



Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr München
Leiter: Oberstarzt Prof. Dr. H. Thiermann

**Mobilisierung von humanen mesenchymalen
Stammzellen durch verschiedene Zytokine und
Wachstumsfaktoren nach deren Immobilisierung durch
Schwefellost**

Cassandra Winkelmann

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

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation: 1. Prof. Dr. Horst Thiermann
2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 20.08.2018 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.03.2019
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schwefellost	1
1.1.1	Überblick	1
1.1.2	Physikalisch-chemische und toxikologische Eigenschaften	3
1.1.3	Medizinischer Hintergrund	4
1.1.4	Klinisches Erscheinungsbild und Symptome	5
1.1.4.1	Akute und chronische Auswirkungen	6
1.1.5	Therapie	13
1.1.6	Schwefellost und humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)	16
1.2	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)	18
1.3	Zytokine und Wachstumsfaktoren	21
1.3.1	Zytokine und Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit hMSCs	21
1.4	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Verwendete Chemikalien und Substanzen	26
2.1.2	Verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien	26
2.1.3	Verwendete Kits	27
2.1.4	Verwendete Medien	27
2.1.5	Verwendete Zytokine und Wachstumsfaktoren	28
2.1.6	Humanes Zellmaterial	29
2.1.6.1	Knochenmark	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.2	Isolierung von hMSCs aus einem Hüftkopf	30
2.2.3	Kultivierung und Passage der hMSCs	32
2.2.4	Charakterisierung und Qualitätskontrolle der hMSCs	33
2.2.4.1	In vitro Differenzierung	34
2.2.5	Sekretom der hMSCs unter Einfluss von Schwefellost	36

2.2.6 Exposition der hMSCs mit Schwefellost	36
2.2.7 Migration/Boyden-Kammer	37
3 Ergebnisse	40
3.1 Sekretom der hMSCs	40
3.2 Migration der hMSCs	43
3.2.1 Migration der hMSCs unter bFGF	43
3.2.2 Migration der hMSCs unter GCP-2	45
3.2.3 Migration der hMSCs unter IL-6	46
3.2.4 Migration der hMSCs unter IL-8 (e), IL-8 (m) und MCP-1	47
3.2.5 Migration der hMSCs unter MIF, NCAM-1, TIMP-1 und TIMP-2	50
3.2.6 Migration der hMSCs unter VEGF	54
3.2.7 Migration der hMSCs unter einem Zytokin-Mix	55
4 Diskussion	57
5 Zusammenfassung	67
6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	69
7 Literaturverzeichnis	71
8 Publikationen	90
9 Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Alpha-MEM	Alpha-Modified Eagle's Medium
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony-Forming Unit Fibroblasts
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GCP-2	Granulocyte Chemotactic Protein-2
h	Stunden
HaCat	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
hMSCs	humane Mesenchymal Stem Cells
IC	Inhibitory Concentration
IL-6	Interleukin-6
IL-8 (e)	Interleukin-8 (endothelial)
IL-8 (m)	Interleukin-8 (monocyte)

Ko	Kontrolle
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
n	Nano (10^{-9})
NCAM-1	Neural Cell Adhesion Molecule-1
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
rpm	revolutions per minute
sek	Sekunden
SL, S-Lost	Schwefelost
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WF	Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro (10^{-6})

1 Einleitung

1.1 Schwefellost

1.1.1 Überblick

Schwefellost (S-Lost, SL) ist ein hochreaktives Agens, welches zu den alkylierenden Hautkampfstoffen zählt und als chemische Waffe vor allem während des 1. Weltkrieges, aber auch im 1. Golfkrieg von den Irakern gegen iranische Soldaten und Zivilisten eingesetzt wurde (Pechura und Rall 1993).

Obwohl es bereits 1886 durch den deutschen Chemiker Victor Meyer in seiner vollständigen Form beschrieben wurde (Meyer 1886), geht sein erster Einsatz durch die deutsche Armee auf den Juli 1917 in Ypern, Belgien, zurück, wovon sich auch der französische Name „Yperit“ ableiten lässt. Umgangssprachlich wird es, aufgrund seines senf- und knoblauchartigen Geruches, auch als Senfgas bezeichnet. Ein weiterer gebräuchlicher Name ist „Gelbkreuz“, da im 1. Weltkrieg mit Schwefellost gefüllte Patronen durch ein gelbes Kreuz gekennzeichnet wurden (Pechura und Rall 1993).

Die Bezeichnung „Lost“ erhielt es als Akronym aus den Nachnamen der deutschen Chemiker Wilhelm **L**ommel und Wilhelm **S**teinkopf, welche zur damaligen Zeit maßgeblich an dessen Produktion beteiligt waren (Steinkopf et al. 1920). Im Gegensatz zu anderen chemischen Mitteln (wie z.B. Chlor und Phosgen), deren toxisches Potential man erst im Rahmen der industriellen Nutzung entdeckte, wurde Schwefellost explizit zum Einsatz als chemischer Kampfstoff entwickelt (Szinicz 2005). Durch seine Eigenschaft auf zahlreichen Oberflächen zu persistieren und aufgrund der raschen Aufnahme in den menschlichen Organismus durch Inhalation oder perkutan über Haut und Augen, stellte es aus militärischer Sicht die ideale Waffe dar (Pechura und Rall 1993).

Zwar kam es zu keinem Einsatz, dennoch war Schwefellost auch eine der Hauptchemiewaffen im 2. Weltkrieg und wurde deshalb von vielen Ländern produziert und gelagert und zählt somit zu den meist vertriebenen chemischen Kampfstoffen weltweit (Szinicz 2005). Nicht nur auf Basis dessen, wurde 1993 durch die Chemiewaffenkonvention die Entwicklung, Herstellung, Lagerung und

der Einsatz chemischer Waffen verboten und eine Vernichtung dieser beschlossen. Seit dessen Inkrafttreten im April 1997, überwacht die Organisation für das Verbot von Chemiewaffen (OVCW), mit Sitz in Den Haag, die Einhaltung durch die mittlerweile 192 Vertragsstaaten (Auswärtiges Amt, 08.01.2016).

Doch trotz solcher Verbote werden weiterhin chemische Kampfstoffe produziert und auch eingesetzt. Die Tatsache, dass immer noch kein kausal wirksames Antidot existiert, macht Schwefellost zu einer effektiven und bedrohlichen Waffe, weshalb dessen potentieller Einsatz in asymmetrischen Konflikten durch z.B. terroristische oder nicht staatliche Gruppen keines Falls außer Acht gelassen werden darf (Saladi et al. 2006). Hier kommt erschwerend hinzu, dass Schwefellost durch seine einfache und kostengünstige Synthese leicht herzustellen und zu lagern ist (ebd.). Es liegt ein, durch die OVCW bestätigter Bericht vor, dass Schwefellost im August 2015 bei Kämpfen im syrischen Bürgerkrieg eingesetzt wurde (Die Zeit, 06.11.2015, Süddeutsche Zeitung, 06.11.2015). Des Weiteren, gibt es Anhaltspunkte dafür, dass es im März 2016 im Irak zu einem erneuten Einsatz von Schwefellost kam (Los Angeles Times, 12.03.2016). Dies führt uns somit vor Augen wie präsent die Gefahr, sowohl für das Militär als auch für die zivile Bevölkerung, durch chemische Kampfstoffe wie Schwefellost in der heutigen Zeit ist. Gerade deswegen ist es auch von so großer Bedeutung, dass die Forschung im Hinblick auf Therapiekonzepte weiter voranschreitet.

1.1.2 Physikalisch-chemische und toxikologische Eigenschaften

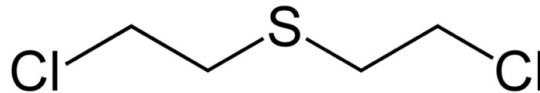


Abb. 1: Strukturformel von Schwefellost



Abb. 2: Vials mit Schwefellost

(Das linke Vial beinhaltet verunreinigtes Schwefellost, das rechte Vial destilliertes Schwefellost)

Physikalisch-chemische Eigenschaften

Der Inhalt des folgenden Abschnitts beruht im Wesentlichen auf Franke (1977) und Sidell et al. (1997):

Schwefellost oder auch Bis-(2-chlorethyl)-thioether (Abb. 1) ist als Reinsubstanz eine farb- und geruchslose, ölige Flüssigkeit, welche aufgrund von Verunreinigungen durch technische Produkte gelblich-dunkelbraun gefärbt ist (Abb. 2). Der Schmelzpunkt liegt zwischen 14,44°C und 14,45°C, der Siedepunkt bei 217,8°C. Zudem ist es mit einem spezifischen Gewicht von 1,27 g/cm³ bei 20°C schwerer als Wasser. Die Substanz verdampft bereits bei Raumtemperatur und ist ausgeprägt lipophil. S-Lost löst sich außerdem leicht in organischen Lösungsmitteln. Bei Temperaturen über 16°C löst es sich in absolutem Ethanol zu beinahe 100%, wodurch die Möglichkeit besteht, eine homogene Schwefellost-Ethanol-Mischung herzustellen.

S-Lost durchdringt rasch die verschiedensten Materialien und hat v.a. im Gelände die Eigenschaft dort zu persistieren. Diese ausgeprägte Sesshaftigkeit macht es besonders gefährlich, denn je nach Außentemperatur und Wetterlage kann es bis zu 7 Tage im Gelände verbleiben.

Des Weiteren hydrolisiert es unter pathophysiologischen Bedingungen und in vitro sehr schnell in Wasser, wobei als Hydrolyseprodukte Chlorwasserstoff und Thiodiglykol entstehen. In Salzwasser hingegen, weist es eine außerordentliche Stabilität auf. Besonders wichtig ist die Tatsache, dass S-Lost mit nukleophilen Reaktionspartnern wie Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff hoch reagibel ist und es vermag, diese zu alkylieren (Franke 1977).

Toxikologische Eigenschaften

Die letale perkutane Dosis beträgt 50 mg/kg und führt bei einer Einwirkungszeit von mindestens 1 Stunde innerhalb von 3 Tagen zum Tod. Bei einer Dosis von 600 mg/kg tritt dieser schon bereits nach wenigen Stunden ein (Dauderer 1991). Allerdings zeigt die Historie auf, dass es nur in 2% der Fälle zu einem tödlichen Ereignis kam. S-Lost ist in der Liste der krebserzeugenden, mutagenen und reproduktionstoxischen Stoffe (KMR-Stoffe, Stand 08/2012) als „krebserzeugend“ (K1A) eingestuft.

1.1.3 Medizinischer Hintergrund

Schwefellost wurde schon seit geraumer Zeit als Therapeutikum für die unterschiedlichsten Zwecke in der Medizin eingesetzt. So wurde es z.B. zur Entfernung von Tätowierungen, Melanomen oder eines Naevus pigmentosus durch lokale Applikation, als auch zur Behandlung eines Lupus vulgaris verwendet (Richter 1941). Es kam, darüber hinaus, als 0,005%-ige S-Lost-Vaseline zur Therapie der Psoriasis vulgaris zum Einsatz, bis man dessen Anwendung aufgrund eines eventuell krebserregenden Risikos in Frage stellte (Illig et al. 1979).

Schon während und nach dem 2. Weltkrieg fanden Dr. Alfred Gilman (1946) und Dr. Louis Goodman (1946) heraus, dass Lost-Verbindungen obendrein zytostatische Eigenschaften besitzen. So waren sie eine der Ersten, die

Stickstofflose für die Behandlung von Morbus Hodgkin, malignen Lymphomen und Leukämien einsetzten (Gilman und Philips 1946, Goodman et al. 1946). Mit ihren Forschungen legten sie einen Meilenstein in der Geschichte der Krebstherapie, denn auch heute noch sind verschiedene Stickstofflost-Derivate (u.a. Chlorambucil, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Melphalan und Trofosfamid) durch deren Verwendung als Chemotherapeutikum von großer Bedeutung (Vohr 2012). So findet z.B. Mechlorethamin (ebenso ein Stickstofflost) in der Therapie von kutanen T-Zell-Lymphomen, wie der Mycosis fungoides, Anwendung (Garbe et al. 2009). Zu erwähnen ist auch das, auf Stickstofflost-basierende, Zytostatikum Bendamustin, welches seit ein paar Jahren eine wichtige Rolle in der Behandlung von Patienten mit malignen Lymphomen spielt (Gil et al. 2014).

1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild und Symptome

Schwefellost schädigt vor allem die Haut, Augen und den respiratorischen Trakt, wobei das Hauptaugenmerk auf der Hautschädigung liegt, welche vornehmlich bei über 90% der Schwefellost-exponierten Patienten beobachtet wurde (Emadi et al. 2008, Emadi et al. 2009, Emadi et al. 2012).

Die Exposition ist selten tödlich, die Schwere der verursachten Schädigungen zieht jedoch eine unter Umständen Wochen bis Monate andauernde Heilung nach sich (Kehe et al. 2009a).

Das Gefährliche einer Schwefellostvergiftung ist, dass klinische Symptome erst nach einer Latenzzeit von 2 bis 24 Stunden eintreten – abhängig von mehreren Faktoren, wie z.B. der Schwefellost-Konzentration (Sidell et al. 1997). Folge davon ist, dass die Vergiftung (da in der Regel schmerzlos) von den Patienten unter Umständen überhaupt nicht bemerkt wird und somit eine unverzügliche Dekontamination und Ergreifung therapeutischer Maßnahmen erst verzögert gewährleistet werden kann, was wiederum eine längere Exposition und damit verbundene, schwerere Verletzungen nach sich zieht (Graham et al. 2005).

Der Großteil des klinischen Erscheinungsbildes kann durch die stark alkylierende Wirkung von S-Lost erklärt werden, da diese fast alle Zellkomponenten betrifft. Die 2-Chlorethyl-Seitenarme von S-Lost können vor

allem mit DNA, RNA aber auch mit Proteinen und Lipidmembranen reagieren (Papirmeister et al. 1984), wobei die DNA-Schädigung wohl zu den schwerwiegendsten Schäden zählt (Lodhi et al. 2001). S-Lost ist sowohl in der Lage monofunktionale Addukte zu formen als auch eine DNA-Quervernetzung hervorzurufen (Lawley et al. 1969, Shahin et al. 2001). Gerade letztere ist extrem schwierig zu reparieren und führt vor allem bei sich schnell teilenden Zellen zum Zelltod (Kaina 2003). Hieraus ergeben sich die durch eine S-Lost-Intoxikation am meisten betroffenen Zellen: Keratinozyten des Stratum basale, Knochenmarkszellen, respiratorisches Flimmerepithel als auch Epithelzellen des Auges und des Gastrointestinaltraktes (Kehe et al. 2009a).

Im Folgenden wird auf die akuten und chronischen Auswirkungen einer Vergiftung mit S-Lost eingegangen.

1.1.4.1 Akute und chronische Auswirkungen

Dieser Abschnitt stützt sich, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf Beobachtungen von Kehe und Szinicz (2005), Kehe et al. (2009a) und Rowell et al. (2009).

Haut

Schwefellost zählt zu den blasenbildenden Substanzen, da es eine Entzündung der Haut mit Blasenbildung bis hin zu Ulzerationen und Nekrosen verursachen kann.

Der Beginn der Symptome ist abhängig von der Dosis und der Zeit der S-Lost-Exposition. Je höher die Dosis, desto schneller treten spezifische Symptome auf. Innerhalb der ersten Stunden nach Kontakt, kommt es zur Erythem- und Ödembildung, sowie zu einem Brennen und Juckreiz der Haut. Die Blasenbildung beginnt erst nach mehreren Stunden. Die typische, Schwefellost-induzierte Blase ist dünnwandig und mit einer klaren, gelben Flüssigkeit gefüllt. Es ist ein positives Nikolski-Phänomen nachweisbar. Wird die Blasenhaut entfernt, werden schwere Nekrosen sichtbar, welche sich bis in die Tiefe der Haut fortsetzen (Franke 1977). Das Ausmaß der Verletzung variiert je nach Hauttemperatur, Feuchtigkeit und anatomischer Lokalisation. Feuchte

Körperareale mit dünner Haut, wie das Skrotum, die Achseln und die Analregion, sind besonders anfällig.

Da S-Lost die Wundheilung maßgeblich beeinträchtigt, geht diese nur langsam voran und kann Wochen bis Monate in Anspruch nehmen und wird durch das Risiko von Sekundärinfektionen weiter erschwert.

Auf lange Sicht entstehen sowohl Hyper- als auch Hypopigmentierungen in den geschädigten Hautbereichen. Es kann zudem zur Keloid- und Narbenbildung kommen. Patienten berichteten generell über eine trockene und sensible Haut, in den S-Lost exponierten Arealen. Außerdem konnte eine Neigung zur Entwicklung von chronischen Ekzemen und seborrhoischer Dermatitis beobachtet werden.

Ein erhöhtes Risiko für Hautkrebs nach Einmalexposition wurde bisher nicht eindeutig nachgewiesen. Jedoch existieren Studien über einen Zusammenhang zwischen einer S-Lost-Exposition und dem Auftreten eines kutanen T-Zell-Lymphoms (Emadi et al. 2012).



Abb. 3: Blasenbildung nach Schwefellost-Kontakt

Hand eines iranischen Soldaten drei Tage nach direkter Schwefellost-Exposition. (Die Abbildung 3 wurde aus Balali-Mood und Abdollahi (2015) entnommen)

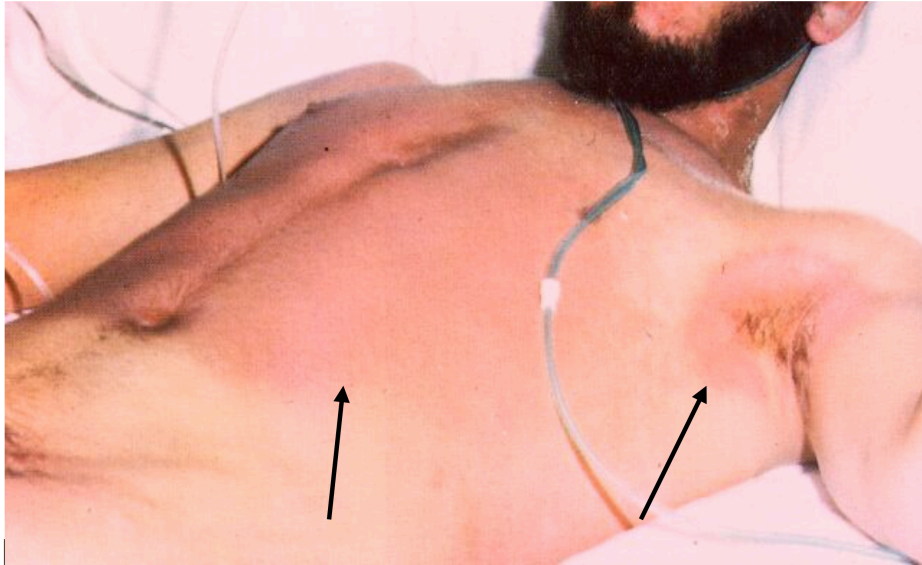


Abb. 4: Schwefellost-induzierte Erythembildung

(Die Abbildung 4 wurde aus Willems (1989) entnommen)



Abb. 5: Schwefellost-Spätschäden

Arm eines Schwefellost-geschädigten Patienten: man sieht eine deutliche Hyper- und Hypopigmentierung der Haut. (Die Abbildung 5 wurde aus Willems (1989) entnommen)



Abb. 6: Heilungsprozess nach Schwefelost-Unfall über einen 2-Jahres-Zeitraum

Oberkörper eines Labortechnikers. Verdeutlicht wird die langwierige und schwere Heilungsphase trotz sofort erfolgter Behandlung. (Die Abbildung 6 wurde aus Schmidt et al. (2018) entnommen)

Auge

Die Augen sind aufgrund ihrer Anatomie (konstanter Tränenfilm) das S-Lost sensibelste Organ. S-Lost-Dämpfe können schnell mit dem Augengewebe reagieren (Pechura und Rall 1993). Bereits nach einer kurzen Latenzzeit (wenige Minuten bis Stunden) treten extreme Augenschmerzen, Tränenfluss, Brennen und Photophobie auf. Im Verlauf kann es durch ein ausgeprägtes Lidödem und einsetzenden Blepharospasmus zur vorübergehenden Blindheit kommen, welche normalerweise nach 1-2 Wochen wieder rückläufig ist. Als schwerwiegendste Komplikationen wurden von Kehe et al. (2009) Konjunktivitis, Hornhauterosion als auch Hornhauttrübung beschrieben. In den meisten Fällen findet eine komplette Regeneration statt, wobei je nach Schwere der Verletzung eine Hornhauttrübung oder Hornhautvernarbung mit daraus resultierender Visusverschlechterung durchaus verbleiben kann. Es ist zudem möglich, dass Patienten erst viele Jahre nach dem Ereignis Augenschäden, wie eine ulzerative Keratitis entwickeln (Solberg et al. 1997).

Der direkte Kontakt des Auges mit einer S-Lost-Flüssigkeit führt, im Gegensatz zum Kontakt mit S-Lost-Dampf, zu schweren nekrotischen Schädigungen, welche meist den Verlust des Auges nach sich ziehen (Franke 1977).



Abb. 7: Typische Konjunktivitis nach Schwefellost-Kontakt (Akutphase)

(Die Abbildung 7 wurde aus Willems (1989) entnommen)

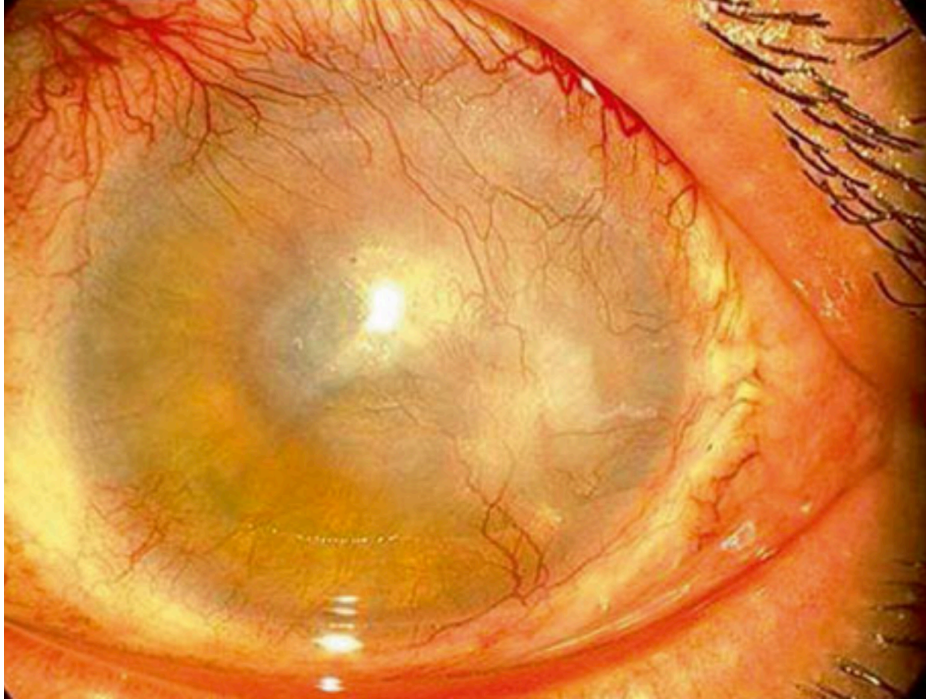


Abb. 8: Hornhauttrübung und Erblindung nach Schwefelst-Kontakt (Spätphase)

(Die Abbildung 8 wurde aus Balali-Mood und Abdollahi (2015) entnommen)

Respiratorisches System

Die Inhalation von S-Lost-Dämpfen wirkt sich vor allem auf den oberen respiratorischen Trakt aus. Ähnlich wie bei den Augen, ist das respiratorische System extrem empfindlich gegenüber S-Lost. Nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden, entwickeln sich Irritationen der Nasenschleimhaut, Heiserkeit, Niesanfalle und Hustenreiz. Darauf folgt ein gesteigerter Tränenfluss, Rhinorrhoe, als auch ein Geschmacks- und Geruchsverlust. Aber auch die unteren Luftwege werden durch S-Lost geschädigt: schmerzhafter, trockener Husten und blutiger Auswurf sind die Folge. Bei höheren S-Lost-Dosen kann es zu einer Tracheobronchitis und nekrotischen Veränderungen der Bronchialschleimhaut mit Bildung von Pseudomembranen (ähnlich wie bei der Diphtherie) kommen. Durch eine Ablösung dieser Pseudomembranen von der Trachealwand, kann die Gefahr einer Atemwegsverlegung mit reflektorischem Atemstillstand entstehen. Bei schwereren S-Lost-Expositionen ist die, wenn auch sehr seltene, Entwicklung eines Lungenödems beobachtet worden.

All diese Faktoren führen, aufgrund des entstandenen Flimmerepithelschadens, zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Barrieren- und Reinigungsfunktion des respiratorischen Traktes, was wiederum Atemwegsinfektionen, wie z.B. Pneumonien, begünstigt.

Schwefellost verursacht allerdings auch chronische Schäden. Am häufigsten konnten chronische Bronchitis, insbesondere eine Bronchiolitis obliterans, Asthma bronchiale, Lungenfibrose und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen beobachtet werden. Es besteht außerdem ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs, aber auch für andere Karzinome im respiratorischen Trakt (Wada et al. 1968, Nishimoto et al. 1987, Easton et al. 1988). Aufgrund dieser Tatsache, wurde Schwefellost von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) der Gruppe 1 (= karzinogen für den Menschen) zugeordnet (IARC 1975, IARC 1987).

Gastrointestinaltrakt

Laut Balali-Mood und Abdollahi (2015) sowie Franke (1977) treten nach peroraler Aufnahme von Schwefellost, neben lokalen Wirkungen an den Lippen und der Mund- und Rachenschleimhaut (Erythem- und Bläschenbildung), innerhalb von 15 bis 20 Minuten heftige Magenschmerzen, starker Speichelfluss, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Appetitlosigkeit ein. In sehr seltenen Fällen konnten blutige Durchfälle beobachtet werden (Sidell et al. 1997).

Systemische und zentralnervöse Wirkungen

Eine systemische Vergiftung mit Schwefellost kann Symptome, wie sie auch aus der Radio- und Chemotherapie bekannt sind, hervorrufen. Leichte S-Lost-Dosen verursachen Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Fieber und Appetitlosigkeit. Höhere Dosen können zu zentralen Erregungszuständen und Krampfanfällen führen. Muskelkrämpfe, Gleichgewichtsstörungen und Bewusstseinsstörungen sprechen für eine zentrale Intoxikation, welche meist innerhalb von wenigen Tagen zum Tode führt (Franke 1977).

Ferner wurden Blutbildveränderungen (Anämie, Thrombozytopenie, veränderter Leukozytenstatus) als Folge einer Knochenmarksdepression festgestellt. Nach Aufnahme von S-Lost kann es ab dem 3. Tag zu einer ausgeprägten Leukopenie kommen, welche nach 7 bis 9 Tagen ihren Tiefpunkt erreicht. Immunsuppression ist die Folge. Trotz seiner myelotoxischen Eigenschaften, konnte bisher kein eindeutiger Nachweis erbracht werden, dass Schwefellost nach Einmalexposition zu vermehrten systemischen Krebserkrankungen, wie z.B. Leukämie führt.

Des Weiteren wurden Antriebs- und Affektverarmungen, vereinbar mit den Symptomen einer Depression, als auch vermehrte Raten an PTBS (Posttraumatische Belastungsstörung) und Angstzuständen beobachtet, wobei man hier nicht zweifellos sagen kann, ob dies alleinig durch die S-Lost-Exposition oder durch das Kriegereignis ausgelöst wurde.

In Tierstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass Schwefellost teratogene Eigenschaften besitzt (Sanjarmosavi et al. 2012). Es gibt bisher allerdings keinen Anhaltspunkt dafür, dass dies beim Menschen ähnlich wäre.

1.1.5 Therapie

Obwohl sich die Medizin nun seit über 100 Jahren intensiv mit der Diagnostik und Therapie von Schwefellostvergiftungen auseinandersetzt, existiert bis dato kein Antidot, welches eine kausale Behandlung möglich macht. Grund hierfür, ist die enorme Komplexität, der durch S-Lost verursachten Vergiftung, welche vor allem auf molekularer Ebene abläuft und bis heute noch nicht vollständig verstanden ist (Kehe et al. 2009b).

Somit ist die Therapie von Patienten mit manifesten Schäden sehr pflegeintensiv (in der Regel nimmt sie mindestens 4 bis 6 Wochen in Anspruch) und im Wesentlichen auf die Linderung der Symptomatik bezogen.

Bei den folgenden Therapieansätzen handelt es sich um Zusammenfassungen aus Balali-Mood und Hefazi (2005), Kehe und Szinicz (2005) und Kehe et al. (2009a):

Da sich Schwefellost innerhalb von Minuten in den verschiedensten Geweben festsetzt, ist eine Dekontamination nur effektiv, wenn sie innerhalb kürzester Zeit erfolgt. Hierfür existieren spezielle Hautdekontaminationsmittel, wie RSDL® (Reactive Skin Decontamination Lotion). Wenn dies nicht möglich ist, sollte man darauf achten, dass Wasser im Überschuss eingesetzt wird, da Wasser sonst die Resorption von S-Lost beschleunigt.

Bei der sehr selten benötigten, systemischen Entgiftung, kann eine sofortige intravenöse Gabe von Natriumthiosulfat in Kombination mit N-Acetylcystein eingesetzt werden. Die Zufuhr von Aktivkohle und Laktulose per os, vermag eine Resorption von S-Lost zu verhindern. In besonders schweren Fällen kann eine Hämodialyse notwendig sein, wobei dessen therapeutischer Effekt äußerst umstritten ist.

Um einen schweren Augenschaden zu vermeiden, ist es extrem wichtig schnell zu handeln: Eventuell vorhandene Kontaktlinsen müssen entfernt und die Augen unverzüglich (z.B. mit 0,9% Kochsalzlösung) ausgewaschen werden. Danach kann sterile Vaseline eingesetzt werden, um ein Verkleben der Lider zu verhindern. Zur Prophylaxe einer hinteren Synechie von Iris und Linse ist der Einsatz von Mydriatika, wie Atropin, sinnvoll. Die Gabe antibiotikahaltiger Augentropfen kann ebenfalls hilfreich sein. Eine lokale Steroidtherapie, zur Eindämmung eines Ödems, sollte nur angewendet werden, wenn kein Korneaepithelschaden vorliegt oder erst nachdem dieser ausgeheilt ist.

Um die respiratorischen Symptome zu mildern, kommen Bronchodilatoren (vor allem die Kombination aus Beta-2-Sympathomimetika und Anticholinergika hat sich als effektiv erwiesen), Antitussiva (z.B. Codein) und Mukolytika (z.B. Ambroxol) zum Einsatz. Die Inhalation von feuchter Luft bei Halsschmerzen und Heiserkeit verschafft zudem oft Linderung. Bei schweren Infektionen kann eine gezielte Antibiotikatherapie notwendig werden, ebenso wie die Gabe von Sauerstoff. Weiterhin kann bei gravierenden, respiratorischen Komplikationen eine Tracheotomie angebracht sein, wodurch ein schneller Zugang zur Trachea gewährt wird und somit Pseudomembranen leicht mittels Bronchoskopie entfernt werden können.

Die Behandlung des Hautschadens verlangt eine intensive Krankenpflege, da ein häufiger Verbandswechsel nötig ist. Generell kann ein S-Lost-Hautschaden wie Verbrennungen 2. Grades gehandhabt werden. Eine suffiziente Analgesie, unter Umständen mit Opioiden, ist essentiell, ebenso wie eine ausreichende Volumen- und Elektrolytsubstitution. Im Allgemeinen gilt, dass kleine S-Lost-Blasen (<2 cm) - außer nach spontaner Eröffnung - nicht abgetragen werden sollen. Bei großen Blasen (>2 cm) ist ein Debridement notwendig. Diese Maßnahme sollte ausschließlich unter sterilen Bedingungen erfolgen. Feuchte Areale können mit sterilen, silberhaltigen Wundauflagen, Paraffingazeverbänden und Dexpanthenol behandelt werden, trockene Areale mit Flumethason. Die Anwendung von lokalen Antibiotika wird nur im Rahmen von Sekundärinfektionen empfohlen, um bestehende Hautinfektionen einzudämmen. Zur Reduktion von Juckreiz und Irritationen bei Erythemen und kleinen Bläschen, können Steroide (topische Applikation) und „Calamine Lotionen“ eingesetzt werden. Bei besonders starkem Juckreiz, muss der systemische Einsatz von Antihistaminika erwogen werden.

Übelkeit und Erbrechen kann durch die Gabe von Antiemetika (z.B. Metoclopramid oder 5-HT₃-Rezeptorantagonisten) behandelt werden.

Um einer Knochenmarksdepression entgegenzusteuern, kann in Ausnahmefällen die Transfusion von Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten indiziert sein. Eine Knochenmarkstransplantation kann in individuellen Fällen erwogen werden.

Da durch eine S-Lost-Vergiftung viele verschiedene Organe betroffen sind, ist es wichtig, dass S-Lost-geschädigte Patienten interdisziplinär in spezialisierten Zentren behandelt werden. Ebenso essentiell, ist die Gewährleistung einer lebenslangen Nachsorge, um etwaige Spätschäden, als auch die Entstehung von Tumoren rechtzeitig erkennen zu können.

1.1.6 Schwefellost und humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

Es wurde deutlich, dass eine Schwefellost-Vergiftung maßgebliche Gewebeschädigungen hervorruft. Die Wundheilung ist besonders langwierig und die Geweberegeneration ist dauerhaft gestört, was sich in zahlreichen Langzeitschäden widerspiegelt (Hefazi et al. 2006, Namazi et al. 2009). Man kann somit davon ausgehen, dass die gestörte Geweberegeneration das Resultat einer mangelhaften Gewebeerneuerung ist.

Die Gewebeerneuerung erfolgt zumeist durch humane mesenchymale Stammzellen (Fathke et al. 2004). Knochenmarks-Stammzellen (sowohl aus dem hämatopoetischen als auch dem mesenchymalen Stammzellpool) spielen vor allem bei der Heilung von Hautwunden eine wichtige Rolle (Fathke et al. 2004). Normalerweise wandern Stammzellen aus dem Knochenmark in das geschädigte Gewebe ein und sind an dessen Regeneration beteiligt (Singer und Clark 1999). Eine mangelhafte Gewebeerneuerung spricht folglich für eine Schädigung des Stammzellpools. Der Verdacht liegt nahe, dass Schwefellost einen direkten oder indirekten Einfluss auf den Stammzellpool nimmt.

In der Tat konnte in einer Studie von Schmidt et al. (2013) erstmalig ein Zusammenhang hergestellt werden:

Schon geringe Konzentrationen von Schwefellost (ab $IC_1 = 1 \mu\text{M SL}$) führten zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsaktivität von hMSCs. Auf der anderen Seite zeigten die hMSCs im Vergleich zu anderen Zellen eine sehr hohe Toleranz gegenüber S-Lost (hMSCs $IC_{50} = 70,7 \mu\text{M SL}$; HaCat-Zellen $IC_{50} = 1,7 \mu\text{M SL}$). Ebenso blieb ihre Differenzierungsfähigkeit auch nach hoher Konzentration von S-Lost erhalten (Schmidt et al. 2013).

Die herabgesetzte Migrationsaktivität könnte eine Erklärung für die verlängerte Wundheilung nach einer Schwefellost-Vergiftung sein.

Zu einer ähnlichen Erkenntnis kamen auch Rodriguez-Menocal et al. (2012), indem sie herausfanden, dass hMSCs von Patienten mit chronisch beeinträchtigter Wundheilung im Vergleich mit hMSCs von gesunden Spendern eine signifikant herabgesetzte Fähigkeit besaßen, in Fibroblasten eine Migration

hervorzurufen, was für einen normalen Wundheilungsprozess essentiell ist (Rodriguez-Menocal et al. 2012).

So überrascht es nicht, dass in die Therapie von chronischen Wunden mit hMSCs große Hoffnungen gesetzt werden (Hanson et al. 2010, Zou et al. 2012, Marfia et al. 2015, Lee et al. 2016).

1.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs)

Neben den hämatopoetischen Stammzellen, enthält das Knochenmark ebenso humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs). Sie gehören zu den multipotenten, adulten Stammzellen und zeichnen sich vor allem durch ihre Fähigkeit der Selbstreplikation und ihre Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe aus (Pittenger et al. 1999). Auf mesenchymale Vorläuferzellen im Knochenmark, welche unabhängig von den hämatopoetischen Stammzellen sind, wurde im Jahr 1974 von Friedenstein et al. erstmalig hingewiesen (Friedenstein et al. 1974).

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte, unspezialisierte Zellen, welche sich nach entsprechender Stimulation zu spezialisierten Zellen ihres Keimblattes ausdifferenzieren (Pittenger et al. 1999, Bianco et al. 2001, Grove et al. 2004, Wulf et al. 2006). In Bezug auf die hMSCs handelt es sich dabei um Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Myozyten und Knochenmarksstromazellen (Beresford 1989, Caplan 1991, Pittenger et al. 1999). Das Differenzierungspotential der hMSCs beschränkt sich allerdings nicht nur auf das mesenchymale Gewebe, sondern ist keimblattüberschreitend: so besteht die Möglichkeit hMSCs zu Nervenzellen (Mezey und Chandross 2000, Mezey et al. 2000, Woodbury et al. 2000), Kardiomyozyten (Xu et al. 2004, Antonitsis et al. 2008, Carvalho et al. 2013) und Hepatozyten (Schwartz et al. 2002, Lee et al. 2004, Wu und Tao 2012) zu differenzieren.

Durch diese Erkenntnisse ergeben sich bedeutsame Möglichkeiten zur klinischen Anwendung von hMSCs. Aufgrund ihrer Multipotenz und ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung gelten hMSCs schon seit Jahren als großer Hoffnungsträger für die regenerative Medizin (Minguell et al. 2001, Bobis et al. 2006, Si et al. 2011, Dimarino et al. 2013).

Von Vorteil ist außerdem, dass die Kultur der Zellen meist sehr einfach ist. Sie lassen sich leicht *in vitro* vermehren und behalten auch nach Subkultivierung ihr Entwicklungspotential bei (Bruder et al. 1998).

Da hMSCs in größerer Anzahl vor allem in Knochenmark vorkommen (Prockop 1997, Tuli et al. 2003), ist das gängigste Isolationsverfahren für hMSCs die Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarksaspiraten gesunder Spender

(Pittenger et al. 1999). Nach dem Ansetzen in Zellkulturschalen adhären hMSCs umgehend - wohingegen hämatopoetische Zellen diese Eigenschaft nicht besitzen und durch einen Mediumwechsel entfernt werden können - und proliferieren dann unter fortlaufender Passagierung zu fibroblastenartigen, spindelförmigen Zellen (Pittenger et al. 1999, Le Blanc und Pittenger 2005).

Es gibt jedoch die Möglichkeit, hMSCs auch aus anderen Geweben zu isolieren, wie z.B. dem menschlichen Fettgewebe (Zuk et al. 2001). Vor allem der Versuch, hMSCs aus Nabelschnurblut zu gewinnen ist vielversprechend, gestaltet sich jedoch aufgrund der geringeren Anzahl als im Knochenmark schwieriger (Lu et al. 2006, Sibov et al. 2012). Des Weiteren konnten hMSCs in der Plazenta (Fukuchi et al. 2004), der Skelettmuskulatur (Mastrogiacomo et al. 2005), im Bindegewebe der Dermis (Soma et al. 2013), als auch in der Zahnpulpa (Huang et al. 2009, Ledesma-Martinez et al. 2016) nachgewiesen werden. Sie sind außerdem in der Lage das Knochenmark zu verlassen und im Blut zu zirkulieren, aus dem sie ebenfalls isoliert werden können (Kassis et al. 2006, Trivanovic et al. 2013, Li et al. 2015).

Neben ihrer enormen Differenzierungsfähigkeit, zeichnen sich hMSCs zudem durch ihre Migrationseigenschaften aus (Kim und Cho 2013, Sohni und Verfaillie 2013). Diese ermöglichen es, dass sich hMSCs an Differenzierungsprozessen in weiter entfernt gelegenen Körperarealen beteiligen (Duan et al. 2006, Sasaki et al. 2008). Darüber hinaus konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass sie zudem die Fähigkeit einer transendothelialen Migration besitzen (Schmidt et al. 2006a, Matsushita et al. 2011). Es ist bekannt, dass verschiedene Rezeptoren und einzelne Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren in die Migration der hMSCs involviert sind (Spaeth und Marini 2011, Naaldijk et al. 2015) und dabei helfen endogene Reparationsmechanismen in Gang zu setzen (Sohni und Verfaillie 2013).

Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, die Migrationsaktivität der hMSCs durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie bFGF, zu steigern (Schmidt et al. 2006b). Eine verbesserte migratorische Aktivität konnte auch durch die Behandlung mit TNF- α , SDF-1, PDGF und VEGF erzielt werden (Ball et al.

2007, Naaldijk et al. 2015). Dieses Wissen könnte ein weiterer Schritt zur Beantwortung der Frage sein, wie hMSCs gesteuert werden können, um sie z.B. in der regenerativen Medizin als Therapeutikum einzusetzen.

Allerdings gibt es noch zahlreiche andere Zytokine und Wachstumsfaktoren, die einen Einfluss auf die Migration von hMSCs haben können. Die Erforschung dieser ist u.a. Gegenstand dieser Arbeit.

1.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Aus Hauser et al. (2012):

Zytokine sind überwiegend parakrin oder autokrin wirkende Proteine, die an der Regulation von grundlegenden Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Zellfunktionen beteiligt sind. Sie werden von den verschiedensten Zellarten gebildet, u.a. von Makrophagen und T-Lymphozyten. Als physiologische Mediatoren nehmen sie z.B. Einfluss auf:

- Regulation der Immunantwort
- Hämatopoese: Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen
- Entzündungsreaktionen
- Induktion der Akute-Phase-Proteine
- Entstehung von Fieber
- Entstehung von Allergien
- Chemotaxis

Zur Gruppe der Zytokine werden Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und Koloniestimulierende Faktoren gezählt (Hauser et al. 2012).

Im Folgenden wird auf die Bedeutung und Funktion der Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Thema dieser Untersuchung waren, näher eingegangen.

1.3.1 Zytokine und Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit hMSCs

bFGF

Der Wachstumsfaktor bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) führt zu einer signifikanten Steigerung der migratorischen Aktivität der hMSCs und könnte obendrein ein Schlüsselreiz für die Migration von hMSCs in geschädigte Gewebeareale sein (Schmidt et al. 2006b). Darüber hinaus, konnte

nachgewiesen werden, dass bFGF die Differenzierung der hMSCs zu Adipozyten fördert (Song et al. 2014).

GCP-2

GCP-2 (Granulocyte Chemotactic Protein-2) wird von hMSCs exprimiert (Wuyts et al. 2003). Eine Studie von Kim et al. (2012) zeigte zudem, dass eine Überexpression von GCP-2 zu einer verbesserten Herzfunktion in einem Herzinfarktmodell führte, da dies eine Steigerung der Angio- bzw. Vaskulogenese nach sich zog. hMSCs könnten somit durch die Expression von GCP-2 zu einer Erhöhung der Überlebenschancen nach einem Herzinfarkt beitragen (Kim et al. 2012).

IL-6

IL-6 (Interleukin-6) steigert die Migration der hMSCs (Schmidt et al. 2006b, Rattigan et al. 2010) und stimuliert ihre Differenzierungsfähigkeit zu Osteoblasten (Taguchi et al. 1998). Es ist außerdem an der anti-apoptischen Funktion der hMSCs beteiligt: durch die Induktion der IL-6-Expression haben hMSCs eine protektive Wirkung auf Lymphozyten, indem sie deren Apoptose inhibieren (Xu et al. 2007).

IL-8

IL-8 (Interleukin-8) fördert ebenfalls die hMSCs-Migration (Bi et al. 2014) und wird zugleich von hMSCs exprimiert (DelaRosa und Lombardo 2010). Durch die Sekretion von IL-8 beeinflussen hMSCs u.a. die Angiogenese und das Wachstum von Tumorzellen (Wang et al. 2015).

MCP-1

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) besitzt die Fähigkeit, die Migration der hMSCs zu erhöhen und wird auch gleichzeitig von den Stammzellen sezerniert, wodurch es einen positiven Einfluss auf Angiogenese und Apoptose nehmen kann (Boomsma und Geenen 2012, Guo et al. 2013).

MIF

MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) ist an der Regulation der migratorischen Aktivität der hMSCs beteiligt, indem es u.a. die Migration der Zellen zu verletztem Gewebe inhibiert (Barrilleaux et al. 2009, Fischer-Valuck et al. 2009). Es hat zudem einen protektiven Effekt auf hMSCs, indem es deren Apoptose in einem hypoxischem Milieu verhindert und zu einer Reduktion des oxidativen Stresses führt (Xia et al. 2015).

NCAM-1

NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) wird zum einen von hMSCs exprimiert und fördert zum anderen die Migrationsaktivität dieser Zellen (Shi et al. 2012). NCAM soll außerdem bei der Unterstützung der Hämatopoese durch hMSCs beteiligt sein (Wang et al. 2005, Wang et al. 2010). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung der hMSCs zu Adipozyten, durch die Abwesenheit von NCAM beeinträchtigt ist, womit davon ausgegangen werden kann, dass NCAM eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielt (Yang et al. 2011).

TIMP-1 und TIMP-2

hMSCs sind im Stande hohe Level an TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase) zu sezernieren, wodurch eine große Bandbreite an löslichen MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) gehemmt wird (Lozito et al. 2014). So inhibieren hMSCs, beispielsweise, über TIMP-1 und TIMP-2 die exogenen Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 und verhindern damit eine Schädigung der extrazellulären Matrix (Lozito und Tuan 2011). TIMP-2 ist außerdem in der Lage die Migrationsaktivität der hMSCs zu steigern, wohingegen TIMP-1 zu einer verminderten Migrationsaktivität führt (Ries et al. 2007). Allerdings scheint vor allem die Balance von MMPs/TIMPs ausschlaggebend für die Migrationsfähigkeit der hMSCs zu sein (Tondreau et al. 2009).

VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) wird nachweislich von hMSCs produziert (Kagiyada et al. 2008) und fördert zusätzlich die migratorische Aktivität, als auch die Proliferation dieser Zellen (Ball et al. 2007, Wang et al. 2015). VEGF ist außerdem an der Regulation der adipogenen und osteogenen Differenzierung der hMSCs beteiligt (Berendsen und Olsen 2014, Berendsen und Olsen 2015).

1.4 Zielsetzung

Aus einer früheren Studie von Schmidt et al. (2013) ist bekannt, dass Schwefellost schon in geringen Konzentrationen zu einer Immobilisation bzw. herabgesetzten Migrationsaktivität von humanen mesenchymalen Stammzellen führt. Diese herabgesetzte Migrationsaktivität könnte ursächlich für die mangelhafte Gewebeerneuerung und den daraus resultierenden, chronischen Langzeitschäden nach einer Schwefellostvergiftung sein, für die bis dato keine kausale Behandlungsmöglichkeit existiert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, herauszufinden, ob es eine Möglichkeit gibt, die Migrationsaktivität mithilfe verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren zu steigern und die hMSCs damit wieder mobilisieren zu können.

Durch die Erkenntnisse dieser Studie, könnten somit neue Therapieansätze ermöglicht werden.

Die Zellen wurden hierfür mit den Wachstumsfaktoren bFGF, VEGF, den Zytokinen GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL-8 (m), MCP-1, MIF, sowie mit NCAM-1, TIMP-1 und TIMP-2 behandelt. Die Auswahl der Zytokine und Wachstumsfaktoren geschah, unter anderem, aufgrund des zuvor untersuchten Sekretoms der hMSCs: unter Einwirkung von Schwefellost kam es zu einer veränderten Sekretion dieser Faktoren.

Im Vorfeld fand eine Exposition mit vier unterschiedlichen Konzentrationen an Schwefellost statt, wobei die Menge der migrierten Zellen gezählt wurde. Ausgewählt wurden subletale Dosen in Höhe von $1 \mu\text{M SL}$ (= IC_1) und $10 \mu\text{M SL}$ (= IC_5), eine mittlere letale Dosis von $70 \mu\text{M SL}$ (= IC_{50}) und eine letale Dosis von $570 \mu\text{M SL}$ (IC_{90}).

Durch die Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sollte geklärt werden, ob es zu einer Hochregulierung der Migration kommt und wenn ja, in welchem Maße diese stattfindet. Die Anzahl der migrierten Zellen, sowohl in An – als auch in Abwesenheit der Zytokine und Wachstumsfaktoren, wurde jeweils in Relation zu einer reinen Kontrollgruppe gesetzt.

Für die Migrationsversuche wurde eine modifizierte Boyden-Kammer verwendet. Die Auszählung der migrierten Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskops.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Accutase, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Alpha – MEM (Modified Eagle's Medium), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Ethanol, VWR International GmbH, Radnor, USA

Fetales Kälberserum (FKS), Invitrogen, Carlsbad, USA

L-Glutamin, Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA

Penicillin/Streptomycin, Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA

Schwefellost ($C_4H_8Cl_2S$, Reinheit >99%, NMR), wurde von dem Bundesministerium der Verteidigung (BMVg) zur Verfügung gestellt

Vectashield® DAPI - Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.2 Verwendete Geräte und Arbeitsmaterialien

Brutschrank HERAcell 150i CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Einmalskalpelle, B. Braun, Melsungen, Deutschland

Ficoll-Paque™ Plus, 100ml, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien

Filter, Fluoro Blok™ Cell Culture Insert, 24-Well, 8,0 µm Porengröße, Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Fluoreszenz – Mikroskop ECLIPSE Ni, Nikon, Tokio, Japan

Lamina SAFE 2020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Mikropipetten/Variopipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikroskop Axiovert 40C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Neubauer Zählkammer C-Chip, NanoEnTek, Seoul, Korea

Vortex Mixer VF2, IKA-Labortechnik, Staufen in Breisgau, Deutschland

Wasserbad, GFL, Burgwedel, Deutschland

Zellkulturplatte, Multiwell™ 24-Well, Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Zellkulturschale, 100x20 mm, Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Zellkulturschale, 60x15 mm, Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Zellsieb, 70 µm, Falcon®, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Verwendete Kits

Bezogen von RayBiotech, Inc., Norcross, USA:

- Human Cytokine Array G9 (8)
- Human Cytokine Array G10 (8)
- Human Cytokine Array G2000 (8)

2.1.4 Verwendete Medien

Die hMSCs wurden in Alpha-MEM kultiviert. Dieses wurde mit 20% FKS versetzt, welches vor der Verwendung hitzeinaktiviert wurde, indem man es für 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubierte. Aliquots wurden bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Das Medium für die humanen mesenchymalen Stammzellen wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Zusammensetzung des Mediums für humane mesenchymale Stammzellen (im Weiteren benannt als Stammzellmedium oder Medium):

500 ml Alpha-MEM

127 ml FKS (20%)

6,3 ml Penicillin/Streptomycin (1%)

6,3 ml L-Glutamin (1%)

= 639,6 ml Endvolumen

Medien für die in vitro Differenzierungen (s. 2.2.4.1):

Bezogen von PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland:

- Mesenchymal Stem Cell – Adipogenic Differentiation Medium
- Mesenchymal Stem Cell – Chondrogenic Differentiation Medium
- Mesenchymal Stem Cell – Osteogenic Differentiation Medium

2.1.5 Verwendete Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokin/ WF	Hersteller	Endkonzentration	Gelöst in
bFGF	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA	20 ng/ml	Steriles Wasser
GCP-2	US Biological, Salem, USA	20 ng/ml	Steriles Wasser
IL-6	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA	20 ng/ml	100mM Essigsäure
IL-8 (e)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA	20 ng/ml	Steriles Wasser
IL-8 (m)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA	20 ng/ml	Steriles Wasser
MCP-1	Invitrogen, Carlsbad, USA	10 ng/ml	Steriles Wasser
MIF	Biomol, Hamburg, Deutschland	20 ng/ml	PBS
NCAM-1	Sino Biological by Life Technologies, Carlsbad, USA	10 ng/ml	PBS
TIMP-1	Invitrogen, Carlsbad, USA	10 ng/ml	Steriles Wasser
TIMP-2	Sino Biological by Life Technologies, Carlsbad, USA	10 ng/ml	PBS
VEGF	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA	10 ng/ml	Steriles Wasser

Tabelle 1: Produktinformation aller verwendeten Zytokine und Wachstumsfaktoren

Bei den verwendeten Endkonzentrationen handelt es sich um physiologische Konzentrationen, die auch in zahlreichen Literaturstellen nachzulesen sind.

2.1.6 Humanes Zellmaterial

Alle Versuche mit humanem Zellmaterial wurden mit Genehmigung der Ethikkommission durchgeführt und gemäß den Vorgaben eines Labors der biologischen Sicherheitsstufe 2 behandelt und entsorgt.

2.1.6.1 Knochenmark

Humanes Knochenmark wurde aus Hüftköpfen, welche im Rahmen einer totalen Endoprothese des Hüftgelenkes zur Verfügung gestellt wurden, mobilisiert. Hierfür bestand eine Kooperation mit der Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie des HELIOS Amper-Klinikums Dachau. Die dafür nötige Einverständniserklärung der Patienten wurde im Vorfeld von dem jeweiligen behandelnden Arzt eingeholt.

Die insgesamt 13 Hüftköpfe stammten von freiwilligen, zuvor über die Verwendung aufgeklärten, gesunden Spendern in einem Alter von 52-86 Jahren. Das mittlere Alter betrug 71 Jahre, wobei sich der weibliche Anteil auf 66,7% und der männliche Anteil auf 33,3% belief.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte fanden unter einer Sterilbank, welche über einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom verfügte, statt. Somit wurde ein Arbeiten unter sterilen Bedingungen sichergestellt. Die dabei verwendeten Materialien, wie z.B. Pipetten, Gefäße und Medien waren ebenfalls steril. Alle weiteren, zur Arbeit unter der Sicherheitsbank benötigten Materialien, wurden zuvor mit 80%-igem Ethanol desinfiziert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, sowie einem CO₂-Anteil von 5%.

Die Zellkulturlabore waren Teil eines S1-Sicherheitsbereiches.

2.2.2 Isolierung von hMSCs aus einem Hüftkopf

Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark, der uns zur Verfügung gestellten Hüftköpfe, gewonnen.

Die Hüftköpfe wurden stets innerhalb von 4 Stunden nach dem Absetzen verwendet. Wichtig hierbei war, dass diese bis zur Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert wurden. Das Knochenmark wurde mit einem sogenannten „scharfen Löffel“ aus dem Hüftkopf geschabt, wobei darauf geachtet wurde, nicht zu nah an den verknöcherten Bereich zu kratzen, um eine Aufnahme von Osteoblasten zu vermeiden. Das gewonnene Material wurde anschließend in die zuvor mit 25 ml Stammzellmedium befüllten Falcon®-Röhrchen gegeben. Durch kräftiges Schütteln lösten sich die hMSCs aus den Knochenbälkchen heraus. Die Zellsuspension wurde nun durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 70 µm gefiltert. Zur Separation der hMSCs von den übrigen Bestandteilen der Knochenmarksuspension, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen 30 ml Ficoll™ mit der Zellsuspension überschichtet und anschließend bei einer Temperatur von 22°C und 1800 rpm für 30 min ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Durch diese Art der Dichtegradientenzentrifugation

reicherten sich die hMSCs in einer Interphase an, wohingegen sich Partikel mit höherer Dichte am Boden des Gefäßes ansammelten (Abb. 9). Der so entstandene Ring aus kernhaltigen Zellen wurde anschließend aus der Interphase mit einer Pipette abgesaugt und in 30-50 ml DPBS aufgenommen und erneut bei 22°C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das DPBS abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und nochmals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 5 ml Alpha-MEM resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (näheres zur Zählweise s. 2.2.3). Abschließend wurden die Zellen in großen Falcon®-Zellkulturschalen plattiert.

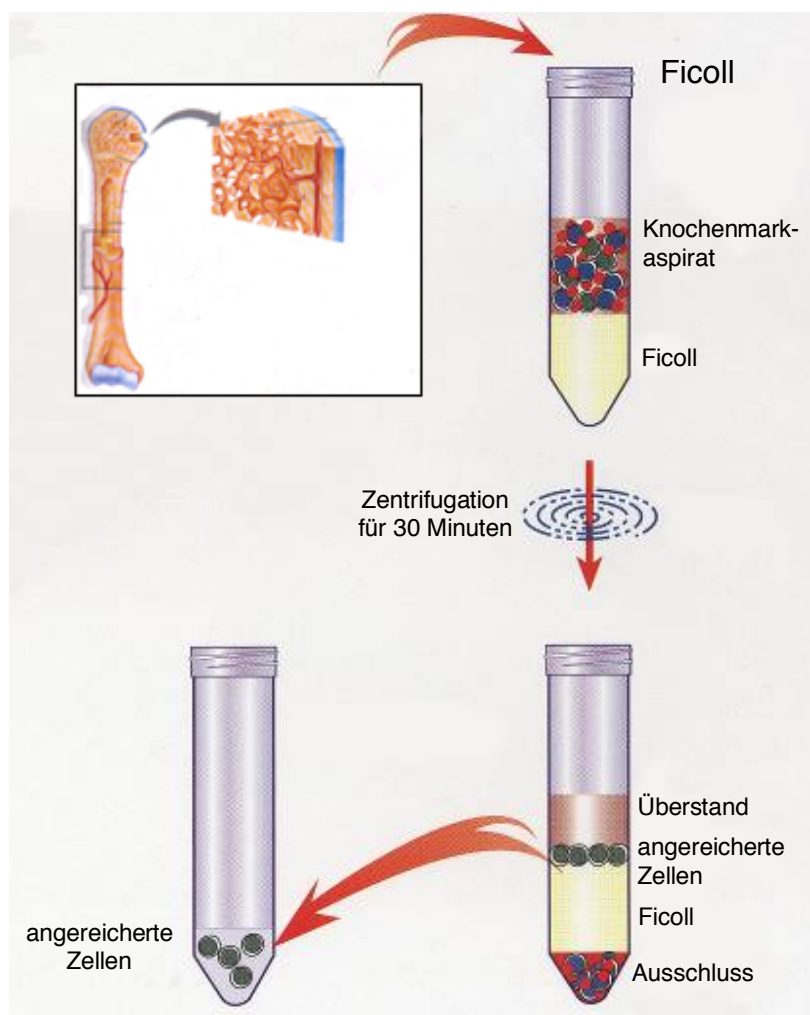


Abb. 9: Aufreinigung und Selektion von mesenchymalen Stammzellen

2.2.3 Kultivierung und Passage der hMSCs

Kultivierung

Zur Kultivierung wurden hMSCs in einer Konzentration von ca. 2.000 Zellen/cm² in Falcon®-Zellkulturschalen mit 10 ml Stammzellmedium angesetzt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 48 h, um die nicht adhärenen, hämatopoetischen Zellen zu entfernen. Danach fand zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel, durch kompletten Austausch des Stammzellmediums, statt. Hierdurch wurden alle weiteren, nicht adhärenen Zellen schrittweise herausgespült. Bei Erreichen einer 60%-igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden zwischen der ersten und dritten Passage für die Migrationsversuche verwendet. Eine weitere Verwendung nach erfolgter dritter Passage fand nicht statt.

Passage

Zur Passage wurde das Medium aus den Zellkulturschalen abgesaugt. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen mittels enzymatischer Behandlung. Hierfür wurden die Zellen mit 4 ml Accutase-Lösung für maximal 4 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, die maximale Inkubationszeit nicht zu überschreiten, da die Zellen durch die Accutase irreversible Schäden hätten nehmen können. Der Erfolg der Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit 25 ml Stammzellmedium bei 22°C und 1600 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Gesamtzellzahl konnte mit folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl / ml} = (\text{Zellzahl}_{(4 \text{ Großquadrate})} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

Zum Schluss erfolgte, zur weiteren Kultivierung, die Replattierung der Zellen.

2.2.4 Charakterisierung und Qualitätskontrolle der hMSCs

In dieser Studie wurden verschiedene, etablierte Methoden angewendet, um die Qualität der hMSCs zu überprüfen.

Die Charakterisierung der hMSCs erfolgte gemäß Literaturangaben mit Hilfe von fünf verschiedenen Oberflächenmarkern mittels FACS-Analyse (Pittenger et al. 1999). Infolgedessen wurden hMSCs als CD14-/CD34-/CD45-/CD105+/CD106+ definiert. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Zellen der hämatogenen Linie handelt. Des Weiteren erfolgte eine tägliche, mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie (Abb. 10).

Um das Proliferationspotential der hMSCs zu beweisen, wurde ein CFU-F Assay verwendet.

Letzten Endes wurden zur Bestätigung, dass es sich bei den isolierten Zellen um Stammzellen handelt, Differenzierungsassays in Richtung der chondrogenen, osteogenen und adipogenen Linie angesetzt (genaue Vorgehensweise s. 2.2.4.1)

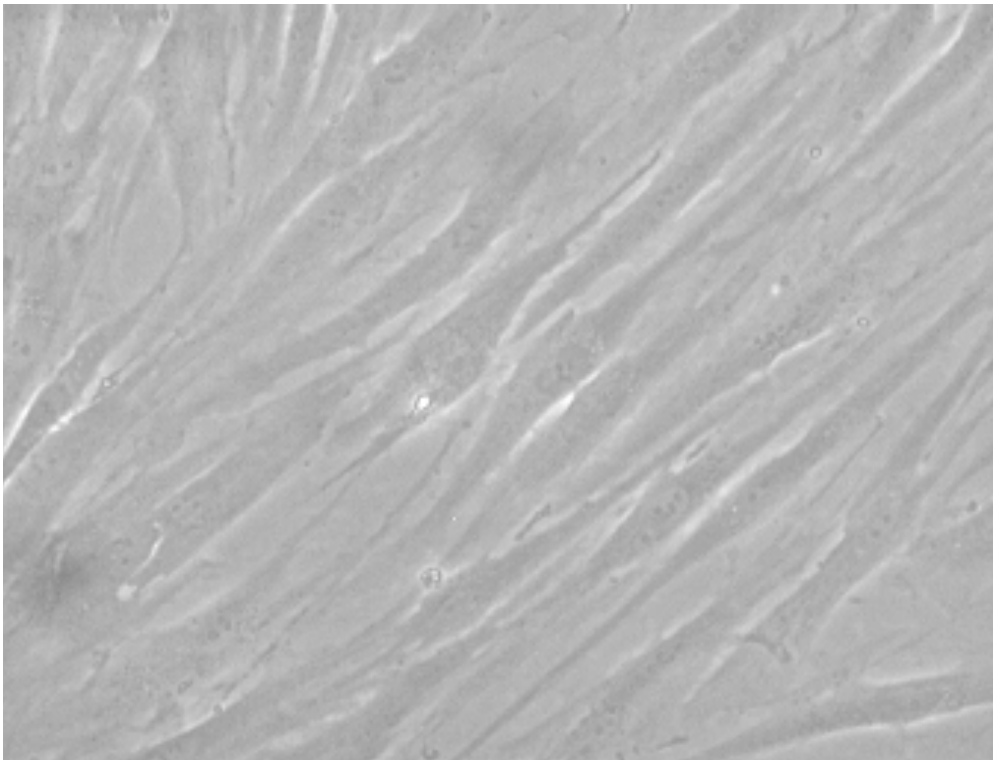


Abb. 10: Mikroskopische Kontrolle der hMSCs

2.2.4.1 In vitro Differenzierung

Die im folgenden beschriebenen Vorgänge wurden alle gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Chondrogene Differenzierung

Für eine Differenzierung in Chondroblasten wurden 1×10^5 hMSCs pro Ansatz benötigt. Die Kultivierung erfolgte mit Hilfe von chondrogenem Differenzierungsmedium in einem Falcon®-Röhrchen mit locker aufliegendem Deckel. Alle drei Tage fand ein Mediumwechsel statt. Die Differenzierung benötigte eine 21-tägige Inkubationszeit. Danach erfolgte eine Färbung mit Alcianblau, Einbettung in Tissue-Tek® Compound und anschließende Einfrierung bei -20°C . Zur Auswertung wurden Gefrierschnitte angefertigt.

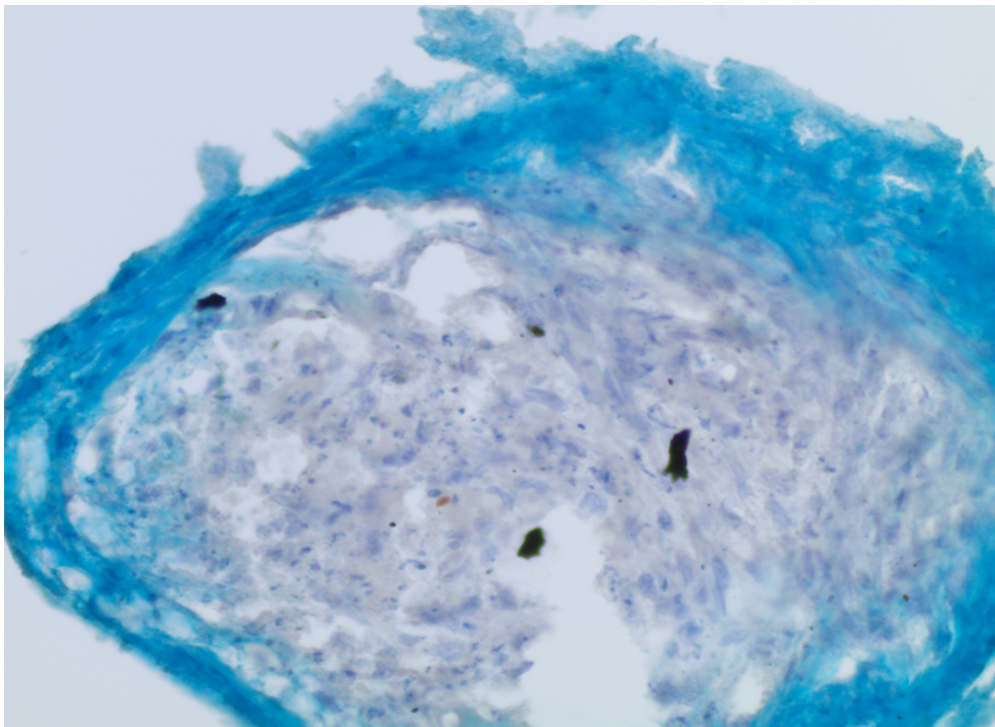


Abb. 11: Chondrogene Differenzierung

Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die hMSCs in einer Dichte von $3,15 \times 10^4$ Zellen/cm² in vier-Well-Platten mit Stammzellmedium angesetzt. Nach Erreichen einer 100%-igen Konfluität, wurden die Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium versorgt, welches alle drei Tage gewechselt wurde.

Nach einer Inkubationszeit von 21 Tagen, wurde die Bildung von kalziumhaltigen Strukturen mittels von Kossa-Färbung nachgewiesen. Diese erschienen unter dem Lichtmikroskop schwarz.

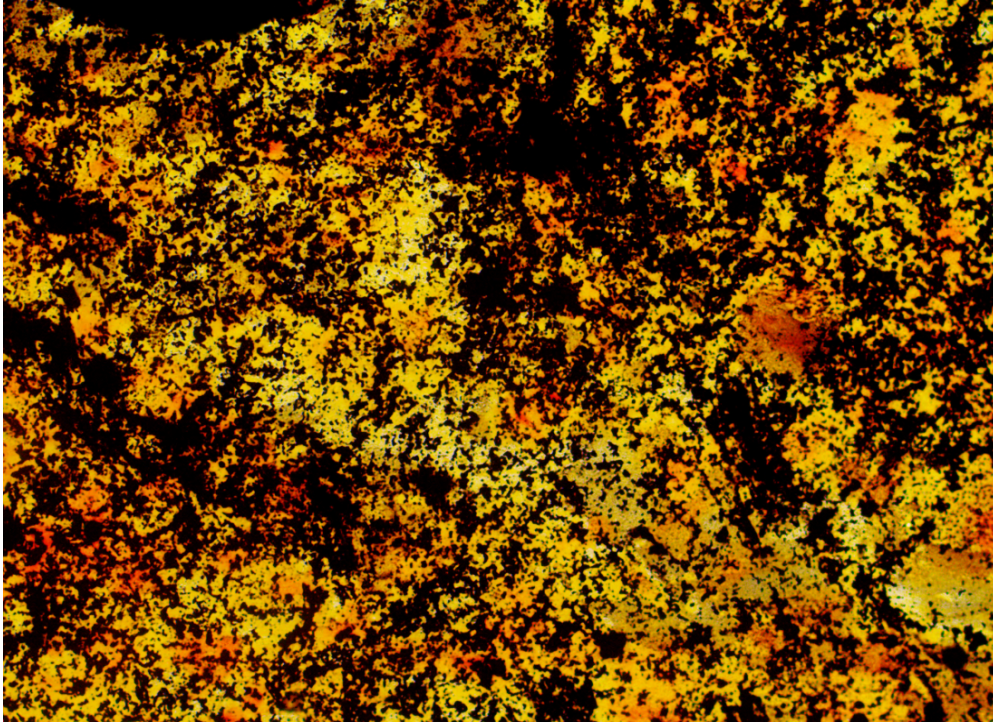


Abb. 12: Osteogene Differenzierung

Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung erfolgte, ebenso wie die osteogene Differenzierung, in vier-Well-Platten, in welchen die hMSCs mit einer Dichte von $3,15 \times 10^4$ Zellen/cm² in Stammzellmedium ausgesät wurden. Diese wurden nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluität in adipogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Auch hier wurde das Medium alle drei Tage komplett ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen, wurde der Erfolg der Differenzierung mit Hilfe einer Sudan-III-Hämalaun-Färbung nachgewiesen. Unter dem Lichtmikroskop waren die Lipidvakuolen rot bis orange gefärbt.

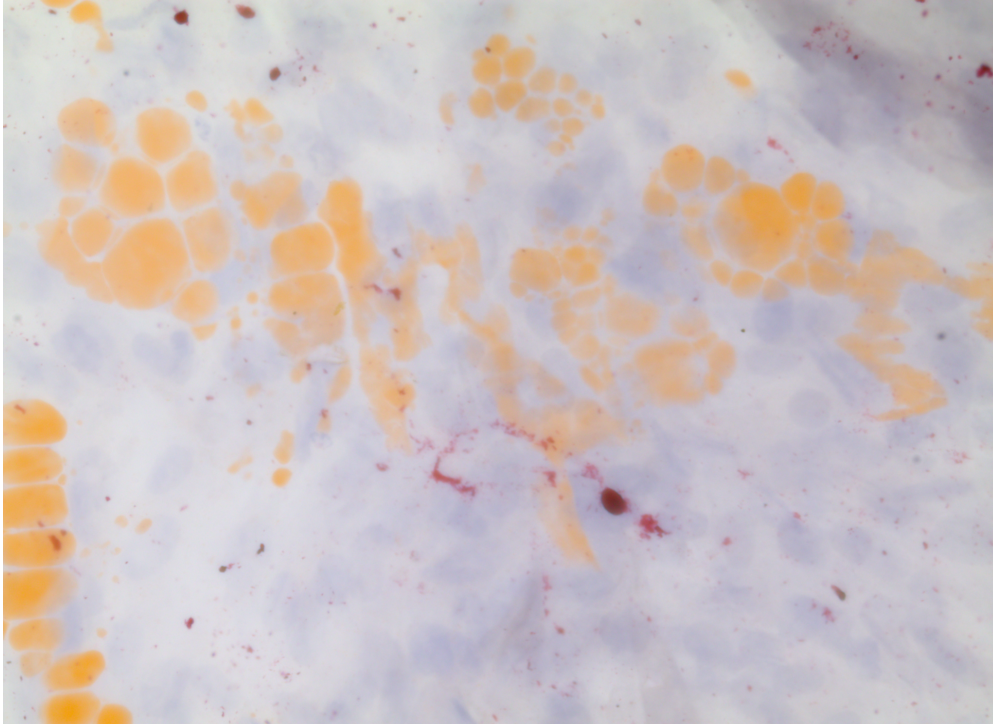


Abb. 13: Adipogene Differenzierung

2.2.5 Sekretom der hMSCs unter Einfluss von Schwefellost

Das Sekretom der hMSCs wurde mit Hilfe drei verschiedener Slide-Chip Array Kits untersucht. Für die Sekretomversuche wurden die hMSCs für insgesamt 8 Stunden mit $70 \mu\text{M}$ (= IC_{50}) und $570 \mu\text{M}$ (= IC_{90}) Schwefellost behandelt (genaue Vorgehensweise s. 2.2.6). Anschließend wurde der Mediumüberstand für die Analyse von 275 Zytokinen verwendet.

Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

2.2.6 Exposition der hMSCs mit Schwefellost

Herstellung der Schwefellost-Verdünnung

Um die hMSCs für die Migrationsversuche verwenden zu können, fand im Vorfeld eine Exposition mit Schwefellost statt. Bei dieser wurden die Zellen mit vier verschiedenen Konzentrationen von Schwefellost behandelt:

IC_1 (= $1 \mu\text{M}$ SL), IC_5 (= $10 \mu\text{M}$ SL), IC_{50} (= $70 \mu\text{M}$ SL), IC_{90} (= $570 \mu\text{M}$ SL).

Für die Exposition wurde zunächst eine Schwefellost-Vorverdünnung erstellt: 10 μ l Schwefellost (8 M) wurden in 190 μ l absolutem Ethanol gelöst. Diese Lösung entsprach 400 mM Schwefellost. Aus dieser wurden dann, durch weiteres Verdünnen mit Ethanol und Medium, die gewünschten Konzentrationen hergestellt.

Exposition

In jede Zellkulturschale wurden, nach Absaugen des alten Mediums, 5 ml frisches Medium und anschließend 5 ml einer Schwefellost-Lösung in den jeweiligen Konzentrationen 1; 10; 70; 570 μ M Schwefellost pipettiert und daraufhin für 1 h inkubiert. Nach der Exposition wurde das Schwefellost-haltige Medium abgesaugt und die Zellen passagiert (s. Vorgehensweise unter 2.2.3) und in einer Dichte von 1×10^4 hMSCs pro Migrationsfilter in eine 24-Well-Platte eingesetzt.

2.2.7 Migration/Boyden-Kammer

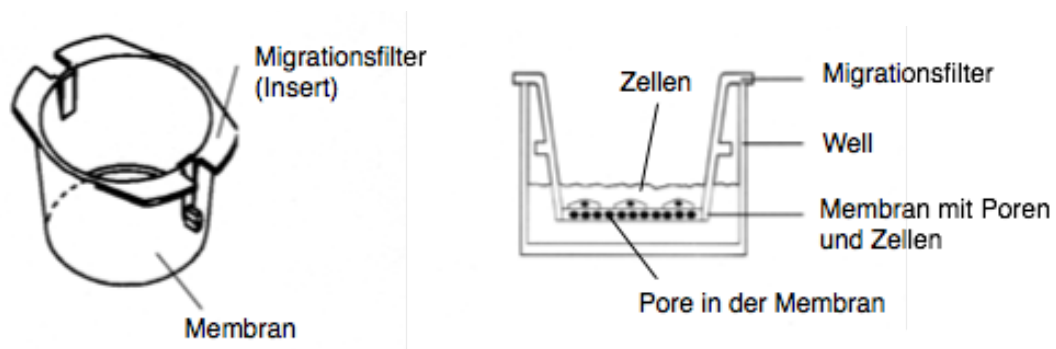


Abb. 14: Migration in einer modifizierten Boyden-Kammer

Schematische Darstellung des Versuchsbaus und der verwendeten Materialien

Um die Migration der hMSCs auszuwerten und um die Vergleichbarkeit mit den Vordaten von Schmidt et al. (2013) sicherzustellen, wurde eine modifizierte Boyden-Kammer verwendet. Hierfür wurde ein 24-Well HTS Fluoro Blok™ Insert System genutzt. Die Inserts bzw. Migrationsfilter besaßen eine Polyethylenmembran mit 8 μ m Poren, welche für die Migrationsversuche in eine

Well-Platte eingehängt wurden (Abb. 14). Diese Porengröße ermöglichte das aktive Hindurchwandern der Zellen. In jeden Filter wurden 1×10^4 hMSCs zusammen mit Stammzellmedium gegeben.

Die hMSCs migrierten in der Boyden-Kammer unter vier verschiedenen Bedingungen:

1. Kontrollgruppe ohne Zytokine / Wachstumsfaktoren:
unexponierte hMSCs
2. Kontrollgruppe mit Zytokine / Wachstumsfaktoren:
unexponierte hMSCs + jeweils eines der folgenden Zytokine / Wachstumsfaktoren: bFGF, GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL 8 (m), MCP-1, MIF, NCAM-1, TIMP-1, TIMP-2, VEGF.
3. Versuchsgruppe ohne Zytokine / Wachstumsfaktoren:
S-Lost-exponierte hMSCs der vier unterschiedlichen Konzentrationen (1; 10; 70; 570 μ M SL)
4. Versuchsgruppe mit Zytokine / Wachstumsfaktoren:
S-Lost-exponierte hMSCs der vier unterschiedlichen Konzentrationen (1; 10; 70; 570 μ M SL) + jeweils eines der folgenden Zytokine / Wachstumsfaktoren: bFGF, GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL 8 (m), MCP-1, MIF, NCAM-1, TIMP-1, TIMP-2, VEGF.

Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, drei- bis viermal mit PBS und anschließend drei- bis viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit einem Skalpell aus dem Migrationsfilter herausgeschnitten und zwischen zwei Deckgläschen in DAPI Mounting Medium eingebettet.

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich vor allem an AT-reiche Regionen der DNA bindet und bei Anregung durch UV-Licht blau fluoresziert (Abb. 15, Abb. 16). Daher erfolgte die Auszählung der migrierten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops in 400-facher Vergrößerung. Dies geschah in einem abgedunkelten Raum, um eine Ausbleichung der Objektträger zu vermeiden und um die Fluoreszenz besser auswerten zu können.

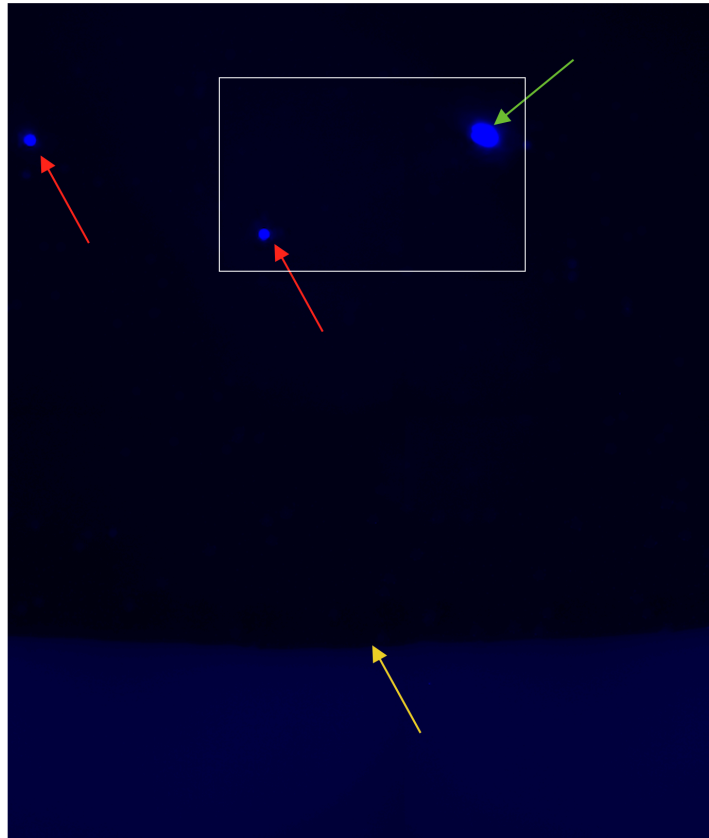


Abb. 15: Übersichtsaufnahme eines Migrationsfilters

Die Aufnahme erfolgte in 400-facher Vergrößerung. Der gelbe Pfeil kennzeichnet den Rand des Migrationsfilters. Man sieht eine komplett migrierte Zelle (grüner Pfeil) und zwei Zellen im Migrationsvorgang (rote Pfeile)



Abb. 16: Detailaufnahme einer migrierten Zelle

Vergrößerung des in Abbildung 15 eingezeichneten Bildausschnittes (weißer Kasten)

3 Ergebnisse

3.1 Sekretom der hMSCs

Unter Einfluss von Schwefellost veränderte sich das Sekretom der humanen mesenchymalen Stammzellen deutlich. Es erfolgte eine Behandlung mit $70 \mu\text{M}$ (= IC_{50}) und $570 \mu\text{M}$ (= IC_{90}) Schwefellost für insgesamt 8 Stunden. Damit beschreibt das Sekretom das Bild einer akuten Vergiftung.

Im Vergleich zur Kontrolle kam es sowohl zu einer vermehrten als auch verminderten Sekretion von bestimmten Faktoren. Eine übersichtliche Darstellung dieser Faktoren zeigt Tabelle 2.

Die Abbildung 17 beschreibt das veränderte Sekretom der hMSCs. Die Ordinate stellt die x-fache Veränderung im Vergleich zur Kontrolle dar, wohingegen die Abszisse die sekretierten Faktoren abbildet.

Auf Basis dieses Sekretoms fand, unter anderem, die Auswahl der Zytokine und Wachstumsfaktoren für die Migrationsversuche statt (in Tabelle 2 gelb hinterlegt). Es wurden Faktoren ausgewählt, welche eine veränderte Sekretion im Vergleich zur Kontrolle zeigten und für welche, darüber hinaus, ein Einfluss auf humane mesenchymale Stammzellen hinsichtlich ihrer Migrationsaktivität, Proliferations- oder Differenzierungsfähigkeit in der Fachliteratur beschrieben wurde. Ausgewählt wurden somit: bFGF, GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL 8 (m), MCP-1, MIF, NCAM-1, TIMP-1, TIMP-2, VEGF. Einen besonderen Wert legten wir auf die Faktoren, die potentiell in der Lage waren, die Migration zu steigern und unter Schwefellost-Exposition herabgesetzt waren. Die einzige Ausnahme hiervon, bildeten die Zytokine GCP-2 und TIMP-1.

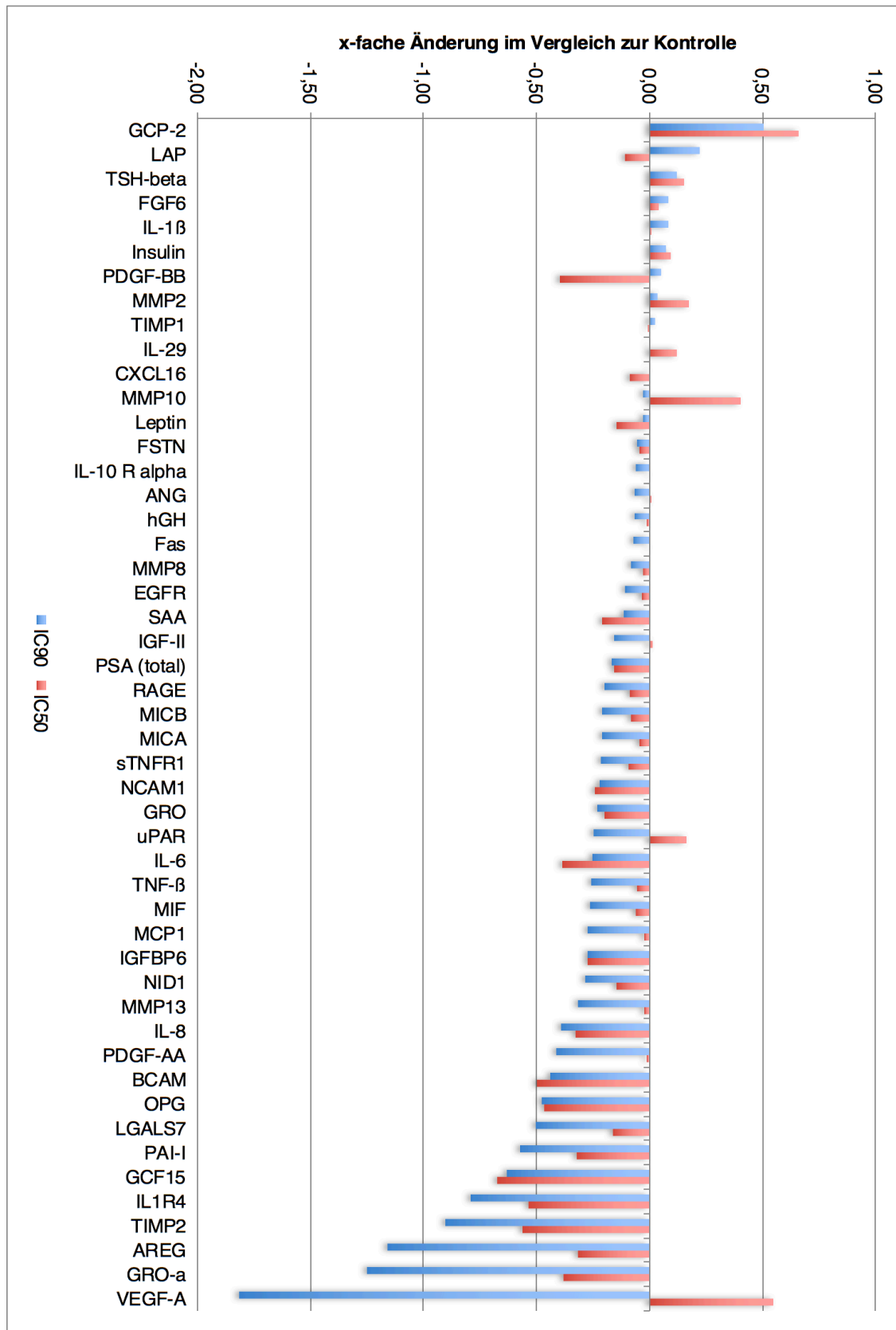


Abb. 17: Sekretom der hMSCs unter Einfluss von 70 µM (=IC₅₀) SL und 570 µM (=IC₉₀) SL

Ordinate: x-fache Änderung im Vergleich zur Kontrolle

Abszisse: sekretierte Faktoren

	Sekretion		
	gesenkt	gesteigert	gesenkt + gesteigert
ANG			x
AREG	x		
BCAM	x		
CXCL16			x
EGFR	x		
Fas			x
FGF6		x	
FSTN	x		
GCF15	x		
GCP-2		x	
GRO	x		
GRO-alpha	x		
hGH	x		
IGF-II			x
IGFBP6	x		
IL-10 R alpha			x
IL-1 β		x	
IL-29		x	
IL-6	x		
IL-8	x		
IL1R4	x		
Insulin		x	
LAP			x
Leptin	x		
LGALS7	x		
MCP1	x		
MICA	x		
MICB	x		
MIF	x		
MMP10			x
MMP13	x		
MMP2		x	
MMP8	x		
NCAM1	x		
NID1	x		
OPG	x		
PAI-I	x		
PDGF-AA	x		
PDGF-BB			x
PSA (total)	x		
RAGE	x		
SAA	x		
sTNFR1	x		
TIMP1		x	
TIMP2	x		
TNF- β	x		
TSH-beta		x	
uPAR			x
VEGF-A			x

x = trifft zu

= für die Migrationsversuche ausgewählte Zytokine und Wachstumsfaktoren

Tabelle 2: Übersicht des ausgewerteten Sekretoms der hMSCs

3.2 Migration der hMSCs

Die Migrationsaktivität der humanen mesenchymalen Stammzellen wurde, sowohl in An- als auch in Abwesenheit der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren, mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer getestet. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden erfolgte die Auszählung der migrierten Zellen.

Die Anzahl der migrierten hMSCs wurde anschließend gemittelt und auf der Ordinate im Koordinatensystem dargestellt. Die Abszisse beschreibt das jeweils verwendete Zytokine oder den verwendeten Wachstumsfaktor, sowie die verwendeten, unterschiedlichen Schwefellost-Konzentrationen.

Dargestellt wurde sowohl die Kontrolle im Vergleich mit der Zugabe des jeweiligen Faktors, als auch die vier verschiedenen Schwefellost-Konzentrationen (1; 10; 70; 570 μM SL), ebenfalls im Vergleich mit der Zugabe des jeweiligen Faktors. Die signifikanten Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Allen Migrationsversuchen gemein ist, dass es unter der reinen Schwefellost-Exposition zu einer reduzierten Migrationsaktivität im Vergleich zur Kontrolle kam. Durch die Behandlung mit den unterschiedlichen Faktoren sollte getestet werden, ob diese wieder hochreguliert werden kann.

Zu beachten ist, dass es sich um individuelles Patientenmaterial handelt, welches altersbedingten Schwankungen unterliegen kann. Infolgedessen können unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeiten auftreten, sodass unter Kontrollbedingungen nicht immer gleiche Werte erwartet werden können.

3.2.1 Migration der hMSCs unter bFGF

Die Migrationsaktivität der hMSCs konnte durch den Wachstumsfaktor bFGF positiv beeinflusst werden (siehe Abb. 18). In der Kontrolle migrierten 47 ± 2 Zellen durch die Membran. Durch die Zugabe von bFGF (Kontrolle+bFGF) konnte ein signifikanter Anstieg der Migration auf 53 ± 1 Zellen ($p < 0,001$) erzielt werden.

Unter der Schwefellost-Exposition kam es zu einer reduzierten Migrationsaktivität: bei einer Konzentration von 1 μM SL migrierten nur noch 35 ± 1 Zellen, bei 10 μM SL 38 ± 1 Zellen, bei 70 μM SL 31 ± 1 Zellen und bei 570 μM SL 2 ± 1 Zellen durch die Membran. Durch die Anwesenheit von bFGF konnten allerdings signifikante Anstiege der Migrationsaktivität beobachtet werden: bei 1 μM SL+bFGF migrierten 38 ± 1 Zellen ($p < 0,001$), bei 10 μM SL+bFGF sogar 44 ± 1 Zellen ($p < 0,001$) und bei 570 μM SL+bFGF 3 ± 1 Zellen ($p = 0,003$). Bei 70 μM SL+bFGF wurde jedoch ein signifikanter Abfall der Migrationsaktivität verzeichnet. Hier wanderten nur 29 ± 1 Zellen ($p < 0,001$) durch die Membran.

Die Anzahl der migrierten Zellen konnte allerdings durch die Zugabe von bFGF nicht mehr auf das Niveau der Kontrolle angehoben werden.

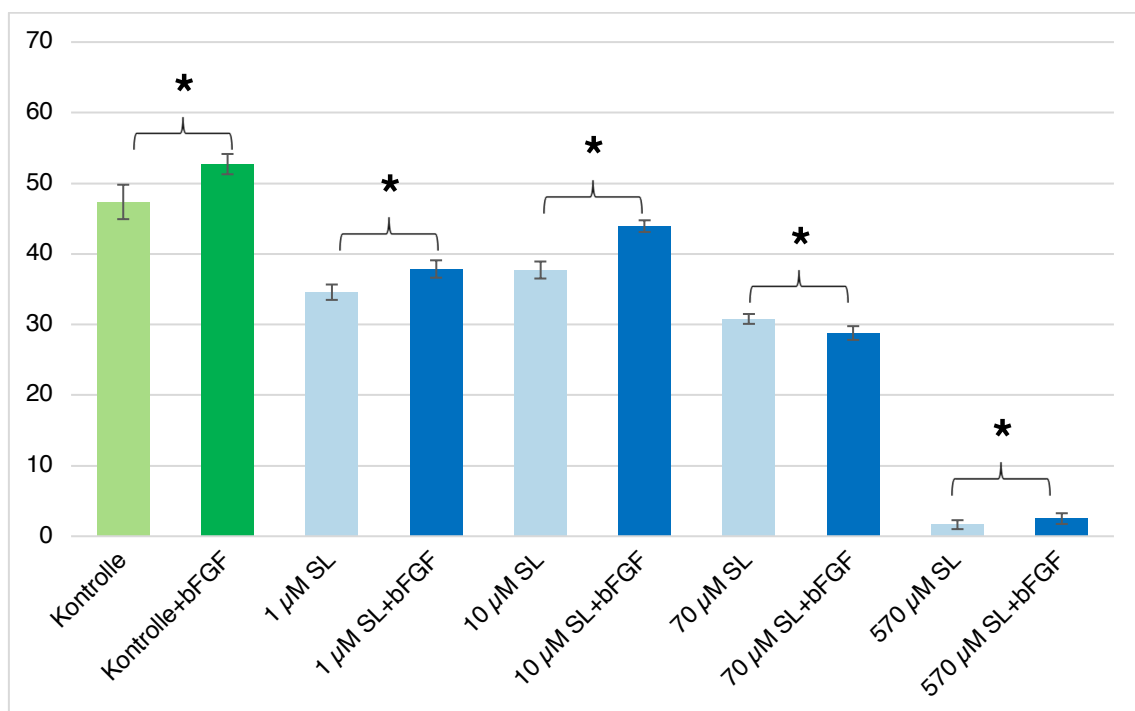


Abb. 18: Migration der hMSCs unter bFGF

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=14)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

3.2.2 Migration der hMSCs unter GCP-2

Durch die Behandlung mit GCP-2 kam es, wie in Abbildung 19 zu sehen ist, zu einer nachweislichen Steigerung der Migrationsaktivität. In der Kontrollgruppe wanderten 51 ± 3 Zellen durch die Membran, wohingegen durch die Kombination Kontrolle+GCP-2 ein signifikanter Anstieg auf 53 ± 2 Zellen ($p=0,013$) erreicht werden konnte. Durch die Schwefellost-Exposition kam es zu einer verminderten Migrationsrate: bei $1 \mu\text{M}$ SL migrierten 34 ± 1 Zellen, bei $10 \mu\text{M}$ SL 34 ± 1 Zellen, bei $70 \mu\text{M}$ SL 30 ± 1 Zellen und bei $570 \mu\text{M}$ SL 2 ± 1 Zellen durch die Membran. Diese konnte jedoch durch GCP-2 signifikant gesteigert werden: bei $1 \mu\text{M}$ SL+GCP-2 konnte ein Anstieg auf 36 ± 1 Zellen ($p<0,001$), bei $10 \mu\text{M}$ SL+GCP-2 sogar auf 39 ± 1 Zellen ($p<0,001$) und bei $70 \mu\text{M}$ SL+GCP-2 auf 32 ± 1 Zellen ($p<0,001$) beobachtet werden. Lediglich unter $570 \mu\text{M}$ SL+GCP-2 kam es mit 2 ± 1 migrierten Zellen zu keiner Veränderung.

Auch hier konnte die Anzahl der migrierten Zellen durch die Zugabe von GCP-2 nicht auf das Niveau der Kontrolle angehoben werden.

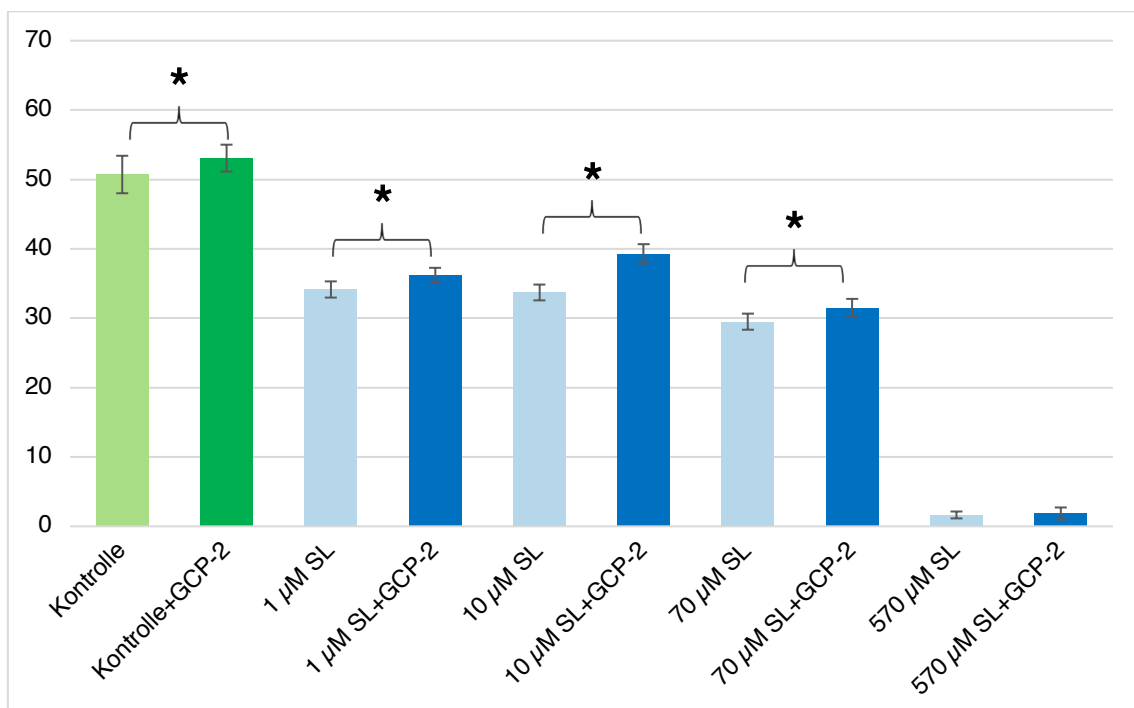


Abb. 19: Migration der hMSCs unter GCP-2

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=14)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p<0,05$)

3.2.3 Migration der hMSCs unter IL-6

Die Migrationsrate konnte in der Kontrollgruppe durch IL-6 nicht gesteigert werden (siehe Abb. 20). Es migrierten in der Kontrolle 54 ± 5 Zellen und in der Kontrolle+IL-6 nur 52 ± 8 Zellen durch die Membran. Allerdings konnte die durch Schwefellost deutlich verminderte Migrationsaktivität durch IL-6 in allen Bereichen signifikant angehoben werden. Unter Einfluss von $1 \mu\text{M}$ SL migrierten 40 ± 2 Zellen, wohingegen unter $1 \mu\text{M}$ SL+IL-6 ein deutlicher Anstieg auf 47 ± 2 Zellen ($p < 0,001$) verzeichnet wurde. Bei $10 \mu\text{M}$ SL migrierten 35 ± 3 Zellen, bei der Kombination $10 \mu\text{M}$ SL+IL-6 kam es zu einer Steigerung auf 45 ± 2 Zellen ($p < 0,001$). Gleiches konnte bei $70 \mu\text{M}$ SL beobachtet werden: es migrierten 34 ± 2 Zellen durch die Membran, unter $70 \mu\text{M}$ SL+IL-6 konnte die Anzahl auf 41 ± 2 Zellen ($p < 0,001$) angehoben werden. Auch die Steigerung von 3 ± 1 Zellen bei $570 \mu\text{M}$ SL auf 4 ± 1 Zellen ($p = 0,015$) bei $570 \mu\text{M}$ SL+IL-6 war signifikant.

Dennoch erreichte die Anzahl der migrierten Zellen durch die Zugabe von IL-6 nicht das Ausgangsniveau der Kontrolle.

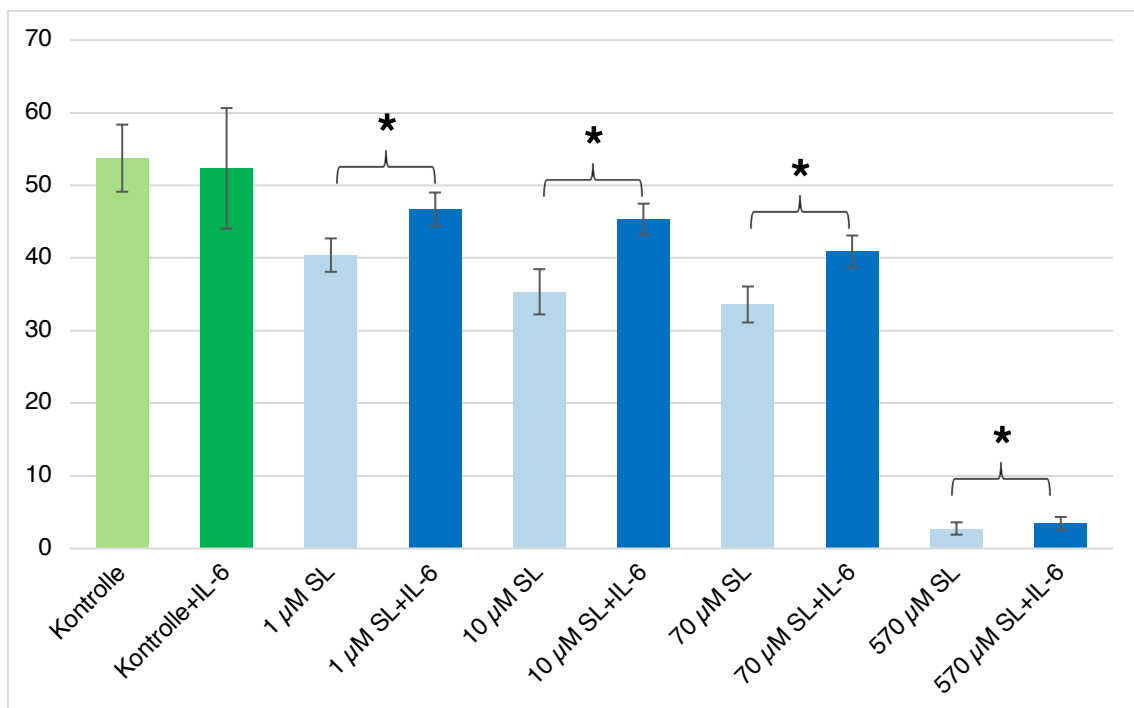


Abb. 20: Migration der hMSCs unter IL-6

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=20)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

3.2.4 Migration der hMSCs unter IL-8 (e), IL-8 (m) und MCP-1

Durch die Zytokine IL-8 (e), IL-8 (m) und MCP-1 kam es in allen Bereichen zu einem signifikanten Anstieg der Migrationsaktivität der hMSCs, wie Anhand der Abbildungen 21, 22 und 23 deutlich wird.

Besonders hervorzuheben sind die Faktoren IL-8 (e) und IL-8 (m), da bei 10 μM SL durch deren Zugabe jeweils eine signifikante Zunahme der Migration erreicht wurde, welche erstmalig das Niveau der Kontrolle überstieg.

IL-8 (e) (Abb. 21)

In der Kontrolle wanderten 36 ± 8 Zellen durch die Membran. Durch die Behandlung mit IL-8 (e) fand eine deutliche Steigerung auf 56 ± 9 Zellen ($p < 0,001$) statt. Durch Schwefellost wurde wiederum eine Abnahme der Migrationsaktivität erzielt: bei 1 μM SL passierten nur noch 22 ± 6 Zellen die Membran, bei 10 μM SL waren es 24 ± 5 Zellen, bei 70 μM SL 23 ± 5 Zellen und bei 570 μM SL 2 ± 1 Zellen. Unter IL-8 (e) kam es zu einer nachweislichen Hochregulierung der Migration: bei 1 μM SL+IL-8 (e) migrierten 37 ± 5 Zellen ($p < 0,001$), bei 10 μM SL+IL-8 (e) waren es mit 39 ± 6 Zellen ($p < 0,001$) sogar mehr als in der Kontrollgruppe, bei 70 μM SL+IL-8 (e) wanderten 32 ± 5 Zellen ($p < 0,001$) und bei 570 μM SL+IL-8 (e) 5 ± 2 Zellen ($p < 0,001$) durch die Membran.

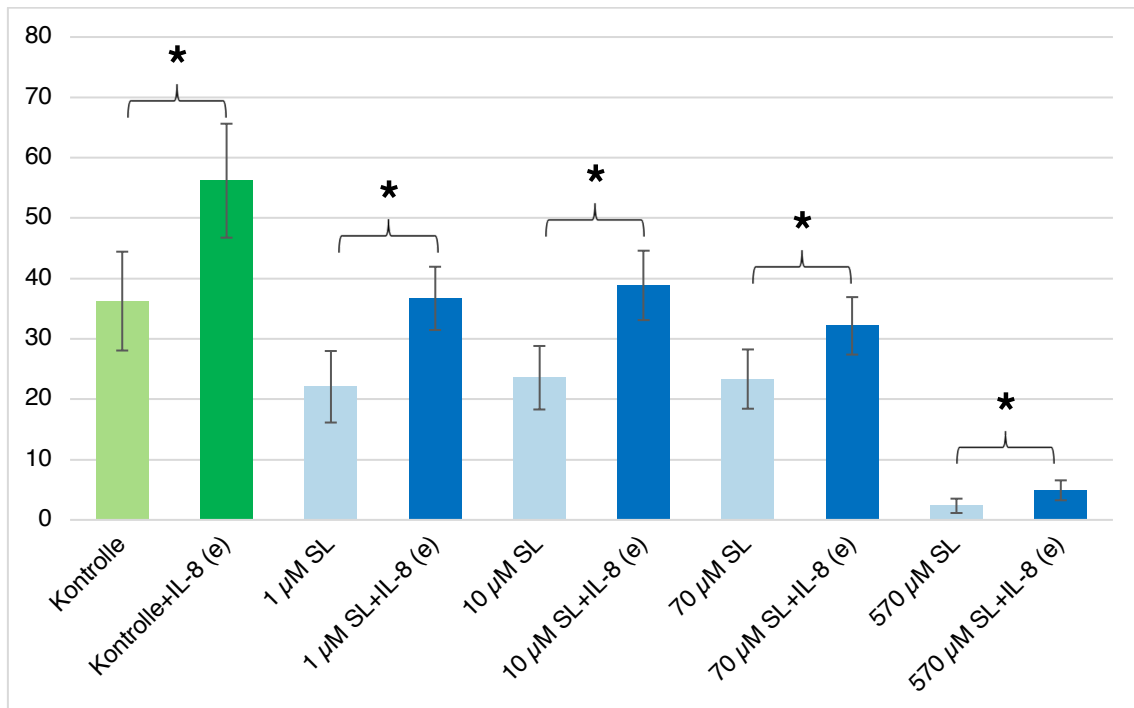


Abb. 21: Migration der hMSCs unter IL-8 (e)

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=20)

Abzisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

IL-8 (m) (Abb. 22)

In der Kontrollgruppe migrierten 53 ± 9 Zellen durch die Membran. Mit Hilfe von IL-8 (m) fand eine Steigerung auf 59 ± 7 Zellen ($p = 0,030$) statt. Durch die Schwefellost-Behandlung kam es erneut zu einer Abnahme der Migrationsaktivität: bei $1 \mu\text{M}$ SL passierten nur 40 ± 8 Zellen die Membran, bei $10 \mu\text{M}$ SL waren es 36 ± 7 Zellen, bei $70 \mu\text{M}$ SL 31 ± 6 Zellen und bei $570 \mu\text{M}$ SL 3 ± 1 Zellen. Unter IL-8 (m) kam es allerdings zu einer signifikanten Zunahme der Migration: bei $1 \mu\text{M}$ SL+IL-8 (m) migrierten 48 ± 5 Zellen ($p < 0,001$), bei $10 \mu\text{M}$ SL+IL-8 (m) waren es mit 56 ± 6 Zellen ($p < 0,001$) sogar mehr als in der Kontrollgruppe, bei $70 \mu\text{M}$ SL+IL-8 (m) migrierten 37 ± 5 Zellen ($p = 0,002$) und bei $570 \mu\text{M}$ SL+IL-8 (m) 5 ± 2 Zellen ($p = 0,002$).

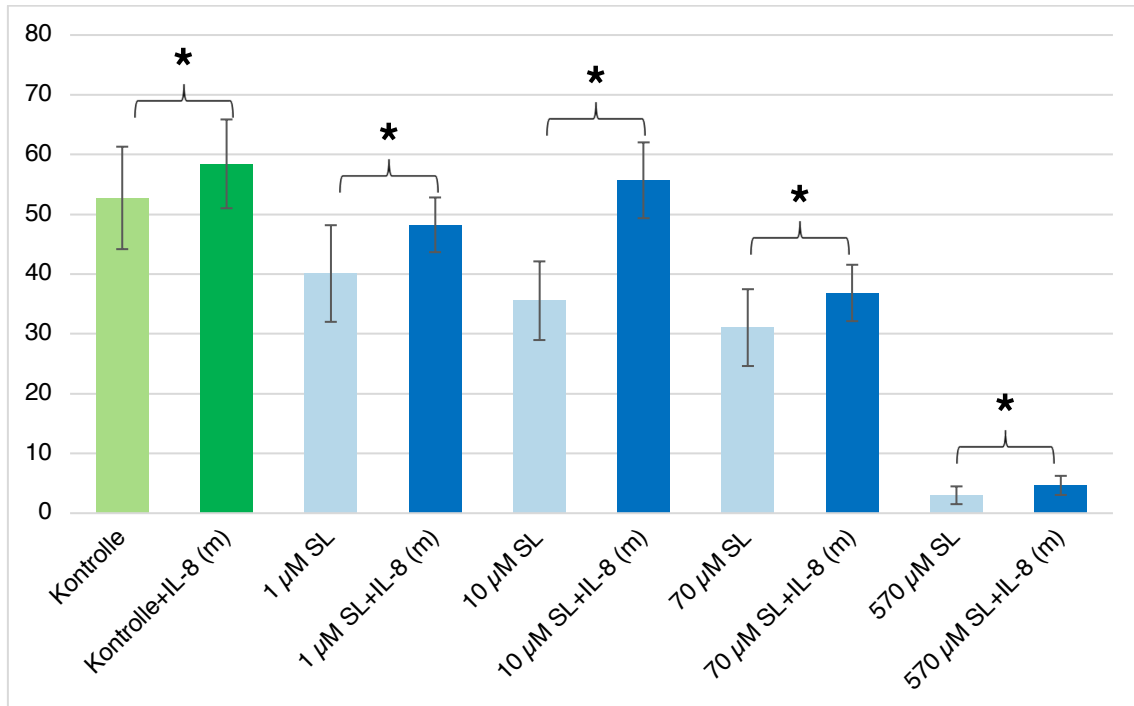


Abb. 22: Migration der hMSCs unter IL-8 (m)

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=20)

Abzisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung (p<0,05)

MCP-1 (Abb. 23)

Unter Kontrollbedingungen passierten 55 ± 1 Zellen die Membran. Durch die Zugabe von MCP-1 fand eine Steigerung auf 64 ± 1 Zellen ($p < 0,001$) statt. Unter der Schwefellost-Exposition wurde ein Rückgang der Migrationsaktivität verzeichnet: bei $1 \mu\text{M}$ SL wanderten nur 41 ± 1 Zellen durch die Membran, bei $10 \mu\text{M}$ SL waren es 36 ± 1 Zellen, bei $70 \mu\text{M}$ SL 31 ± 1 Zellen und bei $570 \mu\text{M}$ SL 3 ± 1 Zellen. Durch die Behandlung der hMSCs mit MCP-1 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Migration: bei $1 \mu\text{M}$ SL+MCP-1 migrierten 44 ± 1 Zellen ($p < 0,001$), bei $10 \mu\text{M}$ SL+MCP-1 41 ± 1 Zellen ($p < 0,001$), bei $70 \mu\text{M}$ SL+MCP-1 35 ± 1 Zellen ($p < 0,001$) und bei $570 \mu\text{M}$ SL+MCP-1 4 ± 1 Zellen ($p = 0,005$).

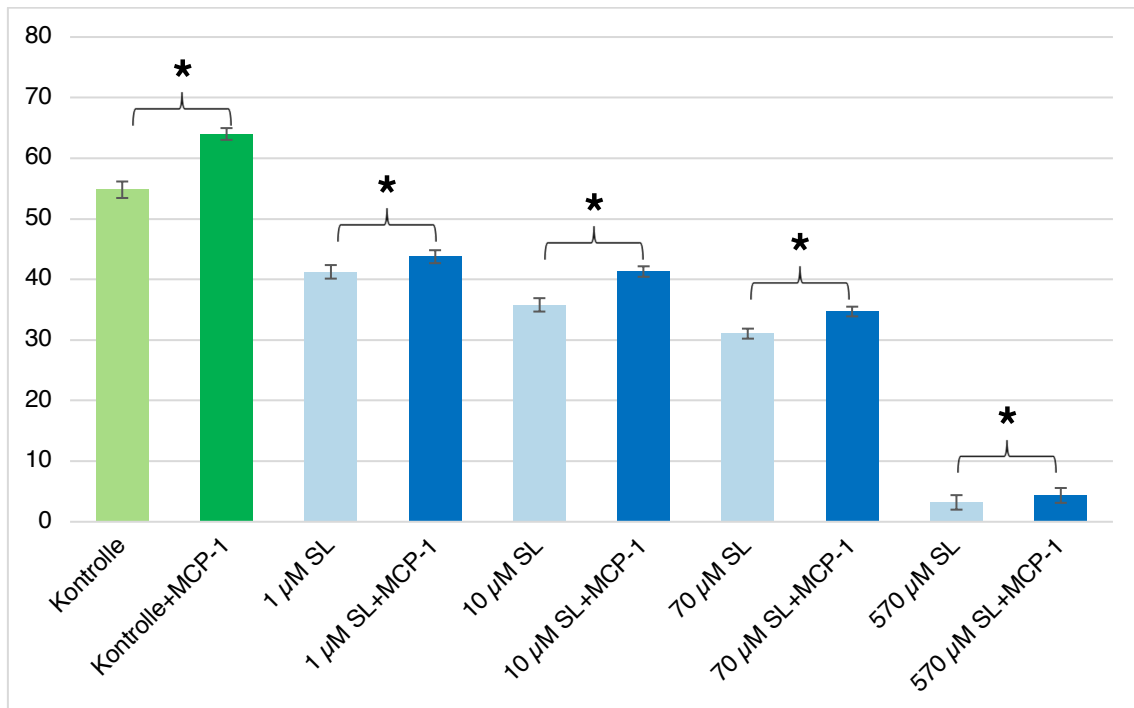


Abb. 23: Migration der hMSCs unter MCP-1

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=20)

Abzisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung (p<0,05)

3.2.5 Migration der hMSCs unter MIF, NCAM-1, TIMP-1 und TIMP-2

Bei der Behandlung der hMSCs mit den Faktoren MIF, NCAM-1, TIMP-1 und TIMP-2 konnte keine signifikante Steigerung der Migrationsaktivität verzeichnet werden (siehe Abb. 24-27). Durch die Schwefellost-Exposition wurde, wie bei allen anderen Faktoren auch, eine Abnahme der Migrationsaktivität hervorgerufen.

In der Kontrolle+TIMP-1 wanderten zwar mit 48 ± 4 Zellen mehr Zellen durch die Membran als in der Kontrollgruppe mit 46 ± 5 Zellen, dieser Anstieg erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p=0,171$). Lediglich unter der Bedingung $10 \mu\text{M}$ SL+TIMP-2 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Migration von 31 ± 3 Zellen bei $10 \mu\text{M}$ SL, auf 35 ± 3 Zellen ($p < 0,001$). Allerdings konnten signifikante Abnahmen der Migrationsraten unter Einfluss von MIF (Abb. 24), TIMP-1 (Abb.

25) und TIMP-2 (Abb. 26) beobachtet werden, auf welche im Folgenden genauer eingegangen wird.

Unter NCAM-1 (Abb. 27) und allen anderen getesteten Bedingungen konnten keine signifikanten und somit relevanten Veränderungen verzeichnet werden.

MIF (Abb.24)

In der Kontrollgruppe passierten 52 ± 2 Zellen die Membran, unter Einfluss von $70 \mu\text{M}$ SL waren es 22 ± 2 Zellen. Unter der Bedingung Kontrolle+MIF migrierten nur noch 45 ± 4 Zellen ($p < 0,001$) und bei $70 \mu\text{M}$ SL+MIF nur 21 ± 1 Zellen ($p = 0,036$), was einer signifikanten Erniedrigung entspricht.

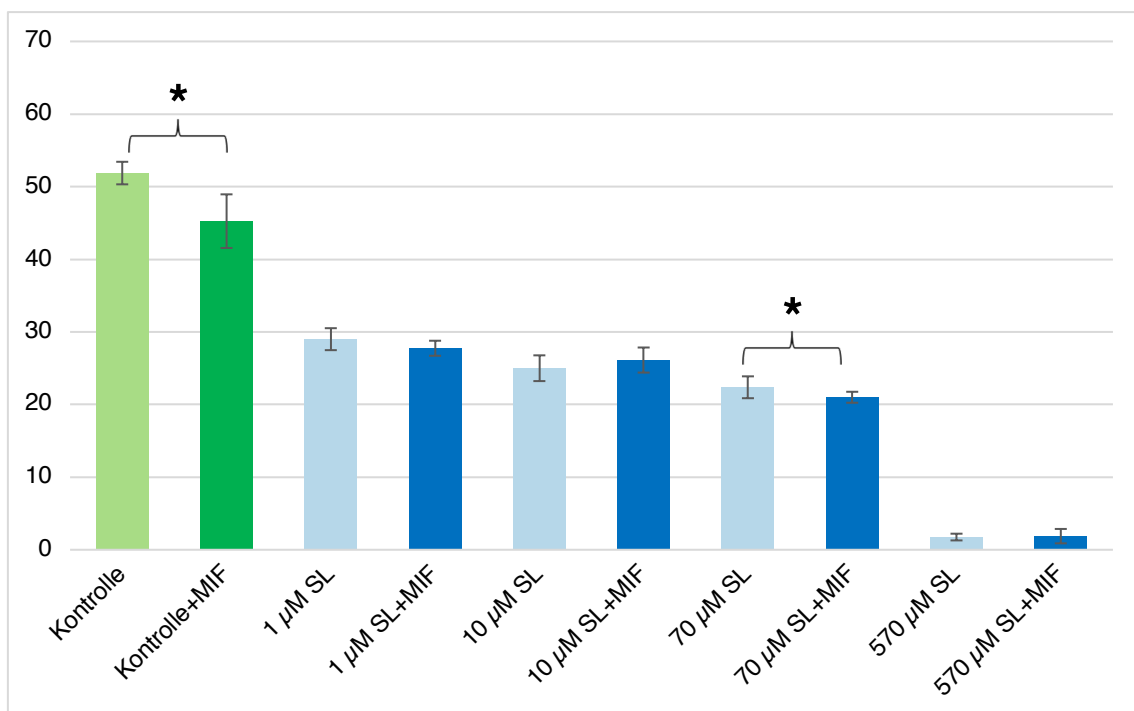


Abb. 24: Migration der hMSCs unter MIF

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=8)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

TIMP-1 (Abb. 25)

Bei 1 μM SL wanderten 40 ± 3 Zellen und bei 70 μM SL 29 ± 2 Zellen durch die Membran. Durch die Behandlung mit dem Faktor TIMP-1 kam es zu einer signifikant verminderten Migrationsrate. Bei 1 μM SL+TIMP-1 migrierten 34 ± 2 Zellen ($p < 0,001$), bei 70 μM SL nur 25 ± 4 Zellen ($p < 0,001$).

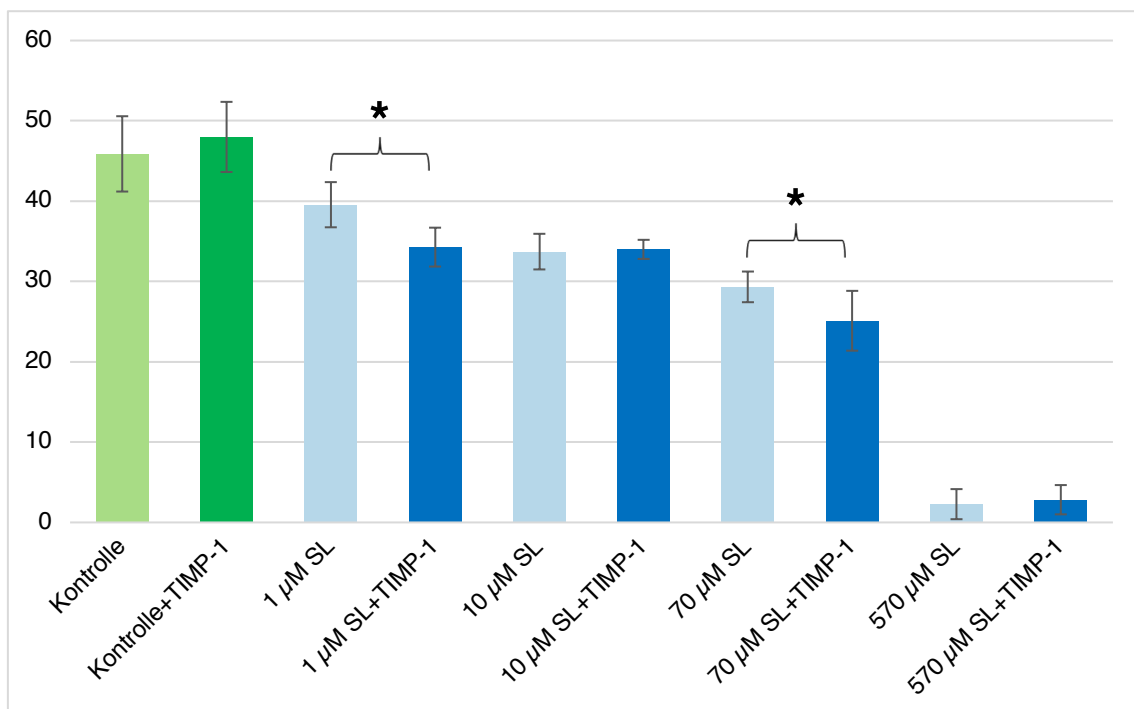


Abb. 25: Migration der hMSCs unter TIMP-1

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=18)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

TIMP-2 (Abb. 26)

Unter Kontrollbedingungen wanderten 46 ± 4 Zellen durch die Membran, bei einer Konzentration von 70 μM SL waren es 30 ± 3 Zellen. Die Migrationsaktivität der hMSCs wurde durch die Zugabe von TIMP-2 signifikant reduziert: unter der Bedingung Kontrolle+TIMP-2 migrierten 42 ± 4 Zellen ($p = 0,010$), bei 70 μM SL+TIMP-2 nur noch 27 ± 3 Zellen ($p = 0,014$).

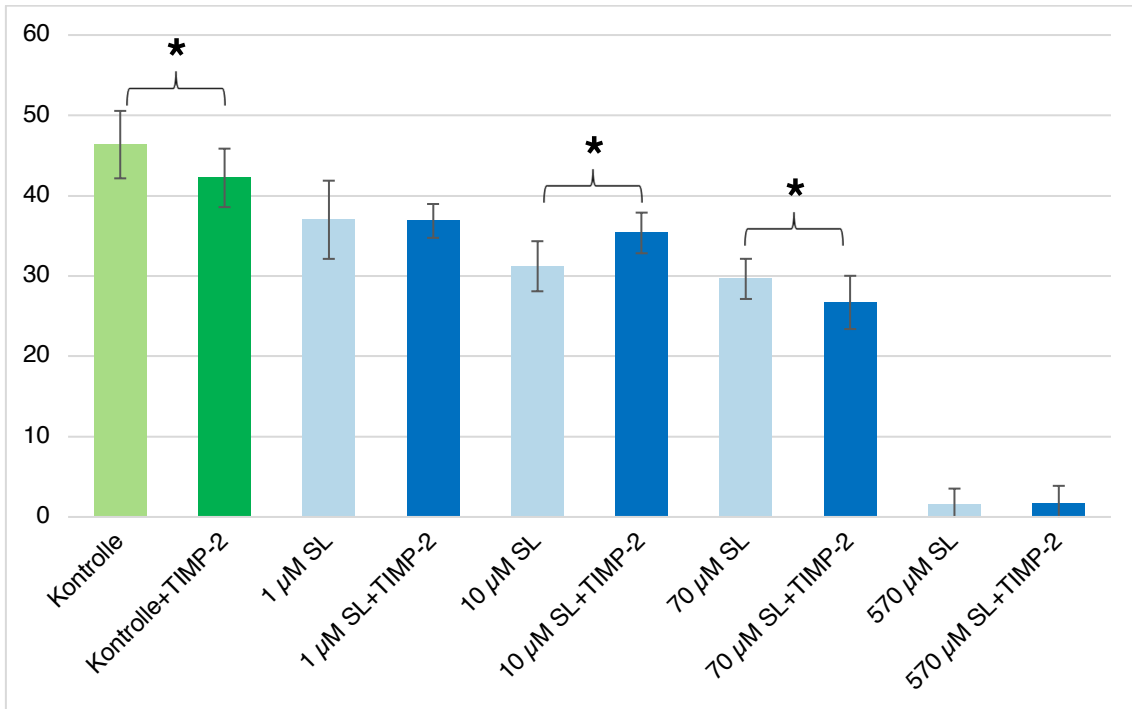


Abb. 26: Migration der hMSCs unter TIMP-2

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=14)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung (p<0,05)

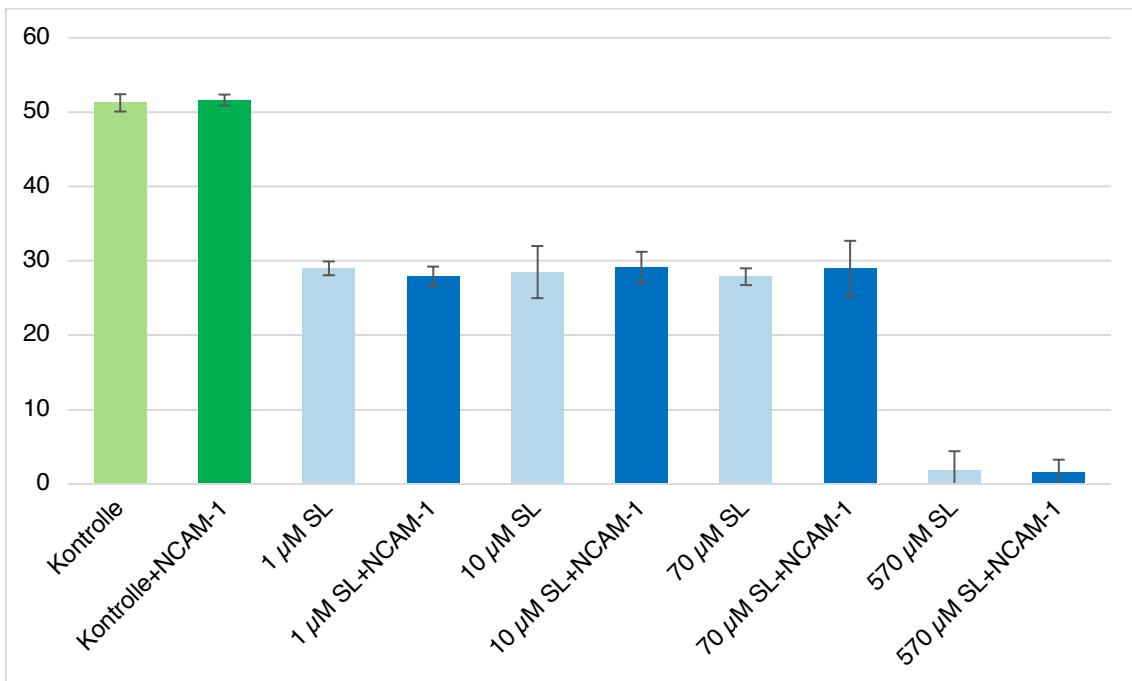


Abb. 27: Migration der hMSCs unter NCAM-1

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=8)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung (p<0,05)

3.2.6 Migration der hMSCs unter VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF beeinflusste die Migrationsrate der hMSCs positiv, wie aus der Abbildung 28 ersichtlich ist. In der Kontrollgruppe wanderten 47 ± 4 Zellen durch die Membran. In der Kontrolle+VEGF fand eine signifikante Steigerung auf 58 ± 4 Zellen ($p < 0,001$) statt. Unter Schwefellost-Bedingungen kam es zu einer Reduktion der Migrationsaktivität: bei $1 \mu\text{M}$ SL migrierten 36 ± 3 Zellen, bei $10 \mu\text{M}$ SL 29 ± 2 Zellen, bei $70 \mu\text{M}$ SL 29 ± 1 Zellen und bei $570 \mu\text{M}$ SL 3 ± 2 Zellen. Die Aktivität konnte jedoch durch die Behandlung mit VEGF signifikant erhöht werden: bei $1 \mu\text{M}$ SL+VEGF passierten 45 ± 2 Zellen ($p < 0,001$) und bei $10 \mu\text{M}$ SL+VEGF 34 ± 1 Zellen ($p < 0,001$) die Membran.

Bei der Kombination $70 \mu\text{M}$ SL+VEGF migrierten 30 ± 2 Zellen und bei $570 \mu\text{M}$ SL+VEGF 2 ± 2 Zellen, was somit keiner signifikanten Veränderung entspricht.

Durch den Wachstumsfaktor VEGF konnte das Niveau der Kontrolle nicht erreicht werden.

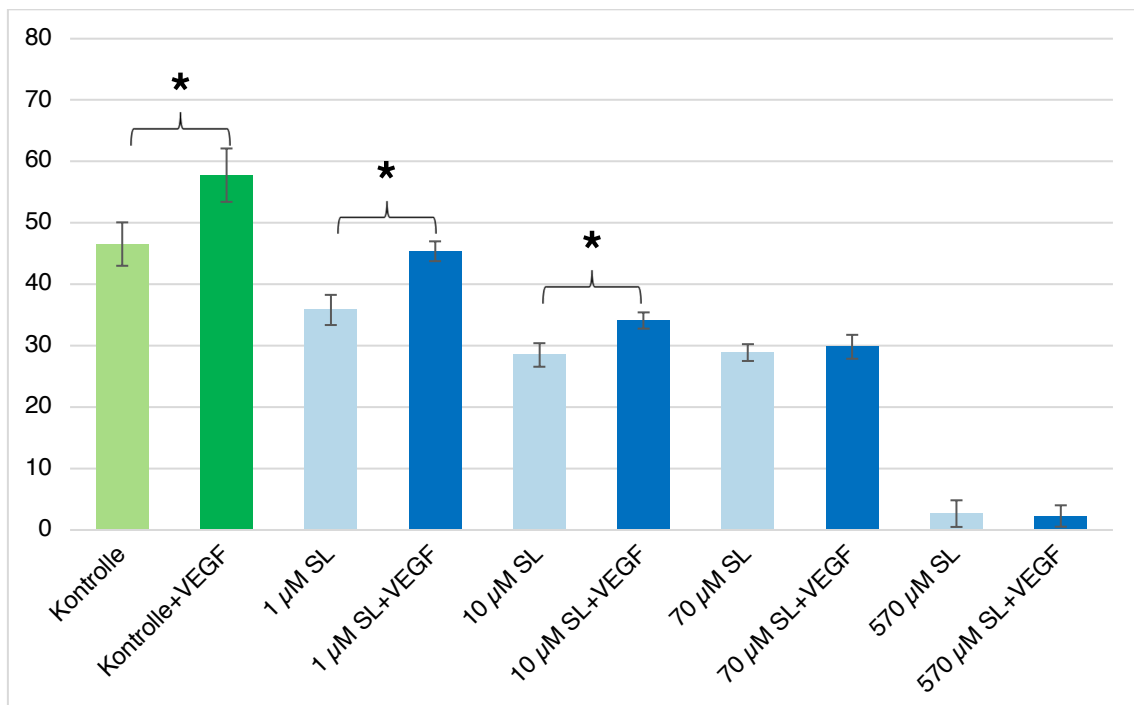


Abb. 28: Migration der hMSCs unter VEGF

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=18)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

3.2.7 Migration der hMSCs unter einem Zytokin-Mix

In einem abschließenden Versuch wurden die hMSCs mit einem Zytokin-Mix, bestehend aus IL-6, IL-8 (e), MCP-1 und VEGF, behandelt. Die Hypothese, dass die Migrationsaktivität mit Hilfe einer Mischung dieser vier Faktoren besonders gesteigert werden kann, konnte teilweise bestätigt werden. Wie Abbildung 29 zeigt, migrierten in der Kontrolle 118 ± 4 Zellen durch die Membran. Unter der Bedingung Kontrolle+Mix passierten 113 ± 30 Zellen die Membran, wodurch keine signifikante Änderung erzielt wurde. Der Einfluss von Schwefellost führte zu einem Rückgang der Migrationsaktivität: bei $1 \mu\text{M}$ SL migrierten 93 ± 1 Zellen, bei $10 \mu\text{M}$ SL 104 ± 7 Zellen, bei $70 \mu\text{M}$ SL 91 ± 8 Zellen und bei $570 \mu\text{M}$ SL 6 ± 1 Zellen. Nach Behandlung mit dem Zytokin-Mix kam es unter nachfolgenden Bedingungen zwar zu einer Erhöhung der Anzahl der migrierten Zellen, welche sich jedoch als nicht signifikant erwies: bei $1 \mu\text{M}$ SL+Mix wanderten 97 ± 7 Zellen ($p=0,515$) durch die Membran und bei $570 \mu\text{M}$ SL+Mix 10 ± 2 Zellen ($p=0,127$). Bei $10 \mu\text{M}$ SL+Mix migrierten nur 85 ± 5 Zellen, was ebenfalls keine Signifikanz zeigte. Allerdings konnte bei $70 \mu\text{M}$ SL+Mix eine signifikante Veränderung beobachtet werden: hier migrierten mit 122 ± 4 Zellen ($p=0,030$) deutlich mehr Zellen durch die Membran, womit sogar das Niveau der Kontrolle überstiegen wurde.

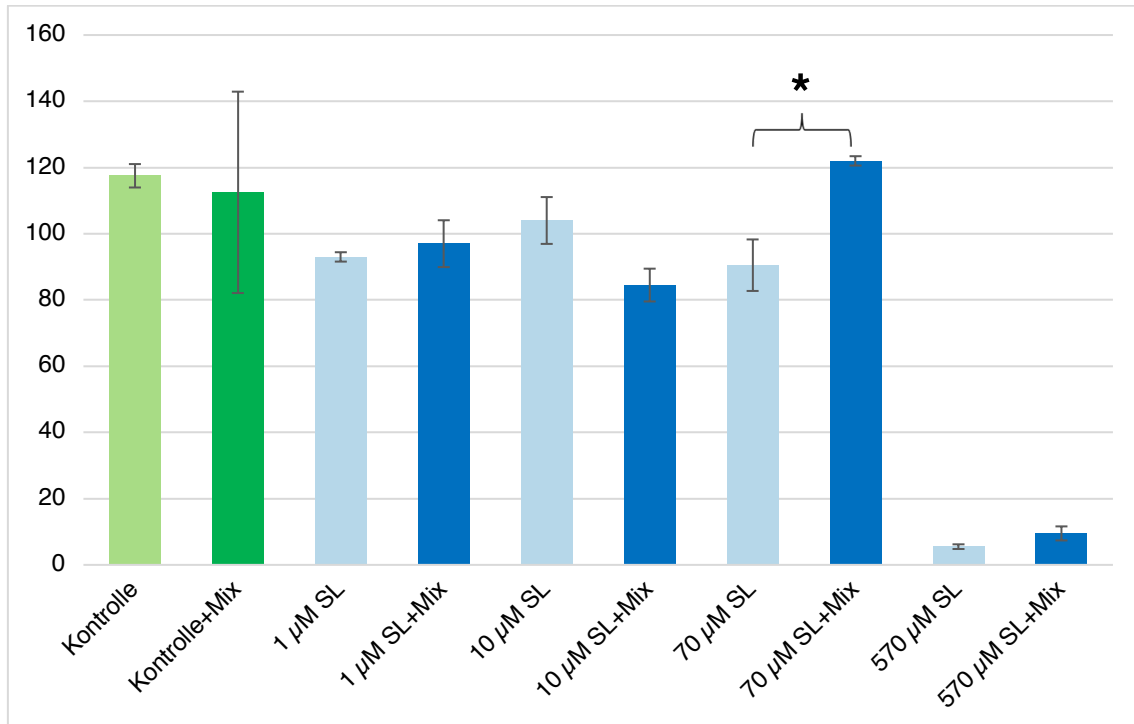


Abb. 29: Migration der hMSCs unter einem Zytokin-Mix

Ordinate: gemittelte Anzahl der migrierten Zellen (n=2)

Abszisse: verwendeter Faktor und unterschiedliche Schwefellost-Konzentrationen

* signifikante Veränderung ($p < 0,05$)

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von *in vitro* Versuchen zu klären, ob die, durch eine Schwefellost-Exposition eingeschränkte Migrationsaktivität der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) durch die Behandlung mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren wieder gesteigert werden kann und die Stammzellen auf diese Weise mobilisiert werden können.

Für die Migrationsversuche wurden hMSCs aus Hüftköpfen von Patienten des HELIOS Amper-Klinikums Dachau isoliert, welche im Rahmen einer Hüft-TEP (Totale Endoprothese) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Stammzellen wurden 1 μM , 10 μM , 70 μM und 570 μM Schwefellost ausgesetzt, wodurch es zu einem Abfall der Migrationsrate kam. Anschließend fand eine Behandlung der hMSCs mit den Wachstumsfaktoren bFGF, VEGF und den Zytokinen GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL-8 (m), MCP-1, MIF, NCAM-1, TIMP-1, TIMP-2 statt.

Unter Kontrollbedingungen migrierten die hMSCs ohne den Zusatz von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und ohne Einfluss von Schwefellost.

Die Auswahl der Zytokine und Wachstumsfaktoren fand u.a. aufgrund des ausgewerteten Sekretoms der hMSCs unter Einfluss von 70 μM und 570 μM Schwefellost statt. Es wurden Faktoren ausgewählt, welche eine veränderte Sekretion im Vergleich zur Kontrolle zeigten und für welche, darüber hinaus, ein Einfluss auf hMSCs hinsichtlich ihrer Migrationsaktivität, Proliferations- oder Differenzierungsfähigkeit in der Fachliteratur beschrieben wurde.

Die Ergebnisdarstellung in Tabelle 3 zeigt, dass es unter Kontrollbedingungen und Einfluss von bFGF, GCP-2, IL-8 (e), IL-8 (m), MCP-1 und VEGF zu einem Anstieg der Migration kam, während die übrigen Faktoren keine oder eine verminderte Migrationsaktivität der hMSCs auslösten. Dies bestätigt die Tatsache, dass das Migrationsverhalten von hMSCs durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren positiv beeinflusst werden kann.

Einen besonders starken Einfluss auf die Migrationsrate der hMSCs nahmen die Zytokine IL-6, IL-8 (e), IL-8 (m) und MCP-1, da sie unter allen vier

Schwefellost-Bedingungen eine signifikante Steigerung hervorriefen. Doch auch unter bFGF (bei 1; 10, 570 μM SL), GCP-2 (bei 1; 10; 70 μM SL) und VEGF (bei 1; 10 μM SL) konnten positive Ergebnisse erzielt werden.

Die Zytokine IL-8 (e) und IL-8 (m) steigerten die Migration bei 10 μM Schwefellost sogar über das Kontrollniveau hinaus, ebenso wie der Zytokin-Mix (bestehend aus IL-6, IL-8 (e), MCP-1, VEGF) bei 70 μM Schwefellost.

Unter Einfluss von MIF, NCAM-1, TIMP-1 und TIMP-2 konnten, bis auf 70 μM SL+TIMP-2, keine positiven Ergebnisse verzeichnet werden.

	hMSCs				
	Kontrolle	1 μM SL	10 μM SL	70 μM SL	570 μM SL
bFGF	↑	↑	↑	↓	↑
GCP-2	↑	↑	↑	↑	↔
IL-6	↔	↑	↑	↑	↑
IL-8 (e)	↑	↑	↑↑	↑	↑
IL-8 (m)	↑	↑	↑↑	↑	↑
MCP-1	↑	↑	↑	↑	↑
MIF	↓	↔	↔	↓	↔
NCAM-1	↔	↔	↔	↔	↔
TIMP-1	↔	↓	↔	↓	↔
TIMP-2	↓	↔	↑	↓	↔
VEGF	↑	↑	↑	↔	↔
Zytokin-Mix	↔	↔	↔	↑↑	↔

Migration: ↑ gesteigert ↓ gesenkt ↔ unverändert
 ↑↑ gesteigert – über das Kontrollniveau hinaus

Tabelle 3: Kumulative Darstellung der Ergebnisse der Migrationsversuche mit hMSCs

Unter isolierter Verwendung der Faktoren bFGF, GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL 8 (m), MCP-1, MIF, NCAM-1, TIMP-1, TIMP-2, VEGF und dem Zytokin-Mix (bestehend aus IL-6, IL-8 (e), MCP-1, VEGF)

Mobilisierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs)

Die Migration ist einer der Schlüsselprozesse in der Funktion der hMSCs. Von daher verwundert es nicht, dass fast jeder klinische Einsatz humaner mesenchymaler Stammzellen auf deren Fähigkeit zur Migration basiert (Kim und Cho 2013, Sohni und Verfaillie 2013). In der Fachliteratur ist beschrieben, dass das Migrationsverhalten der hMSCs von einer großen Anzahl an Faktoren abhängig ist, unter anderem von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Es ist bisher allerdings nur der Einfluss auf „normale“, sprich Schwefellost-unexponierte hMSCs beschrieben worden, sodass es sich bei dieser Studie um völlig neue Daten handelt, für welche es somit kein direktes Vergleichsmaterial gibt. Jedoch besteht insofern eine Vergleichbarkeit, da die Faktoren, welche unter Kontrollbedingungen einen Anstieg oder eine Reduktion der Migrationsrate erreichten, auch unter Schwefellost-Bedingungen positiv bzw. negativ wirksam waren.

Den stärksten Effekt auf die Migrationsaktivität der hMSCs hatten die Zytokine IL-8 (e) und IL-8 (m), da sie nicht nur unter allen Bedingungen eine signifikante Migrationssteigerung erzielten, sondern sogar unter Einfluss von 10 μ M Schwefellost das Niveau der Kontrolle überstiegen (36 \pm 8 vs. 39 \pm 6 Zellen bei IL-8 (e) und 53 \pm 9 vs. 56 \pm 6 Zellen bei IL-8 (m)). Eine Migrationssteigerung mit Hilfe von IL-8 beobachteten auch Ringe et al. (2007). IL-8 stimuliert die Migrationsaktivität der hMSCs durch die Bindung an den CXCR1/CXCR2-Rezeptor, welcher von hMSCs exprimiert wird (Ringe et al. 2007). Auch andere Forschungsteams wiesen migrationsfördernde Eigenschaften von IL-8 nach (Wang et al. 2002, Bi et al. 2014). Demnach reihen sich die Beobachtungen dieser Studie in den aktuellen Forschungsstand mit ein.

Auch das Zytokin MCP-1 steigerte die Migrationsrate der hMSCs unter allen 5 Bedingungen und stellte sich somit als starkes Stimulanz heraus. Über den CCR2-Rezeptor, welcher ebenfalls von hMSCs exprimiert wird, kommt es durch MCP-1 zur Aktivierung der Migration (Guo et al. 2013). Wang et al. (2002), Boomsma und Geenen (2012) und Guo et al. (2013) führten Versuche mit mesenchymalen Stammzellen von Mäusen bzw. Ratten durch und berichteten ebenfalls über eine Migrationssteigerung durch MCP-1 (Wang et al. 2002,

Boomsma und Geenen 2012, Guo et al. 2013). Auch mit hMSCs blieben die Ergebnisse reproduzierbar (Rice und Scolding 2010). Obwohl Ringe et al. (2007) eine Expression des CCR2-Rezeptors in hMSCs beschrieben, erzielten sie dennoch durch MCP-1 keine Migrationssteigerung (Ringe et al. 2007). Die unterschiedlichen Resultate könnten allerdings auf die inhomogene Art und Weise der hMSCs-Kultivierungsmethoden zurückzuführen sein. So verwendete Ringe et al. z.B. Stammzellmedium mit 10% FKS (vs. 20% FKS in diesem Versuch). Ebenso können unterschiedliche Versuchsaufbauten oder Auswertmethoden ursächlich sein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schmidt et al. (2006b) konnte mit Hilfe des Zytokins IL-6 kein signifikanter Anstieg der Migration in der Kontrollgruppe erreicht werden. Interessanter Weise wurden aber unter allen vier Schwefellost-Bedingungen mit IL-6 signifikant höhere Migrationsraten beobachtet, weshalb IL-6 trotzdem als sehr potentes Stimulanz anzusehen ist. Das Ergebnis in der Kontrollgruppe ist somit nicht eindeutig und unterliegt wahrscheinlich individuellen Schwankungen.

Mit dem Zytokin GCP-2 konnte in dieser Studie ein neuer, migrationsfördernder Faktor beschrieben werden. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter 1 μM , 10 μM und 70 μM Schwefellost wurden signifikante Ergebnisse erzielt. GCP-2 bindet, ebenso wie IL-8, an den CXCR1/CXCR2-Rezeptor (Binger et al. 2009), um auf diese Weise neutrophile Granulozyten anzulocken und zu aktivieren. Dies könnte ebenso ein möglicher Mechanismus für die Migrationssteigerung sein. Genauere Untersuchungen bezüglich des Wirkmechanismus und der Reproduzierbarkeit der hier erzielten Ergebnisse sollten somit in weiteren Arbeiten angestellt werden.

Der Wachstumsfaktor VEGF konnte sowohl in einer Studie von Ball et al. (2007), als auch von Schmidt et al. (2006) als potentes Stimulanz identifiziert werden (Schmidt et al. 2006b, Ball et al. 2007). Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die in dieser Studie gemacht wurden. VEGF führte zu einem signifikanten Anstieg der Migration in der Kontrollgruppe, als auch unter Einfluss der subletalen Dosen 1 μM und 10 μM Schwefellost. Unter 70 μM Schwefellost war eine positive Tendenz erkennbar, welche allerdings keine

Signifikanz erreichte. Die Annahme, dass VEGF über die VEGF-Rezeptoren 1-3 migrationsfördernd wirkt, konnte in verschiedenen Versuchen von Ball et al. (2007) widerlegt werden. Er zeigte, dass hMSCs keine VEGF-Rezeptoren exprimieren und dass, darüber hinaus, VEGF über den PDGF (Platelet Derived Growth Factor)-Rezeptor α und β wirksam wird (Ball et al. 2007). Somit scheint vor allem der VEGF/PDGF-Signalweg der ausschlaggebende Mechanismus für die Migrationsaktivierung zu sein. In Studien von Boomsma und Geenen (2012) und Naaldijk et al. (2015) konnte der migrationsfördernde Effekt von VEGF nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Resultate, könnte die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen von Ratten bzw. Mäusen, als auch ein unterschiedlicher Versuchsaufbau sein. Allerdings bleibt festzustellen, dass von Naaldijk et al. dennoch eine Migrationssteigerung durch VEGF erreicht wurde, welche aufgrund der hohen Standardabweichung allerdings keine Signifikanz erreichte. In Zusammenschau der Fakten, lässt sich VEGF somit eindeutig den migrationsfördernden Faktoren zuordnen.

Der Wachstumsfaktor bFGF erwies sich, ebenso wie bei Schmidt et al. (2006b), als potenter Stimulator der hMSCs-Migration. Lediglich unter Einfluss von 70 μ M Schwefellost ist eine signifikante Erniedrigung der Migrationsrate beobachtet worden, welche, in Anbetracht der Tatsache, dass unter allen anderen Bedingungen positive Ergebnisse verzeichnet wurden, nicht ohne weiteres erklärt werden kann.

In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Möglichkeit besteht, Schwefellost-exponierte hMSCs mit einem Mix aus verschiedenen Faktoren zu mobilisieren. So konnte mittels IL-6, IL-8 (e), MCP-1 und VEGF bei 70 μ M Schwefellost sogar das Kontrollniveau überstiegen werden (122 \pm 1 vs. 118 \pm 4 migrierte Zellen). Wie genau die unterschiedlichen Faktoren dabei zusammenspielen, ist allerdings unklar. Ebenso ungewiss ist, wie sich die Kombination mit anderen Faktoren oder eine Kombination von jeweils 2, 3 oder mehr Faktoren auswirken würde. Hier entsteht somit ein enormer experimenteller Spielraum, den es in weiterführenden Studien zu erforschen gilt.

Von dem Zytokin MIF ist aus Experimenten von Barrilleaux et al. (2009) und Fischer-Valuck et al. (2009) bekannt, dass es einen negativen Einfluss auf die Migration der hMSCs ausübt (Barrilleaux et al. 2009, Fischer-Valuck et al. 2009). Da es in dieser Studie sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter 70 μ M Schwefellost zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsaktivität kam, gehen diese Beobachtungen Hand in Hand. MIF bindet an CD74 (Leng et al. 2003) und an die Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 (Bernhagen et al. 2007), wobei vor allem die Aktivierung von CD74 ausschlaggebend für den migrationsinhibierenden Effekt sein könnte (Barrilleaux et al. 2010).

Ries et al. stellte im Jahr 2007 fest, dass eine Blockade von TIMP-1 zu einer gesteigerten Migrationsaktivität in hMSCs führte, wohingegen eine Blockade von TIMP-2 die Migrationsfähigkeit signifikant herabsetzte (Ries et al. 2007). Der negative Effekt von TIMP-1 auf die hMSCs-Migration konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Zwar kam es unter Kontrollbedingungen zu keiner Veränderung, aber unter Einfluss von 1 μ M und 70 μ M Schwefellost konnten auch hier signifikant niedrigere Migrationsraten verzeichnet werden. Im Kontrast zu den Ergebnissen von Ries et al. stehen allerdings die Beobachtungen, die bei der Behandlung der hMSCs mit TIMP-2 gemacht wurden. Hier kam es in der Kontrollgruppe, als auch unter 70 μ M Schwefellost zu einer signifikant herabgesetzten Migrationsaktivität. Der Anstieg unter 10 μ M Schwefellost ist somit, aufgrund des beschriebenen negativen Einflusses, als Ausnahme zu sehen. Infolgedessen kann TIMP-2 in dieser Studie nicht zu den migrationsfördernden Faktoren unter Schwefellost gezählt werden. Ein Grund für die Abweichungen, könnten spenderabhängige Unterschiede sein. So kann sich ein fortgeschrittenes Alter als negativer Faktor erweisen. Eine Studie von Bustos et al. (2014) an Mäusen zeigte, dass mesenchymale Stammzellen von älteren Spendern eine eingeschränkte Migrationsaktivität im Vergleich zu Stammzellen von jüngeren Spendern aufweisen (Bustos et al. 2014). In einer ähnlichen Arbeit von Naaldijk et al. (2015) mit mesenchymalen Stammzellen von Ratten konnten zwar keine Unterschiede zwischen jungen und alten Spendern ausgemacht werden, allerdings zeigte sich in weiteren Experimenten mit hMSCs ein leichter Abfall der Migrationsrate bei älteren Spendern, welcher

jedoch nicht signifikant war (Naaldijk et al. 2015). Da das Spenderalter in dieser Studie zwischen 52 und 86 Jahren lag, sollte das variierende Alter somit als möglicher Störfaktor in Betracht gezogen werden. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass die Ergebnisse unter der Behandlung mit NCAM-1 keinerlei Signifikanz aufwiesen, obwohl NCAM migrationsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden (Shi et al. 2012).

Die bisher identifizierten Stimulantien der hMSCs-Migration sind in ihrer Anzahl überschaubar, sodass in dieser Arbeit mit dem Zytokin GCP-2 eine neue Möglichkeit zur Migrationsaktivierung von hMSCs aufgezeigt werden konnte.

Die Ergebnisse der Migrationsversuche mit hMSCs und Schwefellost zeigen zudem, dass die Immobilisierung der hMSCs mit Hilfe diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren aufgehoben werden kann und die Stammzellen dadurch wieder mobilisiert werden können.

In unterschiedlichen Versuchen konnten allerdings noch weitere Faktoren ausfindig gemacht werden, die eine Migrationssteigerung herbeiführen.

So hat das Zytokin SDF-1 β (Stromal Cell Derived Factor-1 β) eine migrationsfördernde Wirkung auf hMSCs (Schmidt et al. 2006b). In Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen von Ratten, konnte der positive Effekt von SDF-1 bestätigt werden (Naaldijk et al. 2015). Der Mechanismus der Migrationssteigerung scheint vor allem über die SDF-1/CXCR4-Achse reguliert zu sein (Son et al. 2006, Marquez-Curtis und Janowska-Wieczorek 2013). Durch das Hormon Erythropoetin konnte in einer Tierstudie eine gesteigerte Expression dieser Achse erreicht werden, was eine verbesserte migratorische Aktivität nach sich zog (Li et al. 2015).

In Untersuchungen von Fu et al. (2009), Xiao et al. (2012) und Naaldijk et al. (2015) an mesenchymalen Stammzellen von Ratten, stellte sich TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) als weiterer migrationsfördernder Faktor heraus. Eine mögliche Erklärung für die Steigerung der Migrationsaktivität könnte die durch TNF- α erhöhte Expression von ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) und VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) sein (Fu et al. 2009, Xiao et al. 2012). Ob die stimulierende Wirkung von TNF- α auch auf hMSCs übertragbar

ist, muss in weiteren Arbeiten geprüft werden. Da $\text{TNF-}\alpha$ bei Entzündungsprozessen maßgeblich beteiligt ist, könnte es sich somit als vielversprechender Faktor erweisen.

In einer Studie von Thibault et al. (2007) konnte außerdem gezeigt werden, dass die Faktoren Fibronectin, Vitronectin und Kollagen 1 ebenfalls die Migration von hMSCs induzieren (Thibault et al. 2007). Aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Wundheilungsprozess, überraschen diese Beobachtungen nicht. Durch diese Erkenntnis, könnte ein Einsatz der extrazellulären Proteine als Stimulanzien der Migration bei Schwefelost-exponierten hMSCs in weiterführenden Studien sinnvoll sein und sollte unbedingt erwogen werden. Ferner sollte ebenso ein Augenmerk auf den potentiellen Einsatz von SDF-1, Erythropoetin und $\text{TNF-}\alpha$ gerichtet werden.

Es sollte in Zukunft auch vor allem auf eine einheitliche Verwendung von Kultivierungsmethoden und Versuchsaufbauten Wert gelegt werden, da sich hier in der Vergangenheit immer wieder Diskrepanzen in den Ergebnissen unterschiedlicher Labore ergeben haben.

Klinischer Ausblick

Die große Problematik einer Schwefellostvergiftung ist durch die daraus resultierende mangelhafte Gewebeerneuerung begründet, für welche man bis heute keine kausale Therapiemöglichkeit besitzt. Der Grund für die eingeschränkte Wundheilung nach einer Schwefellost-Exposition ist bisher nicht genau verstanden. In einer Studie von Schmidt et al. (2013) konnte erstmalig der Beweis erbracht werden, dass schon marginale Dosen (ab 1 μM) von Schwefellost zu einer deutlichen Reduktion der Migrationsaktivität von hMSCs führen und Schwefellost somit einen negativen Einfluss auf den Stammzellpool ausübt. Fakt ist, dass hMSCs eine bedeutende Rolle im regulären Wundheilungsprozess spielen (Singer und Clark 1999, Fathke et al. 2004). Eine Schwefellostvergiftung beeinträchtigt somit die Migration der hMSCs in das verletzte Gewebe und behindert den normalen Vorgang der Wundheilung. Folglich konnte, durch die Erkenntnisse von Schmidt et al. (2013), der Grundstein für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie einer Schwefellost-Schädigung gelegt werden.

Diese Arbeit baut auf die Ergebnisse von Schmidt et al. (2013) auf und zeigt, dass die Möglichkeit besteht, die eingeschränkte Migrationsaktivität der hMSCs mit Hilfe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu steigern.

Die Entwicklung eines Therapiekonzeptes unter Verwendung humaner mesenchymaler Stammzellen könnte somit erfolgsversprechend sein. Unter anderem auch deswegen, weil sich in besagter Studie von Schmidt et al. (2013) herausstellte, dass die Differenzierungsfähigkeit der hMSCs trotz Schwefellost-Exposition uneingeschränkt erhalten blieb und die Stammzellen zudem eine hohe Resistenz (im Vergleich zu HaCaT-Zellen) gegenüber hohen Dosen Schwefellosts zeigten. Einen ersten Therapieversuch mit hMSCs startete Dr. Mostafa Ghanei im Februar 2015 mit einer Phase 1-Studie: Patienten mit einem Schwefellost-induzierten Lungenschaden werden autologe hMSCs intravenös injiziert, mit der Hoffnung, die Umbauprozesse der Atemwege behandeln zu können und somit eine Besserung der Beschwerden zu erzielen (ClinicalTrials.gov, 22.04.2016).

Mit den Ergebnissen dieser Studie wurde ein weiterer, wichtiger Beitrag im Hinblick auf Therapiekonzepte geleistet. Demnach könnte sich der selektive Einsatz eines oder mehrerer Zytokine oder Wachstumsfaktoren zur Aktivierung der hMSCs-Migration hin zu dem verletzten Gewebe, als neuer therapeutischer Ansatz bei Schwefelostvergiftungen erweisen. Dies bedarf es in weiterführenden Studien zu prüfen.

5 Zusammenfassung

HINTERGRUND: Schwefellost ist ein blasenbildendes Alkylanz, welches insbesondere während des 1. Weltkrieges und 1. Golfkrieges als chemischer Kampfstoff eingesetzt wurde. Doch auch in der heutigen Zeit stellt es, durch seine einfache Herstellung und den potentiellen Einsatz bei terroristischen Anschlägen, eine reelle Bedrohung für die Bevölkerung dar. Eine Schwefellostvergiftung führt zu schwerwiegenden Verletzungen, zieht langwierige Gewebeschädigungen nach sich und kann unter Umständen auch tödlich enden. Eine kausale Behandlungsmöglichkeit existiert bis dato nicht. Die resultierenden Langzeitschäden lassen sich auf eine eingeschränkte Gewebeerneuerung zurückführen, an welcher humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) maßgeblich beteiligt sind. Schwefellost übt folglich einen negativen Einfluss auf diese Stammzellen aus, der sich vor allem in einer herabgesetzten Migrationsaktivität widerspiegelt.

ZIELSETZUNG: Ziel dieser Studie war es daher, zu untersuchen, ob die Migrationsaktivität der hMSCs durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteigert werden kann und die Stammzellen somit wieder mobilisiert werden können.

METHODIK: Hierfür wurden die hMSCs aus Hüftköpfen von Patienten des HELIOS Amper-Klinikums Dachau gewonnen und für die Migrationsversuche in Stammzellmedium in An- bzw. Abwesenheit der Zytokine und Wachstumsfaktoren in einer modifizierten Boyden-Kammer inkubiert. Im Vorfeld fand eine Exposition der hMSCs mit unterschiedlichen Konzentrationen an Schwefellost statt (1; 10; 70; 570 μM SL). Nach 8 Stunden erfolgte die Auszählung der migrierten Zellen.

ERGEBNISSE: In den Versuchen konnte bestätigt werden, dass eine Schwefellost-Exposition die Migrationsaktivität der hMSCs schon in niedrigsten Konzentrationsbereichen (ab 1 μM SL) maßgeblich beeinträchtigt. Die Mobilität der hMSCs konnte durch die Faktoren bFGF, GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL-8 (m), MCP-1 und VEGF signifikant gesteigert werden. Eine besonders starke, positive Wirkung übten die Zytokine IL-6, IL-8 (e), IL-8 (m) und MCP-1 aus, da hier unter allen Schwefellost-Bedingungen signifikante Ergebnisse erzielt

wurden. Unter Einfluss von IL-8 (e), IL-8 (m) und dem Zytokin-Mix (bestehend aus IL-6, IL-8 (e), MCP-1, VEGF) wurde sogar das Niveau der Kontrollgruppe überstiegen. Für die Faktoren TIMP-1, TIMP-2, NCAM-1 und MIF lagen keine signifikanten Erhöhungen der Stammzellmobilität vor. Unter Einfluss von TIMP-1, TIMP-2 und MIF kam es sogar zu einer signifikant niedrigeren Migrationsaktivität.

AUSBLICK: Es konnte gezeigt werden, dass die eingeschränkte Migrationsaktivität der hMSCs nach einer Schwefellost-Exposition durch die Faktoren bFGF, GCP-2, IL-6, IL-8 (e), IL-8 (m), MCP-1 und VEGF und einem Zytokin-Mix gesteigert werden kann und es so möglich ist, die Stammzellen zu mobilisieren. Demnach eröffnen sich neue Möglichkeiten eines Therapiekonzeptes in Bezug auf Schwefellostvergiftungen, wofür es im Weiteren genauere Untersuchungen bedarf.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1: Strukturformel von Schwefellost.....	3
Abb. 2: Vials mit Schwefellost.....	3
Abb. 3: Blasenbildung nach Schwefellost-Kontakt	7
Abb. 4: Schwefellost-induzierte Erythembildung	8
Abb. 5: Schwefellost-Spätschäden	8
Abb. 6: Heilungsprozess nach Schwefellost-Unfall über einen 2-Jahres- Zeitraum.....	9
Abb. 7: Typische Konjunktivitis nach Schwefellost-Kontakt (Akutphase)	10
Abb. 8: Hornhauttrübung und Erblindung nach Schwefellost-Kontakt (Spätphase)	11
Abb. 9: Aufreinigung und Selektion von mesenchymalen Stammzellen.....	31
Abb. 10: Mikroskopische Kontrolle der hMSCs	33
Abb. 11: Chondrogene Differenzierung	34
Abb. 12: Osteogene Differenzierung	35
Abb. 13: Adipogene Differenzierung.....	36
Abb. 14: Migration in einer modifizierten Boyden-Kammer	37
Abb. 15: Übersichtsaufnahme eines Migrationsfilters.....	39
Abb. 16: Detailaufnahme einer migrierten Zelle	39
Abb. 17: Sekretom der hMSCs unter Einfluss von 70 μM ($=\text{IC}_{50}$) SL und 570 μM ($=\text{IC}_{90}$) SL.....	41
Abb. 18: Migration der hMSCs unter bFGF	44
Abb. 19: Migration der hMSCs unter GCP-2	45
Abb. 20: Migration der hMSCs unter IL-6	46
Abb. 21: Migration der hMSCs unter IL-8 (e).....	48
Abb. 22: Migration der hMSCs unter IL-8 (m).....	49
Abb. 23: Migration der hMSCs unter MCP-1	50
Abb. 24: Migration der hMSCs unter MIF	51
Abb. 25: Migration der hMSCs unter TIMP-1.....	52

Abb. 26: Migration der hMSCs unter TIMP-2.....	53
Abb. 27: Migration der hMSCs unter NCAM-1.....	53
Abb. 28: Migration der hMSCs unter VEGF.....	54
Abb. 29: Migration der hMSCs unter einem Zytokin-Mix	56

Tabellen:

Tabelle 1: Produktinformation aller verwendeten Zytokine und Wachstumsfaktoren	28
Tabelle 2: Übersicht des ausgewerteten Sekretoms der hMSCs	42
Tabelle 3: Kumulative Darstellung der Ergebnisse der Migrationsversuche mit hMSCs	58

7 Literaturverzeichnis

Literatur:

Antonitsis, P., Ioannidou-Papagiannaki, E., Kaidoglou, A., Charokopos, N., Kalogeridis, A., Kouzi-Koliakou, K., Kyriakopoulou, I., Klonizakis, I. and Papakonstantinou, C. (2008). "Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro." Thorac Cardiovasc Surg **56**(2): 77-82.

Balali-Mood, M. and Abdollahi, M. (2015). Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds, Springer International Publishing.

Balali-Mood, M. and Hefazi, M. (2005). "The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning." Fundam Clin Pharmacol **19**(3): 297-315.

Ball, S. G., Shuttleworth, C. A. and Kielty, C. M. (2007). "Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors." The Journal of Cell Biology **177**(3): 489-500.

Ball, S. G., Shuttleworth, C. A. and Kielty, C. M. (2007). "Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors." J Cell Biol **177**(3): 489-500.

Barrilleaux, B. L., Fischer-Valuck, B. W., Gilliam, J. K., Phinney, D. G. and O'Connor, K. C. (2010). "Activation of CD74 inhibits migration of human mesenchymal stem cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim **46**(6): 566-572.

Barrilleaux, B. L., Phinney, D. G., Fischer-Valuck, B. W., Russell, K. C., Wang, G., Prockop, D. J. and O'Connor, K. C. (2009). "Small-Molecule Antagonist of Macrophage Migration Inhibitory Factor Enhances Migratory Response of Mesenchymal Stem Cells to Bronchial Epithelial Cells." Tissue Engineering Part A **15**(9): 2335-2346.

Berendsen, A. D. and Olsen, B. R. (2014). "How Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF) Regulates Differentiation of Mesenchymal Stem Cells." J Histochem Cytochem **62**(2): 103-108.

Berendsen, A. D. and Olsen, B. R. (2015). "Regulation of adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells by vascular endothelial growth factor A." J Intern Med **277**(6): 674-680.

Beresford, J. N. (1989). "Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow." Clin Orthop Relat Res(240): 270-280.

Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zernecke, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S. R., Bucala, R., Hickey, M. J. and Weber, C. (2007). "MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment." Nat Med **13**(5): 587-596.

Bi, L. K., Zhou, N., Liu, C., Lu, F. D., Lin, T. X., Xuan, X. J., Jiang, C., Han, J. L., Huang, H., Zhang, C. X., Dong, W., Liu, H., Huang, J. and Xu, K. W. (2014). "Kidney cancer cells secrete IL-8 to activate Akt and promote migration of mesenchymal stem cells." Urol Oncol **32**(5): 607-612.

Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. and Robey, P. G. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem Cells **19**(3): 180-192.

Binger, T., Stich, S., Andreas, K., Kaps, C., Sezer, O., Notter, M., Sittinger, M. and Ringe, J. (2009). "Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25." Exp Cell Res **315**(8): 1468-1479.

Bobis, S., Jarocha, D. and Majka, M. (2006). "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." Folia Histochem Cytobiol **44**(4): 215-230.

Boomsma, R. A. and Geenen, D. L. (2012). "Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis." PLoS One **7**(4).

Bruder, S. P., Kurth, A. A., Shea, M., Hayes, W. C., Jaiswal, N. and Kadiyala, S. (1998). "Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells." J Orthop Res **16**(2): 155-162.

Bustos, M. L., Huleihel, L., Kapetanaki, M. G., Lino-Cardenas, C. L., Mroz, L., Ellis, B. M., McVerry, B. J., Richards, T. J., Kaminski, N., Cerdenes, N., Mora, A. L. and Rojas, M. (2014). "Aging mesenchymal stem cells fail to protect because of impaired migration and antiinflammatory response." Am J Respir Crit Care Med **189**(7): 787-798.

Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-650.

Carvalho, P. H., Daibert, A. P., Monteiro, B. S., Okano, B. S., Carvalho, J. L., Cunha, D. N., Favarato, L. S., Pereira, V. G., Augusto, L. E. and Del Carlo, R. J. (2013). "Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes." Arq Bras Cardiol **100**(1): 82-89.

Dauderer, M. (1991). Kampfstoffvergiftungen. Diagnostik und Therapie. Kompendium der Klinischen Toxikologie Teil III, Ecomed-Storck GmbH. **Band 6**.

DelaRosa, O. and Lombardo, E. (2010). "Modulation of Adult Mesenchymal Stem Cells Activity by Toll-Like Receptors: Implications on Therapeutic Potential." Mediators of Inflammation **2010**: 9.

Dimarino, A. M., Caplan, A. I. and Bonfield, T. L. (2013). "Mesenchymal stem cells in tissue repair." Front Immunol **4**: 201.

Duan, X., Yang, L., Zhou, Y., Xin, Y. and Li, Q. (2006). "[Application of enhanced green fluorescent protein labeling technology to monitoring marrow

mesenchymal stem cells migration after bone fracture]." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **20**(2): 102-106.

Easton, D. F., Peto, J. and Doll, R. (1988). "Cancers of the respiratory tract in mustard gas workers." Br J Ind Med **45**(10): 652-659.

Emadi, S. N., Babamahmoodi, F., Poursaleh, Z., Sayad-Noori, S. S., Soroush, M. R., Maleki, A. R., Izadi, M., Khodaei-Ardakan, M. R. and Emadi, S. E. (2012). "Sezary syndrome, Kaposi sarcoma and generalized dermatophytosis 15 years after sulfur mustard gas exposure." J Dermatol Case Rep **6**(3): 86-89.

Emadi, S. N., Moeineddin, F. and Soroush, M. R. (2009). "Urinary and cutaneous complications of sulphur mustard poisoning preceding pulmonary and ocular involvement: an unusual sequence of symptoms." Clin Exp Dermatol **34**(5): e7-10.

Emadi, S. N., Mortazavi, M. and Mortazavi, H. (2008). "Late cutaneous manifestations 14 to 20 years after wartime exposure to sulfur mustard gas: a long-term investigation." Arch Dermatol **144**(8): 1059-1061.

Fathke, C., Wilson, L., Hutter, J., Kapoor, V., Smith, A., Hocking, A. and Isik, F. (2004). "Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair." Stem Cells **22**(5): 812-822.

Fischer-Valuck, B. W., Barrilleaux, B. L., Phinney, D. G., Russell, K. C., Prockop, D. J. and O'Connor, K. C. (2009). "Migratory response of mesenchymal stem cells to macrophage migration inhibitory factor and its antagonist as a function of colony-forming efficiency." Biotechnology Letters **32**(1): 19-27.

Franke, S. (1977). Lehrbuch der Militärchemie. Entwicklung der chemischen Kriegführung. Chemie der Kampfstoffe, Militärverl. der DDR. **Band 1**.

Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luria, E. A. and Ruadkow, I. A. (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." Exp Hematol **2**(2): 83-92.

Fu, X., Han, B., Cai, S., Lei, Y., Sun, T. and Sheng, Z. (2009). "Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing." Wound Repair Regen **17**(2): 185-191.

Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T. and Tsuji, K. (2004). "Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential." Stem Cells **22**(5): 649-658.

Garbe, C., Hauschild, A., Kaufmann, R., Landthaler, M. and Szeimies, R. M. (2009). Tumoren der Haut: Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie, Thieme.

Gil, L., Kazmierczak, M., Kroll-Balcerzak, R. and Komarnicki, M. (2014). "Bendamustine-based therapy as first-line treatment for non-Hodgkin lymphoma." Med Oncol **31**(5).

Gilman, A. and Philips, F. S. (1946). "The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides." Science **103**(2675): 409-436.

Goodman, L. S., Wintrobe, M. M. and et al. (1946). "Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders." J Am Med Assoc **132**: 126-132.

Graham, J. S., Chilcott, R. P., Rice, P., Milner, S. M., Hurst, C. G. and Maliner, B. I. (2005). "Wound healing of cutaneous sulfur mustard injuries: strategies for the development of improved therapies." J Burns Wounds **4**: e1.

Grove, J. E., Bruscia, E. and Krause, D. S. (2004). "Plasticity of bone marrow-derived stem cells." Stem Cells **22**(4): 487-500.

Guo, J., Zhang, H., Xiao, J., Wu, J., Ye, Y., Li, Z., Zou, Y. and Li, X. (2013). "Monocyte chemotactic protein-1 promotes the myocardial homing of mesenchymal stem cells in dilated cardiomyopathy." Int J Mol Sci **14**(4): 8164-8178.

Hanson, S. E., Bentz, M. L. and Hematti, P. (2010). "Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds." Plast Reconstr Surg **125**(2): 510-516.

Hauser, K., Deutzmann, R., Netzker, R. and Rassow, J. (2012). Duale Reihe Biochemie, Thieme.

Hefazi, M., Maleki, M., Mahmoudi, M., Tabatabaee, A. and Balali-Mood, M. (2006). "Delayed complications of sulfur mustard poisoning in the skin and the immune system of Iranian veterans 16-20 years after exposure." Int J Dermatol **45**(9): 1025-1031.

Huang, G., Gronthos, S. and Shi, S. (2009). "Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine." J Dent Res **88**(9): 792-806.

IARC (1975). "IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some aziridines, N-, S- & O-mustards and selenium." IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man **9**: 1-268.

IARC (1987). "Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl **7**: 1-440.

Illig, L., Paul, E., Eyer, P., Weger, N. and Born, W. (1979). "[Treatment of psoriasis vulgaris with external sulfur mustard gas with particular reference to its potential carcinogenic risk. III. Clinical and experimental studies on the extent of percutaneous and inhalational uptake of sulfur mustard gas]." Z Hautkr **54**(21): 941-951.

Kagiyada, H., Yashiki, T., Ohshima, A., Tadokoro, M., Nagaya, N. and Ohgushi, H. (2008). "Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells." J Tissue Eng Regen Med **2**(4): 184-189.

Kaina, B. (2003). "DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling." Biochem Pharmacol **66**(8): 1547-1554.

Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G. and Gorodetsky, R. (2006). "Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads." Bone Marrow Transplant **37**(10): 967-976.

Kehe, K., Balszuweit, F., Steinritz, D. and Thiermann, H. (2009b). "Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering." Toxicology **263**(1): 12-19.

Kehe, K. and Szinicz, L. (2005). "Medical aspects of sulphur mustard poisoning." Toxicology **214**(3): 198-209.

Kehe, K., Thiermann, H., Balszuweit, F., Eyer, F., Steinritz, D. and Zilker, T. (2009a). "Acute effects of sulfur mustard injury--Munich experiences." Toxicology **263**(1): 3-8.

Kim, N. and Cho, S. G. (2013). "Clinical applications of mesenchymal stem cells." Korean J Intern Med **28**(4): 387-402.

Kim, S.-W., Lee, D.-W., Yu, L.-H., Zhang, H.-Z., Kim, C. E., Kim, J.-M., Park, T.-H., Cha, K.-S., Seo, S.-Y., Roh, M.-S., Lee, K.-C., Jung, J.-S. and Kim, M. H. (2012). "Mesenchymal stem cells overexpressing GCP-2 improve heart function through enhanced angiogenic properties in a myocardial infarction model." Cardiovascular Research **95**(4): 495-506.

Lawley, P. D., Lethbridge, J. H., Edwards, P. A. and Shooter, K. V. (1969). "Inactivation of bacteriophage T7 by mono- and difunctional sulphur mustards in relation to cross-linking and depurination of bacteriophage DNA." J Mol Biol **39**(1): 181-198.

Le Blanc, K. and Pittenger, M. (2005). "Mesenchymal stem cells: progress toward promise." Cytotherapy **7**(1): 36-45.

Ledesma-Martinez, E., Mendoza-Nunez, V. M. and Santiago-Osorio, E. (2016). "Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review." Stem Cells Int **2016**: 4709572.

Lee, D. E., Ayoub, N. and Agrawal, D. K. (2016). "Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy." Stem Cell Res Ther **7**(1): 37.

Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., Chen, J. R., Chen, Y. P. and Lee, O. K. (2004). "In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells." Hepatology **40**(6): 1275-1284.

Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A. and Bucala, R. (2003). "MIF signal transduction initiated by binding to CD74." J Exp Med **197**(11): 1467-1476.

Li, J., Guo, W., Xiong, M., Han, H., Chen, J., Mao, D., Tang, B., Yu, H. and Zeng, Y. (2015). "Effect of SDF-1/CXCR4 axis on the migration of transplanted bone mesenchymal stem cells mobilized by erythropoietin toward lesion sites following spinal cord injury." Int J Mol Med **36**(5): 1205-1214.

Li, S., Huang, K. J., Wu, J. C., Hu, M. S., Sanyal, M., Hu, M., Longaker, M. T. and Lorenz, H. P. (2015). "Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: candidate cells responsible for healing critical-sized calvarial bone defects." Stem Cells Transl Med **4**(4): 359-368.

Lodhi, I. J., Sweeney, J. F., Clift, R. E. and Hinshaw, D. B. (2001). "Nuclear dependence of sulfur mustard-mediated cell death." Toxicol Appl Pharmacol **170**(1): 69-77.

Lozito, T. P., Jackson, W. M., Nesti, L. J. and Tuan, R. S. (2014). "Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs." Matrix Biology **34**: 132-143.

Lozito, T. P. and Tuan, R. S. (2011). "Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs." J Cell Physiol **226**(2): 385-396.

Lu, L. L., Liu, Y. J., Yang, S. G., Zhao, Q. J., Wang, X., Gong, W., Han, Z. B., Xu, Z. S., Lu, Y. X., Liu, D., Chen, Z. Z. and Han, Z. C. (2006). "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials." Haematologica **91**(8): 1017-1026.

Marfia, G., Navone, S. E., Di Vito, C., Ughi, N., Tabano, S., Miozzo, M., Tremolada, C., Bolla, G., Crotti, C., Ingegnoli, F., Rampini, P., Riboni, L., Gualtierotti, R. and Campanella, R. (2015). "Mesenchymal stem cells: potential

for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds." Organogenesis **11**(4): 183-206.

Marquez-Curtis, L. A. and Janowska-Wieczorek, A. (2013). "Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis." BioMed Research International **2013**: 15.

Mastrogiacomo, M., Derubeis, A. R. and Cancedda, R. (2005). "Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells." J Cell Physiol **204**(2): 594-603.

Matsushita, T., Kibayashi, T., Katayama, T., Yamashita, Y., Suzuki, S., Kawamata, J., Honmou, O., Minami, M. and Shimohama, S. (2011). "Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps." Neurosci Lett **502**(1): 41-45.

Meyer, V. (1886). "Ueber Thiodiglykolverbindungen." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **19**(2): 3259-3266.

Mezey, E. and Chandross, K. J. (2000). "Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system." Eur J Pharmacol **405**(1-3): 297-302.

Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. and McKercher, S. R. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-1782.

Minguell, J. J., Erices, A. and Conget, P. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-520.

Naaldijk, Y., Johnson, A. A., Ishak, S., Meisel, H. J., Hohaus, C. and Stolzing, A. (2015). "Migrational changes of mesenchymal stem cells in response to cytokines, growth factors, hypoxia, and aging." Exp Cell Res **338**(1): 97-104.

Namazi, S., Niknahad, H. and Razmkhah, H. (2009). "Long-term complications of sulphur mustard poisoning in intoxicated Iranian veterans." J Med Toxicol **5**(4): 191-195.

Nishimoto, Y., Yamakido, M., Ishioka, S., Shigenobu, T. and Yukutake, M. (1987). "Epidemiological studies of lung cancer in Japanese mustard gas workers." Princess Takamatsu Symp **18**: 95-101.

Papirmeister, B., Gross, C. L., Petrali, J. P. and Meier, H. L. (1984). "Pathology Produced by Sulfur Mustard in Human Skin Grafts on Athymic Nude Mice. II. Ultrastructural Changes." Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology **3**(4): 393-408.

Pechura, C. M. and Rall, D. P. (1993). Veterans at Risk: The Health Effects of Mustard Gas and Lewisite. Washington (DC), National Academies Press (US).

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-74.

Rattigan, Y., Hsu, J. M., Mishra, P. J., Glod, J. and Banerjee, D. (2010). "Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu." Exp Cell Res **316**(20): 3417-3424.

Rice, C. M. and Scolding, N. J. (2010). "Adult human mesenchymal cells proliferate and migrate in response to chemokines expressed in demyelination." Cell Adh Migr **4**(2): 235-240.

Richter, W. (1941). Kampfstoffwirkung und Heilung. Leipzig, Verlag von Johann Ambrosius Barth.

Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M. and Neth, P. (2007). "MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines." Blood **109**(9): 4055-4063.

Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G. R., Kaps, C. and Sittinger, M. (2007). "Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2." J Cell Biochem **101**(1): 135-146.

Rodriguez-Menocal, L., Salgado, M., Ford, D. and Van Badiavas, E. (2012). "Stimulation of Skin and Wound Fibroblast Migration by Mesenchymal Stem Cells Derived from Normal Donors and Chronic Wound Patients." Stem Cells Translational Medicine **1**(3): 221-229.

Rowell, M., Kehe, K., Balszuweit, F. and Thiermann, H. (2009). "The chronic effects of sulfur mustard exposure." Toxicology **263**(1): 9-11.

Saladi, R. N., Smith, E. and Persaud, A. N. (2006). "Mustard: a potential agent of chemical warfare and terrorism." Clinical and Experimental Dermatology **31**(1): 1-5.

Sanjarmoosavi, N., Sanjarmoosavi, N., Shahsavan, M. and Hassanzadeh-Nazarabadi, M. (2012). "Teratogenic Effects of Sulfur Mustard on Mice Fetuses." Iranian Journal of Basic Medical Sciences **15**(3): 853-859.

Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D. and Shimizu, H. (2008). "Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type." The Journal of Immunology **180**(4): 2581-2587.

Schmidt, A., Ladage, D., Schinkothe, T., Klausmann, U., Ulrichs, C., Klinz, F. J., Brixius, K., Arnhold, S., Desai, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R. H., Staib, P.,

Addicks, K. and Bloch, W. (2006b). "Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(7): 1750-1758.

Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinkothe, T., Klinz, F. J., Schwinger, R. H., Mehlhorn, U. and Bloch, W. (2006a). "Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier." Eur J Cell Biol **85**(11): 1179-1188.

Schmidt, A., Scherer, M., Thiermann, H. and Steinritz, D. (2013). "Mesenchymal stem cells are highly resistant to sulfur mustard." Chem Biol Interact **206**(3): 505-511.

Schmidt, A., Steinritz, D., Rudolf, K. D., Thiermann, H. and Striepling, E. (2018). "Accidental sulfur mustard exposure: A case report." Toxicol Lett **293**: 62-66.

Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S. and Verfaillie, C. M. (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." J Clin Invest **109**(10): 1291-1302.

Shahin, S., Cullinane, C. and Gray, P. J. (2001). "Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by sulphur mustard in keratinocytes." Chem Biol Interact **138**(3): 231-245.

Shi, Y., Xia, Y. Y., Wang, L., Liu, R., Khoo, K. S. and Feng, Z. W. (2012). "Neural cell adhesion molecule modulates mesenchymal stromal cell migration via activation of MAPK/ERK signaling." Exp Cell Res **318**(17): 2257-2267.

Si, Y. L., Zhao, Y. L., Hao, H. J., Fu, X. B. and Han, W. D. (2011). "MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns." Ageing Res Rev **10**(1): 93-103.

Sibov, T., Severino, P., Marti, L. C., Pavon, L. F., Oliveira, D. M., Tobo, P. R., Campos, A. H., Paes, A. T., Amaro, E., L. F. G. and Moreira-Filho, C. A. (2012).

"Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation." Cytotechnology **64**(5): 511-521.

Sidell, F. R., Takafuji, E. T. and Franz, D. R. (1997). Long-term health effects of nerve agents and mustard. Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center: 229-246.

Sidell, F. R., Takafuji, E. T. and Franz, D. R. (1997). Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare, Office of The Surgeon General Department of the Army, United States of America.

Singer, A. J. and Clark, R. A. (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**(10): 738-746.

Sohni, A. and Verfaillie, C. M. (2013). "Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking." Stem Cells International **2013**: 8.

Solberg, Y., Alcalay, M. and Belkin, M. (1997). "Ocular injury by mustard gas." Surv Ophthalmol **41**(6): 461-466.

Soma, T., Kishimoto, J. and Fisher, D. (2013). Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Dermis. Skin Stem Cells: Methods and Protocols. K. Turksen. Totowa, NJ, Humana Press: 265-274.

Son, B. R., Marquez-Curtis, L. A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A. R., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z. and Janowska-Wieczorek, A. (2006). "Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases." Stem Cells **24**(5): 1254-1264.

Song, X., Li, Y., Chen, X., Yin, G., Huang, Q., Chen, Y., Xu, G. and Wang, L. (2014). "bFGF promotes adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells derived from embryonic stem cells." Genetics and Molecular Biology **37**: 127-134.

Spaeth, E. L. and Marini, F. C. (2011). "Dissecting mesenchymal stem cell movement: migration assays for tracing and deducing cell migration." Methods Mol Biol **750**: 241-259.

Steinkopf, W., Herold, J. and Stöhr, J. (1920). "Über das Thiodiglykolchlorid und einige Abkömmlinge desselben." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series) **53**(6): 1007-1012.

Szinicz, L. (2005). "History of chemical and biological warfare agents." Toxicology **214**(3): 167-181.

Taguchi, Y., Yamamoto, M., Yamate, T., Lin, S. C., Mocharla, H., DeTogni, P., Nakayama, N., Boyce, B. F., Abe, E. and Manolagas, S. C. (1998). "Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage." Proc Assoc Am Physicians **110**(6): 559-574.

Thibault, M. M., Hoemann, C. D. and Buschmann, M. D. (2007). "Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay." Stem Cells Dev **16**(3): 489-502.

Tondreau, T., Meuleman, N., Stamatopoulos, B., De Bruyn, C., Delforge, A., Dejeneffe, M., Martiat, P., Bron, D. and Lagneaux, L. (2009). "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**(5): 559-569.

Trivanovic, D., Kocic, J., Mojsilovic, S., Krstic, A., Ilic, V., Djordjevic, I. O., Santibanez, J. F., Jovicic, G., Terzic, M. and Bugarski, D. (2013). "Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly." Srp Arh Celok Lek **141**(3-4): 178-186.

Tuli, R., Seghatoleslami, M. R., Tuli, S., Wang, M. L., Hozack, W. J., Manner, P. A., Danielson, K. G. and Tuan, R. S. (2003). "A simple, high-yield method for

obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone." Mol Biotechnol **23**(1): 37-49.

Vohr, H. W. (2012). Toxikologie: Band 2 - Toxikologie der Stoffe, John Wiley & Sons.

Wada, S., Miyanishi, M., Nishimoto, Y., Kambe, S. and Miller, R. W. (1968). "Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man." Lancet **1**(7553): 1161-1163.

Wang, H., Wang, X., Qu, J., Yue, Q., Hu, Y. and Zhang, H. (2015). "VEGF Enhances the Migration of MSCs in Neural Differentiation by Regulating Focal Adhesion Turnover." J Cell Physiol **230**(11): 2728-2742.

Wang, J., Wang, Y., Wang, S., Cai, J., Shi, J., Sui, X., Cao, Y., Huang, W., Chen, X., Cai, Z., Li, H., Bardeesi, A. S., Zhang, B., Liu, M., Song, W., Wang, M. and Xiang, A. P. (2015). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer." Oncotarget **6**(40): 42825-42837.

Wang, L., Li, Y., Chen, X., Chen, J., Gautam, S. C., Xu, Y. and Chopp, M. (2002). "MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture." Hematology **7**(2): 113-117.

Wang, X., Hisha, H., Mizokami, T., Cui, W., Cui, Y., Shi, A., Song, C., Okazaki, S., Li, Q., Feng, W., Kato, J. and Ikehara, S. (2010). "Mouse mesenchymal stem cells can support human hematopoiesis both in vitro and in vivo: the crucial role of neural cell adhesion molecule." Haematologica **95**(6): 884-891.

Wang, X., Hisha, H., Taketani, S., Inaba, M., Li, Q., Cui, W., Song, C., Fan, T., Cui, Y., Guo, K., Yang, G., Fan, H., Lian, Z., Gershwin, M. E. and Ikehara, S. (2005). "Neural cell adhesion molecule contributes to hemopoiesis-supporting capacity of stromal cell lines." Stem Cells **23**(9): 1389-1399.

Willems, J. L. (1989). "Clinical management of mustard gas casualties." Annales Medicinæ Militaris (Belgicae) **3(suppl)**: 1-61.

Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and Black, I. B. (2000). "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." J Neurosci Res **61**(4): 364-370.

Wu, X. B. and Tao, R. (2012). "Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **11**(4): 360-371.

Wulf, G. G., Chapuy, B. and Trumper, L. (2006). "[Mesenchymal stem cells from bone marrow. Phenotype, aspects of biology, and clinical perspectives]." Med Klin (Munich) **101**(5): 408-413.

Wuyts, A., Struyf, S., Gijsbers, K., Schutyser, E., Put, W., Conings, R., Lenaerts, J. P., Geboes, K., Opdenakker, G., Menten, P., Proost, P. and Van Damme, J. (2003). "The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1beta and is down-regulated by interferon-gamma: comparison with interleukin-8/CXCL8." Lab Invest **83**(1): 23-34.

Xia, W., Xie, C., Jiang, M. and Hou, M. (2015). "Improved survival of mesenchymal stem cells by macrophage migration inhibitory factor." Molecular and Cellular Biochemistry **404**(1): 11-24.

Xiao, Q., Wang, S. K., Tian, H., Xin, L., Zou, Z. G., Hu, Y. L., Chang, C. M., Wang, X. Y., Yin, Q. S., Zhang, X. H. and Wang, L. Y. (2012). "TNF-alpha increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues." Cell Biochem Biophys **62**(3): 409-414.

Xu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, G. and Shi, Y. (2007). "The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells." Biochem Biophys Res Commun **361**(3): 745-750.

Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H. and Chen, Y. (2004). "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro." Exp Biol Med (Maywood) **229**(7): 623-631.

Yang, H. J., Xia, Y. Y., Wang, L., Liu, R., Goh, K. J., Ju, P. J. and Feng, Z. W. (2011). "A novel role for neural cell adhesion molecule in modulating insulin signaling and adipocyte differentiation of mouse mesenchymal stem cells." J Cell Sci **124**(Pt 15): 2552-2560.

Zou, J. P., Huang, S., Peng, Y., Liu, H. W., Cheng, B., Fu, X. B. and Xiang, X. F. (2012). "Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds." Int J Low Extrem Wounds **11**(4): 244-253.

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. and Hedrick, M. H. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-228.

Internet:

Auswärtiges Amt (08.01.2016): "Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen (CWÜ)." Zuletzt zugegriffen am: 08.03.2016, von http://www.auswaertiges-amt.de/DE/Aussenpolitik/Friedenspolitik/Abruestung/BioChemie/Verbot-C-Waffen_node.html.

ClinicalTrials.gov (22.04.2016): "Mesenchymal Stem Cells Therapy for Treatment of Airway Remodeling in Mustard Patients." Zuletzt zugegriffen am: 16.06.2018, von <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02749448>.

Die Zeit (06.11.2015): "Einsatz von Senfgas in Syrien bestätigt." Zuletzt zugegriffen am: 16.06.2018, von <https://www.zeit.de/politik/2015-11/syrien-senfgas-opcw>.

Los Angeles Times (12.03.2016): "ISIS chemical attacks kill a child, injure 600, Iraqi officials say." Zuletzt zugegriffen am: 29.03.2016, von <http://www.latimes.com/world/la-fg-isis-chemical-attacks-20160312-story.html>.

Süddeutsche Zeitung (06.11.2015): "Senfgas nachgewiesen." Zuletzt zugegriffen am: 16.06.2018, von <http://www.sueddeutsche.de/politik/syrien-senfgas-nachgewiesen-1.2725580>.

8 Publikationen

Schreier, C., Rothmiller, S., Scherer, M. A., Rummel, C., Steinritz, D., Thiermann, H. and Schmidt, A. (2018). "Mobilization of human mesenchymal stem cells through different cytokines and growth factors after their immobilization by sulfur mustard." Toxicol Lett **293**: 105-111.

9 Danksagung

Viele Menschen haben beim Durchführen und Vollenden meiner Doktorarbeit einen kleineren oder größeren Beitrag geleistet. Deshalb möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Erstellung meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

Zu allererst gebührt mein Dank Herrn Professor Dr. med. H. Thiermann, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr München. Ich danke ihm vielmals für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut unter der Betreuung von Frau Professor Dr. rer. nat. A. Schmidt durchführen zu können.

Mein besonderer Dank für die großartige und wertvolle Unterstützung gilt meiner Betreuerin Frau Professor Dr. rer. nat. A. Schmidt. Ich danke Ihr für die herzliche Betreuung und die Beurteilung meiner Doktorarbeit. Außerdem möchte ich Ihr für Ihre enorme Geduld und Motivation danken. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, auch wenn es mal schwere Phasen gegeben hat. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Vielen Dank für alles!

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Frau C. Muschik für die unermüdliche und professionelle Einführung in sämtliche Arbeiten des Zellkulturlabors und für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle auch Herrn S. Müller, Herrn R. Prasad, Frau M. Zarrabi und Frau E. Ünal-Cukur für ihre tolle und hilfreiche Unterstützung danken.

Mein Dank gilt zudem allen, die zum Gelingen dieser Arbeit im Zellkulturlabor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr München beigetragen haben. Bedanken möchte ich mich vor allem für die stets angenehme, gutgelaunte und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Abschließend gebührt mein größter Dank meiner einzigartigen Familie - meinen Eltern und Großeltern, meiner Schwester und ganz besonders meinem Partner. Ihr alle habt mich in jeder Phase meiner Doktorarbeit von ganzem Herzen unterstützt. Ohne euch wäre mir diese Arbeit um einiges schwerer gefallen. Danke für eure Liebe und Motivation. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und ich stets auf euch zählen kann.

