	0,32	-	-	-	-	-	-
3	HTEP	50	f	0,09	0,01	0,74	0,86	0,73	1,10	-	-	-	-	-	-
4	HTEP	58	f	0,02	0,01	1,59	1,84	1,07	1,41	0,90	1,04	0,001	0,002	0,11	0,06
5	HTEP	67	m	0,01	0,01	0,37	0,36	0,18	1,52	0,10	1,19	0,013	0,002	0,48	0,85
6	HTEP	72	f	0,01	0,01	0,95	1,44	0,27	1,36	0,29	1,14	0,001	0,001	0,13	0,11
7	HTEP	63	m	0,01	0,02	1,05	0,97	0,56	0,54	0,39	0,40	0,001	0,018	0,11	0,23
8	HTEP	71	f	0,03	0,02	0,93	1,34	1,26	1,05	0,99	0,94	0,002	0,022	0,04	0,13
9	HTEP	44	f	0,01	0,02	2,47	0,52	1,16	2,44	0,88	1,63	0,004	0,023	0,05	0,07
10	HTEP	59	f	0,03	0,03	0,79	0,72	0,29	0,57	0,19	0,28	0,002	0,001	0,04	0,06
11	HTEP	80	m	0,03	0,02	0,37	0,30	1,05	0,31	0,18	0,26	0,002	0,001	0,11	0,17
12	Triple	13	f	0,03	0,05	3,90	1,68	0,19	0,15	0,19	0,12	0,001	0,022	0,08	0,09
13	Triple	12	f	0,07	0,10	0,74	0,59	0,28	0,25	0,18	0,11	0,001	0,153	0,07	0,09
14	Triple	14	f	0,05	0,09	3,75	3,78	0,22	1,36	0,25	1,28	0,002	0,002	0,08	0,06
Ausreißerwerte															

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Rolf Brenner, Leiter der Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen der orthopädischen Universitätsklinik mit Querschnittgelähmtenzentrum am Rehabilitationskrankenhaus Ulm, danke ich herzlich für die Überlassung des hochaktuellen und interessanten Themas dieser Arbeit. Zahlreiche konstruktive Anmerkungen und seine stets für mich offen stehende Tür haben mir das Erstellen dieser Arbeit sehr erleichtert.

Seinem Mitarbeiter, Herrn Diplombiologen Dr. rer. nat. Jörg Fiedler, gebührt mein ganz besonderer Dank für seine stets bereitwillige Unterstützung nicht nur bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit, der Vermittlung des theoretischen Hintergrundes und der Bereitstellung auch weiterführender Literatur, sondern auch für sein stets geduldiges Ohr und seine wertvollen Ratschläge, die über das Thema meiner Arbeit weit hinausgingen.

Herzlich danken darf ich dem gesamten Laborteam, für die freundliche Aufnahme, für die jederzeitige technische Unterstützung und insbesondere auch für das angenehme Arbeitsklima. Frau Dr. rer. nat. Helga Joos danke ich besonders für die Unterstützung bei Statistikproblemen, Frau Anja Wildner für den unschätzbar wertvollen Crashkurs in allgemeiner Laborarbeit und FACS-Analyse, Frau Cathrin Hogrefe für die verlässliche Mitwirkung bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials. Herrn Giovanni Ravalli danke ich besonders für seine kostbare Hilfe bei der Erstellung zahlloser Färbungen und - zusammen mit Frau Christiane Schulz - für die Mitversorgung meiner Zellkulturen. Erwähnenswert sind dabei durchaus auch etliche auflockernde und freundschaftliche Gespräche „zwischendurch“.

Am aller dankbarsten bin ich jedoch meinen Eltern und meinem Bruder Michael für die uneingeschränkte liebevolle Unterstützung und den immerwährenden Rückhalt. Ich konnte immer auf Euch zählen und Ihr wart immer für mich da. Ohne Euch wären mein akademischer Werdegang und diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.