

&

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
(Prof. Dr. Peter Biberthaler)

Vergleich der osteogenen Differenzierung primärer Osteoblasten sowie junger und alter Ad-MSCs in 2D und 3D Kulturen

Tim Schuseil

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Martijn van Griensven
2. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 13.02.2020 bei der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München eingereicht und am
30.12.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Altern – Demographische Entwicklung	1
1.2 Alterstraumatologie und typische Frakturen	1
1.2.1 Vertebrale Frakturen.....	3
1.2.2 Nicht vertebrale Frakturen	3
1.3 Physiologie des Alterns – Veränderungen im Organismus.....	5
1.4 Osteoporose	8
1.5 Klinisches Management der Alterstraumatologie.....	10
1.5.1 Unfallchirurgische Therapieoptionen der proximalen Femurfraktur	13
1.5.1.1 Subtrochantäre Femurfraktur	14
1.5.1.2 Pertrochantäre Femurfraktur.....	16
1.5.1.3 Schenkelhalsfraktur	18
1.5.2 Unfallchirurgische Probleme und Herausforderungen in der Alterstraumatologie.....	19
1.6 Regenerative Medizin als neue Therapieoption.....	20
1.6.1 Stammzellen.....	20
1.6.1.1 Embryonale Stammzellen	21
1.6.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen	22
1.6.1.3 Adulte Stammzellen	22
1.6.1.3.1 Mesenchymale Stammzellen und ihre Verwendung.....	23
1.6.1.3.2 Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen	24
1.6.1.3.3 Mesenchymale Stammzellen und das Immunsystem.....	25
1.6.1.3.4 Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen.....	26
1.6.1.3.5 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	27
1.6.1.3.6 Differenzierbarkeit alter Spender.....	28
1.6.1.3.7 Ansätze zur Verlangsamung des Zellalters	29
2 Zielsetzung der Arbeit	31

3	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
3.1.1	Geräte	33
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	34
3.1.3	Nährmedien und Zusätze	35
3.1.4	Chemikalien	36
3.1.5	Software	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Isolierung, Kultivierung und Passagieren von Osteoblasten	39
3.2.2	Isolation, Kultivierung und Passagieren von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe	41
3.2.3	Auszählen	43
3.2.4	Ausplattieren und Differenzieren	43
3.2.5	Alkalische Phosphatase Aktivität	47
3.2.6	Alkalische Phosphatase Färbung	48
3.2.7	Alizarin Rot Färbung	50
3.2.8	Sulforhodamin B-Färbung	51
3.2.9	Immunfluoreszenzfärbung	52
3.2.10	RNA Isolation	53
3.2.11	RNA-Vermessung und Nachweis der RNA-Integrität	54
3.2.12	Synthese der komplementären DNA	55
3.2.13	Genexpressionsanalyse mittels Real Time-PCR	56
3.2.14	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer PCR	58
3.2.15	Statistik	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Aktivität der Alkalische Phosphatase	62
4.1.1	Primäre Osteoblasten	62
4.1.2	Ad-MSCs	63
4.2	Alkalische Phosphatase-Färbung	65
4.2.1	Primäre Osteoblasten	65
4.2.2	Ad-MSCs	65
4.3	Mineralisierung	68
4.3.1	Primäre Osteoblasten	68
4.3.2	Ad-MSCs	69
4.4	Immunfluoreszenzfärbung	71
4.4.1	2D Differenzierung	72
4.4.1.1	Primäre Osteoblasten - Osteocalcin	72
4.4.1.2	Primäre Osteoblasten – Kollagen I	72
4.4.1.3	Ad-MSCs - Osteocalcin	73

4.4.1.4	Ad-MSCs - Kollagen I	74
4.4.1.5	Overlays.....	74
4.4.2	3D Differenzierung.....	77
4.4.2.1	Primäre Osteoblasten – Kollagen I und Osteoprotegerin.....	77
4.4.2.2	Ad-MSCs.....	78
4.5	Osteogene Marker auf molekularer Ebene	79
4.5.1	Alkalische Phosphatase	79
4.5.1.1	Primäre Osteoblasten	79
4.5.1.2	Ad-MSCs.....	80
4.5.2	Osteoprotegerin.....	83
4.5.2.1	Primäre Osteoblasten	83
4.5.2.2	Ad-MSCs.....	84
4.5.3	Osteocalcin.....	86
4.5.3.1	Primäre Osteoblasten	86
4.5.3.2	Ad-MSCs.....	87
4.5.4	Kollagen I.....	88
4.5.4.1	Primäre Osteoblasten	88
4.5.4.2	Ad-MSCS	90
4.5.5	Osteopontin	92
4.5.5.1	Primäre Osteoblasten	92
4.5.5.2	Ad-MSCs.....	93
4.6	Morphologische Veränderung der differenzierten Zellen	96
5	Diskussion.....	98
5.1	Differenzierungsanalyse	99
5.1.1	Alkalische Phosphatase	100
5.1.1.1	Aktivität und Genexpression der Alkalischen Phosphatase	100
5.1.1.2	Alkalische Phosphatase - Färbung der Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung	103
5.1.2	Mineralisierung	103
5.1.2.1	Alizarin Rot.....	103
5.1.2.2	Osteogene Marker auf molekularer Ebene	105
5.1.2.2.1	Osteopontin	105
5.1.2.2.2	Kollagen I	106
5.1.2.2.3	Osteoprotegerin und Osteocalcin	107
5.1.3	Immunfluoreszenzfärbung der primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung.....	108

5.1.4 Zellmorphologie	109
5.2 Scaffold.....	109
5.3 Spenderzahl	110
6 Zusammenfassung	111
7 Ausblick	113
8 Literatur	116
9 Anhang.....	131
9.1 Selbstständigkeitserklärung.....	131
9.2 Veröffentlichungen.....	132
9.3 Bildgenehmigungen.....	133
9.3.1 Abbildungen des Scaffolds	133
9.3.2 Röntgenbilder	134
9.4 Danksagung	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Frakturen und Morbidität im Lebensverlauf	2
Abbildung 1-2: Beckenübersichtaufnahme bei proximaler Femurfraktur	4
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Abnahme der trabekulären Knochenstruktur	6
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des gesunden Knochens und seiner Zellen	9
Abbildung 1-5: Proximales Femur von ventral (links) und dorsal (rechts).....	13
Abbildung 1-6: Einteilung des proximalen Femurs	14
Abbildung 1-7: Röntgenbild einer sub- bzw. intertrochantären Femurfraktur.....	15
Abbildung 1-8: Röntgenbild einer pertrochantären Femurfraktur.....	16
Abbildung 1-9: Radiologische und schematische Darstellung einer Schenkelhalsfraktur	18
Abbildung 1-10: Mögliche Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen.....	24
Abbildung 1-11: Angriffspunkte von Ascorbat, Dexamethason und β - Glycerolphosphat bei der osteogenen Differenzierung.....	28
Abbildung 3-1: Isolation, Kultivierung und Passagieren von primären Osteoblasten	39
Abbildung 3-2: Isolation, Kultivierung und Passagieren von Ad-MSCs.....	41
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungen der osteogenen Differenzierung	44
Abbildung 3-4: Mikroskopische Darstellung der Feinstruktur der verwendeten Scaffolds.....	45
Abbildung 3-5: Scaffolds in Plastikrahmen	46
Abbildung 3-6: Nachweisschema der 2D und 3D Differenzierung für einen Zeitpunkt.....	47
Abbildung 3-7: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs	49
Abbildung 3-8: Darstellung einer abgelaufenen Gelelektrophorese.....	55
Abbildung 3-9: Schematischer Ablauf der RealTime-PCR.....	58
Abbildung 3-10: Schematische Funktionsweise der qPCR.....	59
Abbildung 3-11: Schematischer Ablauf der qPCR	61
Abbildung 4-1: Alkalische Phosphatase-Aktivität der primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung	63
Abbildung 4-2: Alkalische Phosphatase-Aktivität bei jungen und alten Ad- MSCs in 2D und 3D Differenzierung.....	64

Abbildung 4-3: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs an Tag 11 in 2D Differenzierung.....	66
Abbildung 4-4: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs an Tag 11 in 3D Differenzierung.....	66
Abbildung 4-5: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs in 2D Differenzierung	67
Abbildung 4-6: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs in 3D Differenzierung nach vorheriger SRB-Färbung	67
Abbildung 4-7: Mineralisierung der primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung	69
Abbildung 4-8: Mineralisierung der jungen und alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung	71
Abbildung 4-9: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Osteocalcin.....	72
Abbildung 4-10: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I in 2D Differenzierung.....	73
Abbildung 4-11: Fluoreszenzfärbung Ad-MSCs für Osteocalcin in 2D Differenzierung	73
Abbildung 4-12: Fluoreszenzfärbung Ad-MSCs für Kollagen I in 2D Differenzierung	74
Abbildung 4-13: Fluoreszenzfärbung Ad-MSCs für Osteocalcin (grün) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung.....	75
Abbildung 4-14: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I (grün), Osteoprotegerin (rot) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung	76
Abbildung 4-15: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I (grün) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung	76
Abbildung 4-16: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I (grün), Osteoprotegerin (rot) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung	77
Abbildung 4-17: Mikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten in 3D Differenzierung	78
Abbildung 4-18: Genexpression der Alkalischen Phosphatase bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung	80
Abbildung 4-19: Genexpression der Alkalischen Phosphatase bei jungen und alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung.....	81
Abbildung 4-20: Genexpression der Alkalischen Phosphatase bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D Differenzierung.....	82
Abbildung 4-21: Osteoprotegerinexpression bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung.....	83
Abbildung 4-22: Osteoprotegerinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung.....	84

Abbildung 4-23: Osteoprotegerinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D Differenzierung.....	85
Abbildung 4-24: Osteocalcinexpression bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung.....	87
Abbildung 4-25: Osteocalcinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung.....	88
Abbildung 4-26: Expression Kollagen I bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung.....	89
Abbildung 4-27: Expression Kollagen I bei jungen Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung	90
Abbildung 4-28: Expression Kollagen I bei alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung	91
Abbildung 4-29: Osteopontinexpression bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung.....	93
Abbildung 4-30: Osteopontinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D Differenzierung	94
Abbildung 4-31: Osteopontinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung	95
Abbildung 4-32: Osteopontinexpression junger und alter Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung.....	96
Abbildung 4-33: Mikroskopische Aufnahme der spindelförmigen Morphologie der primären Osteoblasten	97
Abbildung 4-34: Typische morphologische Veränderungen der primären Osteoblasten bei osteogener Differenzierung	97
Abbildung 5-1: Schematischer Überblick der erbrachten Nachweismethoden im Rahmen der osteogenen Differenzierung	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte.....	33
Tabelle 3-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 3-3: Verwendete Nährmedien und Zusätze	35
Tabelle 3-4: Verwendete Chemikalien	36
Tabelle 3-5: Verwendete Software	38
Tabelle 3-6: Verwendete Erstantikörper	52
Tabelle 3-7: Verwendete Zweitantikörper	52
Tabelle 3-8: Zusammensetzung des Master Mix	56
Tabelle 3-9: Verwendete RT-PCR-Primer	57
Tabelle 3-10: Verwendete qPCR-Primer	60

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
Ad-MSCs	adipose derived mesenchymal stem cells [dt: mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe]
AP	Alkalische Phosphatase
AR	Alizarin Rot
BEST	Bone Evaluation Study
BMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells [dt: mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark]
BSA	Bovine Serum Albumin
BSP	bone sialoprotein
BWK	Brustwirbelkörper
BWS	Brustwirbelsäule
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cbfa1	core binding factor alpha 1
CD-Marker	cluster of differentiation-Marker [dt: „Unterscheidungs“-Marker]
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid [dt: komplementäre Desoxyribonekleinsäure]
COL I	Kollagen I
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHS	Dynamische Hüftschraube
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	desoxyribonucleic acid [dt: Desoxyribonukleinsäure]
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline
DXA	dual-energy x-ray absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCs	embryonic stem cells [dt: embryonale Stammzellen]
FCS	fetal calf serum [dt: Fetales Kälberserum]

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen [dt: humanes Leukozyten Antigen]
HSCs	hematopoietic stem cells [dt: Hämatopoetische Stammzellen]
hTERT	humane Telomerase
IgG	Immunglobulin G
iPSCs	induced pluripotent stem cells [dt: induzierte pluripotente Stammzellen]
Klf4	Kruppel-like factor 4
LWK	Lendenwirbelkörper
LWS	Lendenwirbelsäule
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex [dt: Haupthistokompatibilitätskomplex]
mRNA	messenger ribonucleic acid [dt: Boten-Ribonukleinsäure]
MSCs	mesenchymal stem cells [dt: mesenchymale Stammzellen]
OC	Osteocalcin
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
OD	Optische Dichte
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PCR	polymerase chain reaction [dt: Polymerase-Ketten-Reaktion]
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFN	Proximaler Femurnagel
qPCR	quantitative polymerase chain reaction [dt: quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion]
RANKL	receptor activator of nuclear factor κB ligand
RNA	riboneucleic acid [dt: Ribonukleinsäure]
RT	Raumtemperatur

Sox2	(sex determining region Y)-box 2 [dt: geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2]
SRB	Sulforhodamin B-Färbung
TBE Puffer	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TNSALP/ TNAP	tissue nonspecific alkaline phosphatase [dt: gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase]

1 Einleitung

1.1 Altern – Demographische Entwicklung

Die Menschheit wird älter: Lag im Jahr 2012 die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt für Männer noch bei 78,6 Jahren und für Frauen bei 83,3 Jahren, so wird diese im Jahr 2060 auf 85 Jahre für Männer und für Frauen sogar auf 89,2 Jahre ansteigen. Diese zunehmende Lebenserwartung im Verbund mit der abnehmenden Geburtenziffer führt dazu, dass die Altersgruppe der über 65-jährigen immer größer wird. Aus den derzeitigen 21% werden im Jahr 2060 der Hochrechnung zufolge 34% werden. Dies ist eine typische Tendenz in den hochentwickelten Ländern, wie z.B. in Deutschland [Statistisches Bundesamt 2014].

Medizinisch gesehen bringt diese Gruppe besondere Herausforderungen mit sich, gerade auch im Bereich der Unfallchirurgie sei hier das große Feld der Alterstraumatologie genannt, auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit eingegangen werden soll.

1.2 Alterstraumatologie und typische Frakturen

Spricht man über die Alterstraumatologie, sind aus der Sicht des Unfallchirurgen oder Orthopäden einerseits besonders die typischen Altersfrakturen zu nennen, andererseits der große Bereich der Osteoporose. In vielen Fällen bedingt dieses Krankheitsbild die Frakturinzidenz entscheidend [Dalle Carbonare et al., 2009; Riggs et al., 1986]. Jedoch ist es nicht alleinige Voraussetzung, da das physiologische Altern gesundheitliche Veränderungen mit sich bringt, die allein schon für eine erhöhte Frakturinzidenz verantwortlich sind. So entsteht die typische Altersfraktur als Folge aus der Kombination eines zumeist inadäquaten Traumas und der (Multi-)Morbidity, die der Patient mitbringt [Suhm et al., 2009]. Abhängig von der

Lebensdekade kommt es zu einer Häufung bestimmter Frakturen und einer daraus resultierenden, unterschiedlich schweren Morbidität. Das Altern per se in Kombination mit der bereits vorhandenen, verletzungsunabhängigen Morbidität fördert einerseits die Sturzhäufigkeit und damit die Frakturursache und verschlechtert andererseits die Kompensationsmechanismen des betroffenen Menschen, sowohl direkt während des Ereignisses als auch im weiteren Verlauf. Dies zusammen bedingt den nächsten gemeinsamen Punkt dieses Frakturtypus; eine additive, durch die Frakturart bedingte Morbidität und daraus resultierende Mortalität. Eine schematische Darstellung der Altersfrakturen im Lebensverlauf zeigt Abbildung 1-1.

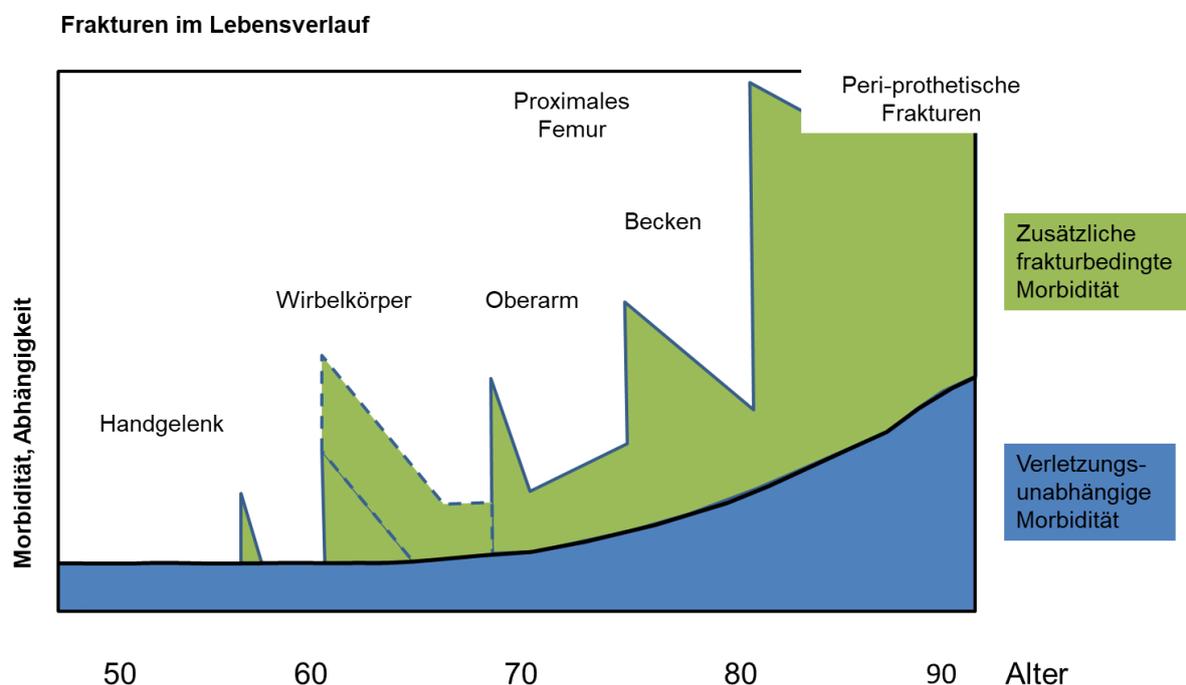


Abbildung 1-1: Frakturen und Morbidität im Lebensverlauf - modifiziert nach [Kanis et al., 1999; Riem 2013]. Dabei zeigt sich eine altersabhängige Verteilung der Frakturen. Diese bringen mit zunehmendem Alter eine erhöhte frakturbedingte Morbidität mit sich, welche sich zu der ebenfalls mit dem Alter ansteigenden verletzungsunabhängigen Morbidität summieren.

Wie hoch der Stellenwert der Alterstraumatologie inzwischen ist, können Studiendaten gut belegen. So liegt die Inzidenz eine Altersfraktur zu erleiden für Frauen zwischen 40-50% und für Männer bei 13-22% [Johnell et al., 2005]. Zudem wird davon ausgegangen, dass sich die Zahl der proximalen Femurfrakturen, als typische Vertreter der Altersfraktur, in der EU in den nächsten 50 Jahren

verdreifachen wird [Cooper 2003]. Typische Altersfrakturen bzw. der Osteoporose assoziierte Frakturen lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Einerseits vertebrale und andererseits nicht vertebrale Frakturen.

1.2.1 Vertebrale Frakturen

Die höchste Inzidenz der osteoporotischen Frakturen besitzt die Wirbelkörperfraktur mit einer Inzidenz von 440.000 Neudiagnosen in der EU pro Jahr [Lunt et al., 2002]. Die betroffenen Wirbelkörper liegen dabei zumeist auf Höhe der Brustwirbelkörper (BWK) 7 und 8 (ca. 60%) beziehungsweise im thorakolumbalen Übergang, BWK 11 bis Lendenwirbelkörper (LWK) 1 (70%) [Nevitt et al., 1999]. Die im Röntgenbild sichtbaren Keilwirbel führen klinisch zu einer Kyphosierung und einer Ventralisierung des Körperschwerpunktes. Zudem kommt es zu einer daraus resultierenden Größenabnahme und dem sogenannten Tannenbaumphänomen, das durch die im Verhältnis zu lange Rückenmuskulatur entsteht.

1.2.2 Nicht vertebrale Frakturen

Die häufigste, nicht vertebrale Altersfraktur stellt die distale Radiusfraktur loco typico dar, gefolgt von der proximalen Femurfraktur. An dritter Stelle befindet sich die proximale Humerusfraktur [Czerwinski et al., 2007].

Proximale Femurfraktur

Beispielhaft für die Gruppe der nicht vertebralen Altersfrakturen soll hier auf die proximale Femurfraktur eingegangen werden (Abbildung 1-2). Die Inzidenz dieser Verletzung lag in Deutschland im Jahr 2014 bei knapp über 108.000 Fällen, wobei mehr als 85% der betroffenen Patienten 70 Jahre und älter waren. 70% der betroffenen Patienten waren dabei weiblich [AQUA-Institut 2014]. Bezieht man diese Frakturhäufigkeit auf die demographische Entwicklung Deutschlands, so wird die Inzidenz der proximalen Femurfraktur in den nächsten Jahren weiter steigen

[Reimertz et al., 2012]. Dabei ereignen sich ca. 40% davon in der pertrochantären und 10% in der subtrochantären Region. Noch häufiger als die pertrochantäre Femurfraktur (46%) ist die Schenkelhalsfraktur (54%), wobei sich die Häufigkeitsverteilung über die Jahre relativ konstant gehalten hat [AQUA-Institut 2014; Hoffmann et al., 1994; Reimertz et al., 2012]. Der Unterschied zur proximalen Femurfraktur bei jungen Patienten ist der Entstehungsmechanismus. Ist bei jungen, gesunden Patienten meist ein hochenergetische Krafteinwirkung im Rahmen z.B. eines Auto- oder Motorradunfalls Voraussetzung [Reimertz et al., 2012], sind es bei alten Patienten in der Regel niederenergetische Traumata, meist Stolperstürze, bei denen das betroffene Bein verdreht wird [Schütz et al., 1993].



Abbildung 1-2: Beckenübersichtsaufnahme bei proximaler Femurfraktur (Schenkelhalsfraktur) rechts.
Zur Verfügung gestellt von BG Unfallklinik Murnau

1.3 Physiologie des Alterns – Veränderungen im Organismus

Spricht man über das Altern und die Alterstraumatologie, muss man sich auch mit dem physiologischen Alterungsprozess auseinandersetzen, der im Bereich vieler Organsysteme abläuft und dort zu typischen Veränderungen führt. Dies soll an ausgewählten Organsystemen im Weiteren dargestellt werden.

Im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems kommt es bei alten Menschen zu einer verlangsamten Blutdruckregulation. Diese, in Kombination mit dem gerade im Alter häufig vorhandenen Volumendefizit aufgrund von Dehydratation, führt zu orthostatischen Problemen, was einen Risikofaktor im Hinblick auf die Sturzhäufigkeit in dieser Altersgruppe darstellt [Langsenlehner et al., 2013].

Auch das Nervensystem zeigt typische strukturelle und funktionelle Veränderungen beim Altern. So kommt es durch verschiedene Vorgänge, wie zum Beispiel Zellschrumpfung der neuronalen Zellen und quantitativer Verringerung dendritischer Ausläufer, zu einer Volumenabnahme des zentralen Nervensystems. Verstärkt wird dies durch den verminderten Wassergehalt, der im Alter in allen Geweben, so auch im Gehirn, zu beobachten ist. Diese Abnahme der Bausteine des neuronalen Netzwerkes bei gleichzeitig zu beobachtender Demyelinisierung von Neuronen lässt den Schluss zu, dass die Folge dieser Veränderungen in einer abnehmenden Geschwindigkeit der neuronalen Reizleitung resultieren [Langsenlehner et al., 2013].

Alterstypische Veränderungen finden sich auch in der Muskulatur, genauer in den beiden wichtigsten Größen der Muskelkraft und der Muskelmasse. Mit zunehmendem Alter nehmen dabei beide ab dem 2. bis 4. Lebensjahrzent ab [Clement 1974; Frontera et al., 1991]. So kommt es zu einem altersbedingten Rückgang der Muskelmasse bei gleichzeitigem Auftreten veränderter Muskelproteine, die im Hinblick auf die Muskelkraft zu einem ineffektiveren Aufbau der Muskulatur führen. In der atrophierenden Muskelmasse kommt es im Alter zu Fetteinlagerung, was die Muskelkraft zusätzlich reduziert. Geschwächt werden neben der Muskulatur auch die Sehnen und Bänder, was die Kraftübertragung zusätzlich erschwert [von Zglinicki 2011]. Der im Alter stattfindende Abbau der Muskulatur ist

ein entscheidender Faktor für zunehmende Stürze, abnehmende Mobilität und verstärktes Hilfebedürfnis [Langsenlehner et al., 2013].

Neben der Muskulatur treten besonders auch in den Knochen große Veränderungen auf, die in direktem Zusammenhang mit dem Alterungsprozess stehen. Physiologisch baut sich die Knochenmasse zu einem Maximum im jungen Erwachsenenalter auf und wird anschließend resorbiert, von Mensch zu Mensch unterschiedlich schnell. Die Geschwindigkeit dieses Resorptionsvorganges weist eine Vielzahl von beeinflussenden Faktoren auf, wie z.B. endokrine Prozesse, die Genetik, Ernährung und Lebensstil und kann, wie in Abbildung 1-3 dargestellt, zu dem Krankheitsbild der Osteoporose führen. Näheres dazu wird im Kapitel 1.4 beschrieben. Neben der Knochenmasse nimmt auch simultan zur Muskulatur die Knochenqualität ab, was einen sehr fragilen und wenig widerstandsfähigen Knochenaufbau zur Folge hat [Langsenlehner et al., 2013].

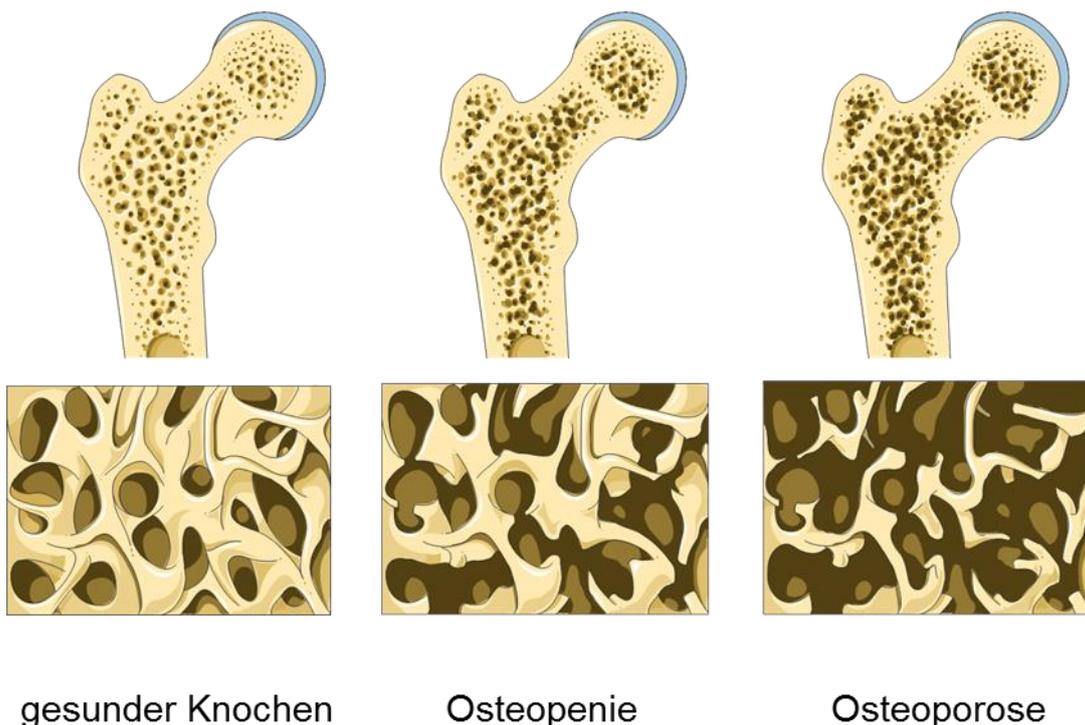


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Abnahme der trabekulären Knochenstruktur vom gesunden Knochen (links) über Osteopenie (Mitte) zur Osteoporose (rechts) – modifiziert nach [Les Laboratoires Servier 2006]

Typische, mit dem Alter einhergehende Veränderungen finden sich auch im Bereich des Auges. So kommt es neben einer Visusminderung auch zu einer erheblichen Verkleinerung der Akkomodationsbreite. Die Fähigkeit zu akkomodieren wird mit zunehmenden Alter so gering, dass sie teilweise vollständig zum Erliegen kommt, was eine Verschiebung des Nahpunktes immer weiter weg vom Auge zur Folge hat. So wird meist nicht nur eine Lesebrille notwendig, besonders gefährlich sind die daraus resultierenden Gang- und Trittsicherheiten. Verstärkt wird die Beeinträchtigung der Sehfähigkeit durch die oben genannte Visusminderung. Durch Eintrübung der Linse kann sich ein Katarakt entwickeln, der eine operative Therapie erfordert [von Zglinicki 2011].

Zuletzt seien an dieser Stelle noch die altersassoziierten Veränderungen der Hämatopoese und des Immunsystems genannt. Bei erstgenanntem Organsystem kommt es zu einer stark verminderten Knochenmarksreserve, die zunächst für den betreffenden Menschen meist asymptomatisch verläuft, sich jedoch meist durch Ausbleiben einer erforderlichen Adaptation, z.B. im Krankheitsfall, manifestiert. Die Veränderungen im Bereich des Immunsystems lassen sich unter dem Begriff der Immunseneszenz bündeln. So führt das Alter neben einer Verschlechterung des Abwehrsystems auch zu einer erhöhten Fehleranfälligkeit dieses Organsystems, was sich durch das vermehrte Auftreten von z.B. schweren Infektionen oder malignen Tumorerkrankungen bemerkbar macht [Langsenlehner et al., 2013].

Die Zusammenschau dieser beispielhaft ausgewählten Organsysteme, deren Veränderungen durch das Altern verursacht sind, zeigt im Hinblick auf unfallchirurgische Krankheitsbilder, warum besonders die Zahl an Bagatelltraumata zunimmt, warum daraus meist schwerwiegende Folgen resultieren und weshalb die Therapie dieser sich als so komplex und aufwendig erweist.

Neben dem physiologischen Alterungsprozess gibt es auch pathologische Veränderungen, die häufig in Assoziation mit dem Alter auftreten, wie z.B. das Krankheitsbild der Osteoporose.

1.4 Osteoporose

Die Bone Evaluation Study (BEST) [Hadjji et al., 2013], die 2013 im Deutschen Ärzteblatt veröffentlicht wurde, beschreibt die derzeit vorherrschende Situation im Hinblick auf das Krankheitsbild Osteoporose folgendermaßen: Derzeit sind in Deutschland 6,3 Mio. Menschen an Osteoporose erkrankt und die Inzidenz wird mit 885.000 Neuerkrankungen pro Jahr angegeben. Betrachtet man die Krankheitsverteilung geschlechtsspezifisch, so sind 5,2 Mio. Frauen und 1,1 Mio. Männer hierzulande betroffen. Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz dieser Erkrankung bei Frauen von 17% (50-64 Jahre) auf 48% (älter als 74 Jahre), bei Männern in der gleichen Altersgruppe von 4% auf 15%. Über die Hälfte der eingeschlossenen Patienten erlitt im Beobachtungszeitraum von 4 Jahren eine osteoporose-assoziierte Fraktur. Typisch sind hierbei Wirbelkörperkompressionsfrakturen, Frakturen des distalen Radius, des proximalen Femur und des proximalen Humerus. Wirbelkörperfrakturen besitzen hierbei im Gegensatz zu den nicht vertebrealen Frakturen einen prognostischen Wert. So weisen diese Frakturen in Abhängigkeit ihres Grades und ihrer Anzahl ein relativ erhöhtes Risiko für Folgefrakturen von durchschnittlich 2-fach (singuläre Fraktur 1. Grades nach Genant (Höhenminderung 20-25%)) bis zu mehr als 10-fach bei höhergradigen (Höhenminderung >25%) singulären oder multiplen Frakturen auf [Dachverband Osteologie, 2009]. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung liegt in einer massiven Kalksalzminderung, die einen Verlust an kompakter Knochenstruktur nach sich zieht. Ursache dieses Verlustes ist eine gestörte Knochenremodellierung, bei der es auf zellulärer Ebene zu einem Übergewicht der knochenresorbierenden Osteoklasten im Verhältnis zu den knochenbildenden Osteoblasten kommt. Abbildung 1-4 zeigt schematisch die verschiedenen Zellarten und den Aufbau des gesunden Knochens.

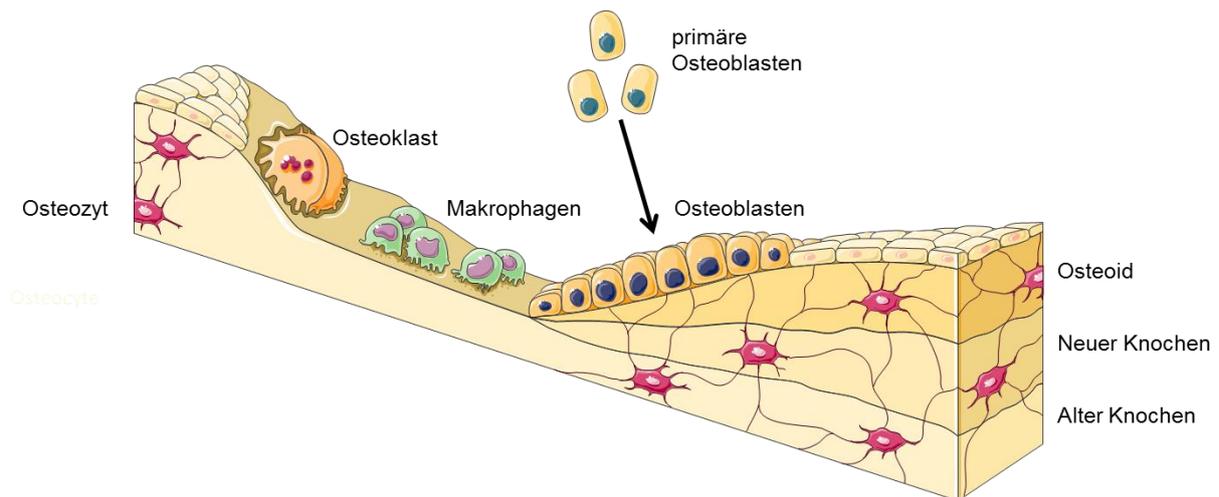


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des gesunden Knochens und seiner Zellen – modifiziert nach [Les Laboratoires Servier 2006]

Durch ein Fehlen von Geschlechtshormonen, bei weiblichen Patientinnen meist durch Eintritt in die Menopause, kommt es zu einer Überexpression des „receptor activator of nuclear factor KB ligand“ (RANKL), was eine gesteigerte Osteoklastenaktivität und dementsprechend eine verstärkte Knochenresorption zur Folge hat [McClung et al., 2006; Priemel et al., 2006]. Es zeigt sich das typische Bild der gestörten Mikroarchitektur des Knochens, bedingt durch die Abnahme der trabekulären Struktur [Langsenlehner et al., 2013; Seifert-Klauss et al., 2006] (Abbildung 1-3).

Die Basisdiagnostik der Osteoporose beinhaltet neben einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung, die Osteodensitometrie sowie bei klinischem Verdacht von Wirbelkörperfrakturen die Erfassung dieser mittels Röntgen in 2 Ebenen der Brustwirbelsäule (BWS) und Lendenwirbelsäule (LWS). Die Osteodensitometrie mittels „dual-energy X-ray absorptiometry“ (DXA)-Messung wird an der LWS, dem Femur und dem Femurhals durchgeführt. Der so ermittelte T-Wert liegt bei Osteopenie zwischen -1 und -2,5, bei Osteoporose ist er kleiner als -2,5. Liegen bei einem T-Wert von < -2,5 zusätzlich Frakturen vor, so wird dies als manifeste Osteoporose bezeichnet [Dachverband Osteologie, 2009]. Da gerade vertebrale Frakturen häufig bei alltäglichen Aktivitäten auftreten und asymptomatisch verlaufen, ist das Erkennen dieser Krankheit nicht selten ein Zufallsbefund [Langsenlehner et al., 2013]. Zudem ist diese Diagnose mit ernstzunehmenden

Folgen und Komplikationen trotz ihrer hohen Inzidenz noch nicht im Bewusstsein der Bevölkerung verankert. So waren in Deutschland im Jahr 2003 7,8 Mio. Menschen an Osteoporose erkrankt; in Behandlung befanden sich nur 21% der Betroffenen [Häussler et al., 2007].

Therapeutisch beruht die Behandlung auf einem Basiskonzept aus verschiedenen Angriffspunkten und einer spezifischen medikamentösen Therapie, wie z.B. RANKL-Inhibitoren. Zum Basiskonzept gehört unter anderem die gezielte Förderung körperlicher Aktivität zur Verhinderung von Immobilisation. Zudem sollte zur Sturzvorbeugung ein interdisziplinärer, ganzheitlicher Ansatz gewählt werden, der eventuell zusätzlich vorhandene endogene Risikofaktoren wie z.B. ophthalmologische und internistische Probleme genauso berücksichtigt wie exogene z.B. wohnraumbezogene Probleme. Dieser ganzheitliche Therapieansatz führt zu einer Abnahme der Sturzhäufigkeit und der daraus resultierenden Frakturen [Langsenlehner et al., 2013; Meyer et al., 2005]. Auch das Tragen von Hüftprotektoren führt laut einer Studie zu einer Abnahme der aus Stürzen resultierenden Frakturen um 80%, da die Energie vermehrt auf die Weichteile übertragen wird [Kannus et al., 2000].

Eine weitere Therapiemaßnahme stellt die Gabe von Vitamin D, alleine oder in Kombination mit Kalzium, dar. Diese führte bei älteren Personen mit erniedrigten Vitamin D-Serumwerten zu einer Sturzreduktion von bis zu 19% [Bischoff-Ferrari et al., 2009]. Nicht zuletzt gilt ein besonderes Augenmerk der täglichen Medikation des Patienten, da unter anderem das allmähliche Ausschleichen psychotroper Substanzen die Sturzhäufigkeit senkt [Dachverband Osteologie 2009].

1.5 Klinisches Management der Alterstraumatologie

Die zentrale Ursache zur Entstehung von Altersfrakturen sind Stürze. So stürzt in der Alterskategorie über 65 Jahre jeder dritte einmal pro Jahr. Bei den noch etwas älteren mit über 80 Jahren stürzen auf 12 Monate gerechnet schon etwa die Hälfte dieser Menschen einmal [Tinetti et al., 1988]. Bemerkenswert hierbei ist auch, dass sich an den eben genannten Zahlen zeigen lässt, dass die Sturzhäufigkeit der

Menschen, die in ihrem gewohnten häuslichen Umfeld leben, in den vergleichbaren Altersgruppen noch unter der Anzahl der Stürze bei Pflegeheimbewohnern liegt [Bundesärztekammer 2001]. Keineswegs stürzen ausschließlich alte Menschen. Gerade Kleinkinder, die ihre ersten Steh- und Geherfahrungen sammeln, stürzen viel häufiger. Jedoch unterscheiden sich die Folgen dieser Sturzereignisse in den verschiedenen Altersklassen deutlich. So führen Stürze beim alten Menschen aufgrund der oben gezeigten physiologischen oder oft auch pathologischen Knochenminderung schneller zu Frakturen, zu einer erschwerten Frakturversorgung und zu einer prolongierten Rehabilitation. Dies spiegelt sich auch darin wieder, dass sich die Diagnose Sturz beim betagten Menschen als die häufigste Notfalleinweisung in unfallchirurgische Abteilungen darstellt [Rubenstein 2006].

Wie notwendig die genaue ärztliche Abklärung eines solchen Sturzpatienten ist, lässt sich daraus erkennen, dass immerhin jeder 20. Sturz bei einem 65-jährigen Menschen zu einer Fraktur führt [Rubenstein 2006] und auch schwerwiegende Weichteilverletzungen (5%) sind Folgen dieser Unfälle [Sattin 1992].

Ein entscheidender Faktor für die Komplexität der erforderlichen Therapie liegt in der Tatsache, dass knapp die Hälfte der gestürzten Patienten nach dem Sturzereignis nicht mehr alleine aufstehen können [Tinetti et al., 1993]. Gründe dafür sind neben den direkt aus dem Sturz resultierenden Verletzungen, der, schon vor dem Ereignis stattgefundenen, physiologische oder auch pathologische Alterungsprozess, der dazu führt, dass z.B. in den Bereichen der Muskulatur, des Visus, oder der Kognition nicht mehr genug Ressourcen vorhanden sind, um sich aus dieser Situation alleine zu befreien. Die Tatsache, wie lange ein gestürzter Mensch alleine in seiner Wohnung liegt, also das Ausmaß des erlittenen Liegetraumas, hat erheblichen Einfluss auf seinen physischen und psychischen Zustand, in dem er bei Auffindung in die Klinik zur weiteren Versorgung gebracht werden kann. Besonders sei hier die Malnutrition erwähnt, die bei über der Hälfte der Patienten schon prähospital manifest ist oder für die zumindest ein Risiko besteht. Die Folge davon können zunehmende postoperative Komplikationen bis hin zu erhöhter Mortalität sein [Avenell et al., 2006]. Alterstraumatologie bedeutet, dass neben der Fraktur, in dem Fall der proximalen Femurfraktur, durchschnittlich noch 2 weitere relevante Diagnosen vorliegen. Dies sind neben kardialen Erkrankungen, v.a. Demenz, Diabetes oder Osteoporose [Pretto et al., 2008].

Auch wenn nur 5% der Stürze eine Fraktur zur Folge haben, so führen Altersfrakturen zu einer erheblichen Verschlechterung der Selbstständigkeit dieser Patienten, was mit einer deutlichen Abnahme der Lebensqualität einhergeht. Während das erste Jahr nach einer proximalen Femurfraktur sogar eine Letalität von 20-25% aufweist [Alegre-Lopez et al., 2005; Jiang et al., 2005; Smektala et al., 2005; U.S. Congress - Office of Technology Assessment 1994], kommt es bei den restlichen Patienten auch in den folgenden Jahren meist nicht zu einer vollständigen Erholung [Boonen et al., 2004]. Nach einer stationären Behandlung aufgrund des Unfalls ist für 41% der Patienten eine häusliche Versorgung nicht mehr möglich und sie müssen in ein Pflegeheim verlegt werden [U.S. Congress - Office of Technology Assessment 1994]. Die Angst vor einem erneuten Ereignis führt dazu, dass von ursprünglich 75% der Betroffenen nach Abschluss der Behandlung nur noch 15-30% ohne Hilfsmittel gehen können [Dieckmann 2009; Osnes et al., 2004] und sogar 43% ihre häusliche Umgebung aufgrund ihrer physischen und psychischen Konstitution nicht mehr verlassen können [Osnes et al., 2004].

Anhand dieser Zahlen lässt sich deutlich aufzeigen, dass eine gute Versorgung des alten Patienten nur in einer interdisziplinären Zusammenarbeit liegen kann. Interdisziplinär einerseits auf Ebene der Ärzte, zwischen Unfallchirurgen, Internisten, Geriatern und anderen erforderlichen Fachdisziplinen. Interdisziplinär aber auch zwischen Ärzten und Pflege, denn es ist gerade für ältere Patienten wichtig, Ansprechpartner in dem ungewohnten und fremden Umfeld einer Akutklinik zu haben, die sich um sie kümmern. Interdisziplinär auch in Bezug auf nachfolgende Rehabilitationsbehandlungen oder Sozialdienstmitarbeiter, die sich um die weitere Versorgung des Patienten kümmern müssen, da wie oben beschrieben für viele eine weiterhin selbstständige Versorgung im häuslichen Umfeld nicht mehr möglich ist.

Auf die speziell unfallchirurgischen Therapiemöglichkeiten und –probleme soll nun im weiteren Verlauf am Beispiel der proximalen Femurfraktur eingegangen werden.

1.5.1 Unfallchirurgische Therapieoptionen der proximalen Femurfraktur

Der Begriff der proximalen Femurfraktur lässt sich wie oben beschrieben in 3 Frakturbereiche gliedern. Ausgehend von den anatomischen Strukturen des proximalen Femurs (Abbildung 1-5) sind das von distal nach proximal die subtrochantäre, die pertrochantäre Femurfraktur sowie die noch weiter proximal gelegene Schenkelhalsfraktur (siehe Abbildung 1-6).

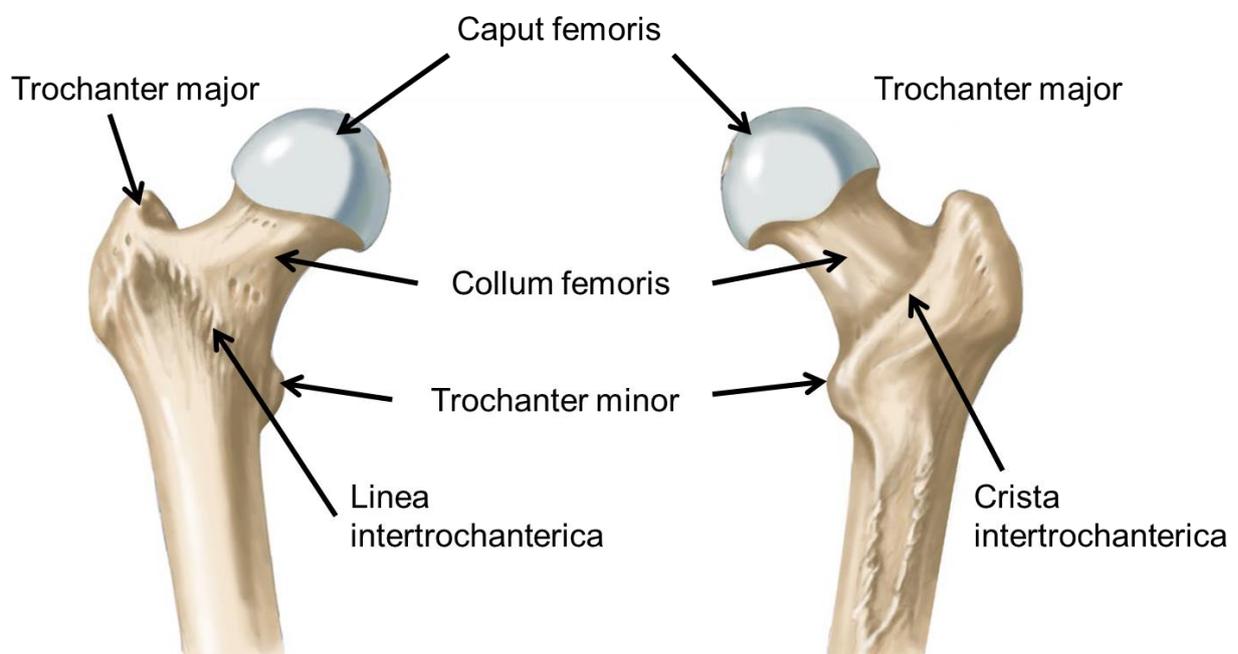


Abbildung 1-5: Proximales Femur von ventral (links) und dorsal (rechts) – modifiziert nach [Schünke et al., 2014]

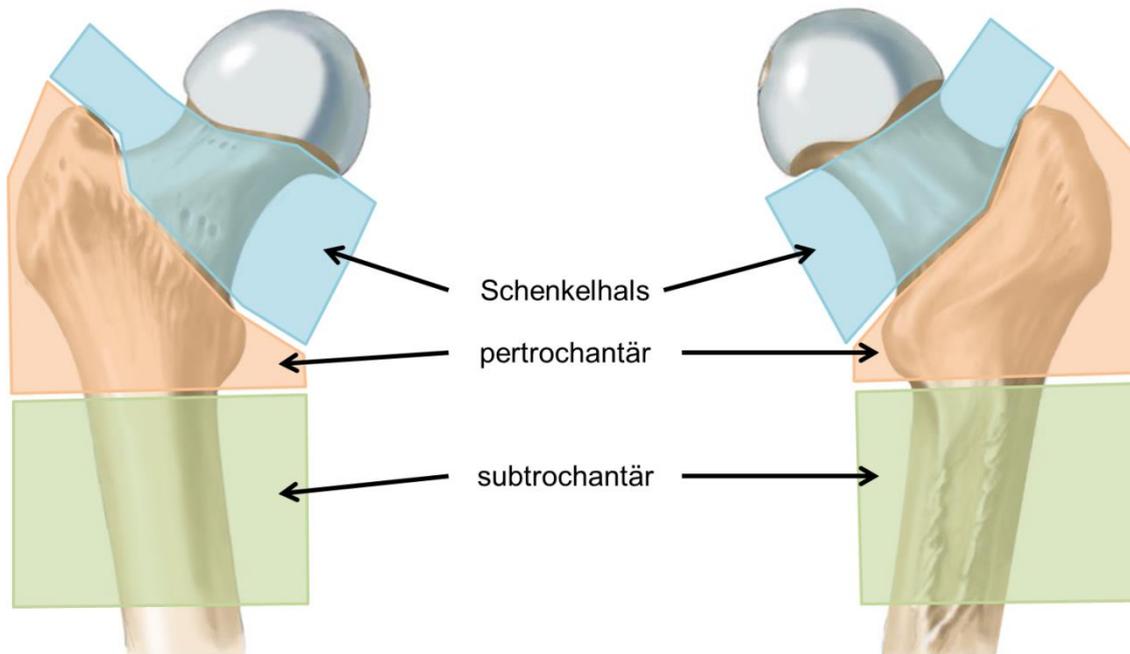


Abbildung 1-6: Einteilung des proximalen Femurs in Schenkelhals, peritrochantäre und subtrochantäre Region – modifiziert nach [Reimertz et al., 2012; Schünke et al., 2014]

1.5.1.1 Subtrochantäre Femurfraktur

Orientiert man sich an der Literatur um die derzeit übliche Therapie zu ermitteln, herrscht bei der Versorgung der subtrochantären Femurfraktur der größte Konsens. In Abgrenzung zu den anderen Frakturen liegt diese Fraktur distal des Trochanter minor. Wie das Röntgenbild in Abbildung 1-7 zeigt, ist jedoch auch ein Auslauf der Fraktur bis in die intertrochantäre Region möglich [Lorenz 2011].



Abbildung 1-7: Röntgenbild einer sub- bzw. intertrochantären Femurfraktur (links). Zur Verfügung gestellt von BG Unfallklinik Murnau

Entscheidend bei Frakturen der unteren Extremität ist das Verständnis der physiologischen Kraftüberleitung über den Hüftkopf, der medial liegt. Im Gesunden wird diese mediale Krafteinleitung durch die am Trochanter major ansetzenden Abduktoren und den Tractus iliotibialis neutralisiert [Reimertz et al., 2012]. So ist es Aufgabe dieser Zuggurtung, eine beispielsweise im Einbeinstand dem dreifachen Körpergewicht entsprechende Krafteinwirkung zu kompensieren [Pauwels 1973].

Kommt es nun zu einer Fraktur im Bereich des subtrochantären Femur, wird die muskuläre Dysbalance, die beim Gesunden physiologisch ist, sichtbar und es ist entscheidend, ein Therapieverfahren zu wählen, das eine erfolgreiche Frakturheilung trotz der großen Krafteinwirkung im Bereich der Frakturzone gewährleistet.

Verfahren der Wahl ist in diesem Fall die Versorgung mit einem intramedullären, langen Nagel. Dieser ermöglicht eine frühe Vollbelastung, aufgrund seiner Fähigkeit die einwirkenden Kräfte auf sich selbst und auf die intakten Bereiche des Femur zu verteilen. Abhängig vom Frakturtyp und -lokalisierung kann bei einem stabilen medialen Frakturfragment ein Femurmarknagel verwendet werden [Jacofsky et al., 2004]. Zeigt die Fraktur hingegen eine fehlende mediale Abstützung, geht die

Tendenz eher zu einem intramedullären System mit einer Schenkelhalsschraube, wie einem langen proximalen Femurnagel (PFN) oder Gamma-Nagel [Lorenz 2011].

1.5.1.2 Pertrochantäre Femurfraktur

Grundsätzlich sollte eine solche Fraktur innerhalb der ersten 24-36 Stunden nach dem Ereignis versorgt werden, da gerade bei alten Patienten zu einem späteren Zeitpunkt das Risiko für zusätzliche Komplikationen steigt [Chilov et al., 2003].

Die einzelnen Fragmente dieser Fraktur stellen dabei meist der Femurschaft und der Kopf-Hals-Anteil, teilweise auch der Trochanter minor und major dar [Reimertz et al., 2012] (Abbildung 1-8).



Abbildung 1-8: Röntgenbild einer pertrochantären Femurfraktur (rechts). Im Röntgenbild sind der dislozierte Kopf-Hals-Anteil, der dislozierte Trochanter minor und der Femurschaft erkennbar. Zur Verfügung gestellt von BG Unfallklinik Murnau

Wie bei der subtrochantären Fraktur ist die betreffende, lateral inserierende Muskulatur nicht in der Lage, eine Varisierung des proximalen Frakturanteils zu kompensieren. David et al. zeigten zudem, dass die Frakturstabilisierung umso schwerer wird je kleiner dieses Fragment ist [David et al., 2000].

Zur Versorgung dieser Fraktur gibt es grundsätzlich zwei Therapieoptionen: einerseits ein intramedulläres System und andererseits extramedulläre Systeme wie die Dynamische Hüftschraube (DHS), die nur im Verbund mit einer Abstützplatte die geforderte Mindestbelastbarkeit (300% des Körpergewichtes) und Sicherheit aufweist [Götze et al., 1998]. Das Problem bei Fehlen der Trochanterabstützplatte stellt eine mögliche Trochanterlateralisation mit Beinverkürzung dar [Bartl et al., 2003]. Prinzipiell steht auch noch eine prothetische Versorgung als Therapieoption zur Verfügung, diese sollte jedoch in der Primärversorgung nur bei speziellen Indikationen wie einer zusätzlich manifesten Coxarthrose oder schwerer Osteoporose in Erwägung gezogen werden [Ricci 2005].

Für die Entscheidungsfindung in Bezug auf die angestrebte Therapie ist z.B. die Verwendung der Evans Klassifikation hilfreich, die zwischen stabilen und instabilen pertrochantären Frakturtypen unterscheidet.

Somit ist bei den stabilen Frakturen kein Unterschied zwischen einer Frakturversorgung mittels intramedullärem Kraftträger oder mittels Platten-Schraubenosteosynthese zu erkennen [David et al., 2000]. Unterschiede finden sich hier eher im Bereich der verwendeten DHS in Bezug auf die Plattenlänge und die daraus resultierenden Weichteilschäden [Jacofsky et al., 2004].

Grundsätzlich sollte bei der Implantatwahl in jedem Fall der Erfahrungsstand des Operateurs mit dem jeweiligen System beachtet werden [Lorenz 2011].

Von den Literaturdaten ausgehend, sollte bei allen instabilen Frakturen nach Evans oder osteoporotischem Knochen ein intramedulläres Verfahren z.B. mittels Gammanagel bevorzugt werden, gerade weil bei älteren Patienten die operative Therapie mit intramedullären Kraftüberträgern dazu führt, dass der Eingriff v.a. hinsichtlich des Blutverlustes und des Weichteiltraumas schonender verläuft und die postoperative Behandlung mit einem schnelleren Wiedererlangen der Mobilität einhergeht [Kristek et al., 2010; Palm et al., 2011].

1.5.1.3 Schenkelhalsfraktur

Die Schenkelhalsfraktur stellt eine Fraktur im Bereich der biomechanisch schwächsten Zone des Femur dar. Häufig kommt es in der Folge zu einer Femurkopfnekrose, da die Vaskularisation des Kopfes durch die Fraktur nicht mehr gewährleistet werden kann (Abbildung 1-9).

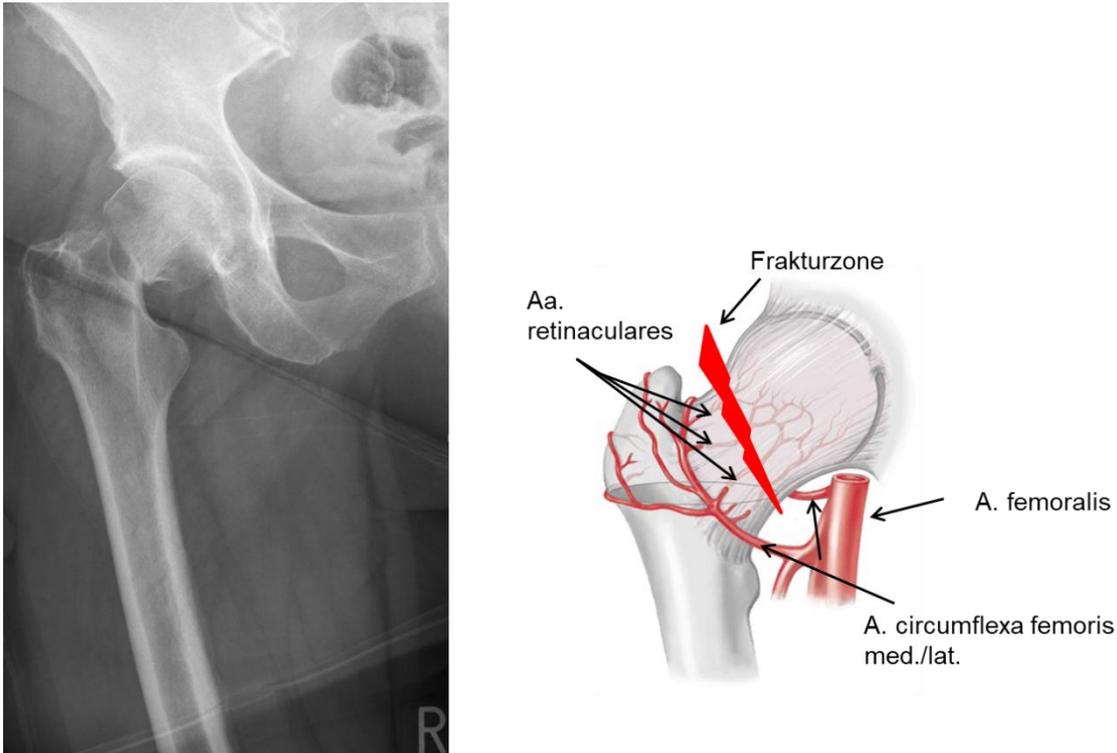


Abbildung 1-9: Radiologische und schematische Darstellung einer Schenkelhalsfraktur (rechts) inklusive der Gefäßversorgung des Hüftkopfes. Gefahr der Hüftkopfnekrose bei einer Schenkelhalsfraktur aufgrund der unterbrochenen Gefäßversorgung – schematische Abbildung modifiziert nach [Dietz 2012; Gautier et al., 2000]. Röntgenbild zur Verfügung gestellt von BG Unfallklinik Murnau

Grundsätzlich ist dieser Frakturtyp in der Versorgung der pertrochantären Femurfraktur sehr ähnlich. Die therapeutische Ausnahme besteht darin, eine frühzeitige prothetische Versorgung zu erwägen. So wird häufig nur bei Patienten, die jünger als 65 Jahre sind, eine gelenkerhaltende Therapie mithilfe von kanülierten Spongiosaschrauben oder einem extramedullären Kraftträger (DHS oder Targon FN) indiziert, wohingegen bei älteren Patienten deutlich öfter eine Hüfttotalendoprothese

oder bei schlechterer Gehfähigkeit eine bipolare Endoprothese die operative Therapie der Wahl darstellen [Ellenberger 2011].

1.5.2 Unfallchirurgische Probleme und Herausforderungen in der Alterstraumatologie

Aufgrund des alten Patientengutes und des dadurch häufig osteoporotisch geschädigten Knochens, weist die Gruppe der proximalen Femurfrakturen eine relativ hohe Komplikationsrate auf.

Typisch für einen Vertreter der intramedullären Nägel, den proximalen Femurnagel, ist der sogenannte Z-Effekt. Hierbei kommt es zu einer Dislokation der im Schenkelhals eingebrachten Schrauben. Die Antirotationsschraube wandert dabei aufgrund der Belastung nach medial, die Schenkelhalsschraube nach lateral [Hohendorff et al., 2005; Werner-Tutschku et al., 2002].

Eine weitere Komplikation der genannten Osteosyntheseverfahren ist der „Cut-out“, der meist bei Verwendung der DHS beobachtet wird. Betroffen ist auch hier die im Schenkelhals verankerte Schraube, die infolge der Belastung den Knochen in diesem Bereich zerschneidet, und so ihre ursprüngliche Position verlässt [Reimertz et al., 2012; Suckel et al., 2007].

Meist führen diese Komplikationen zu einer fehlenden Stabilisierung der Frakturfragmente („Non-Union“), was in der Regel einen erneuten operativen Eingriff zur Revision unumgänglich macht. Oft stellt im weiteren Verlauf schließlich eine prothetische Versorgung die letzte therapeutische Option dar [Waldherr et al., 2007]. Häufig zeigt sich auch posttraumatisch ein größerer knöcherner Defekt im Frakturbereich, der weitere Therapieoptionen zur Defektfüllung neben der Frakturstabilisierung erfordert.

Gängige operative Verfahren zur Versorgung größerer knöcherner Defekte sind der autologe Knochen-/Spongiosatransfer oder die allogene Knochen spende. Auch der Einsatz von Wachstumsfaktoren im Bereich der Defekte findet klinische Anwendung [Dimitriou et al., 2011; Reichert et al., 2011]. Der Nachteil bzw. das Risiko der genannten Therapieoptionen ist sowohl ihre begrenzte Verfügbarkeit, als auch die je

nach Verfahren hohe, zusätzliche Morbidität und intraoperative Zeitdauer, sowie das Ausbleiben der Transplantatintegration bzw. des Transplantatremodellings [Liu et al., 2008; Reichert et al., 2011].

Dies zeigt, dass die proximale Femurfraktur, aber auch die anderen typischen Altersfrakturen bis heute aus unfallchirurgischer Sicht eine Herausforderung darstellen und warum es vermehrt zu unbefriedigenden Therapieergebnissen kommt. Aus diesem Grund wird an der Optimierung und Weiterentwicklung der bestehenden Therapiemöglichkeiten und an Neuentwicklungen gearbeitet.

1.6 Regenerative Medizin als neue Therapieoption

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen nimmt die noch relativ junge Disziplin der regenerativen Medizin eine wichtige Rolle ein. Ziel dieser ist eine Erneuerung von Gewebestrukturen, die durch Krankheit, Trauma oder Alter verändert worden sind. Dabei wird eine Brücke von der Klinik in das Labor gebaut und das dort vorhandene biotechnologische Wissen verwendet, um bisher etablierte medizinische Therapiemöglichkeiten weiterentwickeln zu können. Dieses sehr breite Feld der Geweberegeneration umfasst Zellkulturtechniken ebenso wie Genomforschung oder pharmazeutische Innovationen. Ein Schwerpunkt liegt auch im Bereich des Tissue Engineerings, wobei Gewebezellen *in vitro* kultiviert und differenziert werden, um ihre Eigenschaften zu erforschen. Eine häufig verwendete Zellart, die sich für solche experimentellen Untersuchungen besonders eignet, sind Stammzellen.

1.6.1 Stammzellen

Der Begriff der Stammzelle ist ein sehr häufig verwendeter und dabei oft sehr weitgefasster Begriff. Daher ist eine genaue Definition sinnvoll. Als Stammzellen werden grundsätzlich nicht ausdifferenzierte, unreife Zellen bezeichnet, die die folgenden typischen Eigenschaften aufweisen:

- Wachstum und Vermehrung
- Selbstregeneration
- Differenzierung in verschiedene Zellarten [Preston et al., 2003]

Aufgrund ihres unterschiedlichen Differenzierungsverhaltens unterscheidet man hauptsächlich zwei verschiedene Arten von Stammzellen. So gibt es einerseits pluripotente und andererseits multipotente Stammzellen, wobei die sogenannten embryonalen Stammzellen, im Verlauf abgekürzt mit ESCs (embryonic stem cells) Vertreter der ersten Gruppe sind und adulte Stammzellen zu der zweitgenannten Gruppe gezählt werden [Zeidan-Chulia et al., 2009].

1.6.1.1 Embryonale Stammzellen

Der Ursprung dieser Zellen liegt im embryonalen Gewebe, genauer in der knapp eine Woche alten Blastozyste [Wuchter et al., 2010]. Aufgrund ihrer charakterisierenden Eigenschaft, der Pluripotenz, ist es möglich aus diesen Zellen unter bestimmten Bedingungen alle körpereigenen gewebespezifischen Zellen zu differenzieren. Auch weisen diese Zellen *in vitro* zunächst eine große Selbsterneuerungskapazität auf, die eine (fast) unbegrenzte quantitative Vermehrung ermöglicht [Thomson et al., 1998].

Neben diesen, für das Tissue Engineering beinahe idealen Bedingungen, weisen diese Zellen allerdings auch Eigenschaften auf, die die Verwendbarkeit deutlich erschweren. Trotz ihres so großen Expansionsvermögens können aufgrund ihrer embryonalen Herkunft nicht die benötigten ausreichend großen Mengen an Zellen generiert werden. Gerade die Herkunft ist es auch, die nicht nur für ethische Diskussionen sorgt, sondern z.B. einen Einsatz dieser Zellen in Deutschland gesetzlich verbietet und somit die Verwendung extrem limitiert. Auch auf zellulärer Ebene gibt es Hinderungsgründe für einen breiten Einsatz dieser Zellen, da es nach Transplantation dieser im Tiermodell zur Tumorentstehung und zu Abstoßungsreaktionen kam [Wuchter et al., 2010; Zeidan-Chulia et al., 2009]. Aufgrund dieser Nachteile der ESCs ist der adulte Stammzellentyp in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Wissenschaft geraten.

1.6.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Eine besondere Gruppe der adulten Stammzellen stellen dabei die induzierten pluripotenten Stammzellen, im Folgenden abgekürzt mit iPSCs (induced pluripotent stem cells) dar. Dabei handelt es sich um adulte somatische (Stamm-)Zellen, die aufgrund viral induzierter Genomveränderungen, im Speziellen der Transfektion der Zellen mit den Transkriptionsfaktoren Sox2, Klf4, Oct3/4 und c-Myc, wieder pluripotente Eigenschaften aufweisen [Takahashi et al., 2007; Takahashi et al., 2006; Yamanaka 2009]. Da es sich primär um adulte (Stamm-)Zellen handelt, ist die Gewinnung nicht auf embryonales Gewebe beschränkt, was ein großer Vorteil gegenüber der Anwendbarkeit von ESCs darstellt [Chun et al., 2010].

Doch auch bei dieser Art der Stammzelle sind in der Literatur eine induzierte Tumorentstehung [Kastenberg et al., 2008] und das Auftreten genomischer Aberrationen aufgrund der onkogenen Wirkung der Transkriptionsfaktoren beschrieben. Ohne Zweifel weisen diese Zellen ein großes Potential auf, doch ihre genaue Bedeutung in der Entwicklung neuer Therapieoptionen ist noch nicht geklärt [Wu et al., 2011].

1.6.1.3 Adulte Stammzellen

Diese Stammzellart ist lediglich multipotent und kann daher nur in bestimmte Zelltypen differenzieren. Vertreter dieser Stammzellart sind zum Beispiel die hämatopoetischen Stammzellen, im Verlauf abgekürzt mit HSCs (hematopoetic stem cells) oder die mesenchymalen Stammzellen, im Folgenden als MSCs (mesenchymal stem cells) bezeichnet. Trotz ihrer eingeschränkten Differenzierbarkeit weisen adulte Stammzellen viele Vorteile im Vergleich zu ESCs auf. Einerseits sind sie aufgrund ihres Vorkommens im gesamten Organismus aus einer deutlich höheren Anzahl an Gewebearten wie dem Knochenmark, dem Fettgewebe, der Haut, dem Gehirn aber auch dem Zahnmark oder der Synovia zu gewinnen [Lee et al., 2004; Miura et al., 2003; Nakagami et al., 2006]. Dabei stellen sie dort funktionell eine Zellressource für das umgebende Gewebe dar [Tavian et al., 2005]. Andererseits ist die Isolation und Kultivierung dieser Zellen inzwischen

standardisiert und die Verwendung verursacht keinerlei ethische Diskussionen, da sie nicht embryonalen Ursprungs sind [Zeidan-Chulia et al., 2009].

Die therapeutische Transplantation von HSCs ist heute bei einigen Formen der Leukämie und anderen, das Blutbild betreffenden Krankheiten bereits eine standardisierte Therapie und findet in der Klinik regelmäßig Anwendung [Marini et al., 2006].

Doch auch andere Vertreter der adulten Stammzellen dienen als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieoptionen in den unterschiedlichen Fachdisziplinen, so auch im Bereich der Unfallchirurgie, was im Folgenden näher erläutert werden soll.

1.6.1.3.1 Mesenchymale Stammzellen und ihre Verwendung

Auf der Suche nach unfallchirurgischen Therapieoptionen stellen besonders die MSCs als Vertreter der adulten Stammzellen eine interessante Zellart dar, da sie für die Konstitution und Regeneration des Binde- und Stützgewebes zuständig sind. Dazu gehören neben dem Knochen und Knorpel auch Sehnen, Bänder, Muskeln und das Haut- und Fettgewebe [Jerosch 2002]. MSCs können wie oben erwähnt in verschiedene Zellarten differenzieren. Der mesodermale Ursprung dieser Stammzellen ermöglicht die Veränderung in typische Zellarten aus dem gleichen Keimblatt, wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten [Tuan et al., 2003].

Darüber hinaus ist auch eine Differenzierung *in vitro* über das Keimblatt hinaus in bestimmte Zellarten des Endo- oder Ektoderms in z.B. neuronale Vorläuferzellen, Kardiomyozyten oder Hepatozyten beschrieben [Alison et al., 2000; da Silva Meirelles et al., 2006; Dawn et al., 2005; Erices et al., 2003; Laflamme et al., 2005; Orlic et al., 2001; Parker et al., 2006; Petersen et al., 1999; Shim et al., 2004; Xu et al., 2004]. Eine schematische Darstellung einiger Differenzierungsrichtungen zeigt Abbildung 1-10.

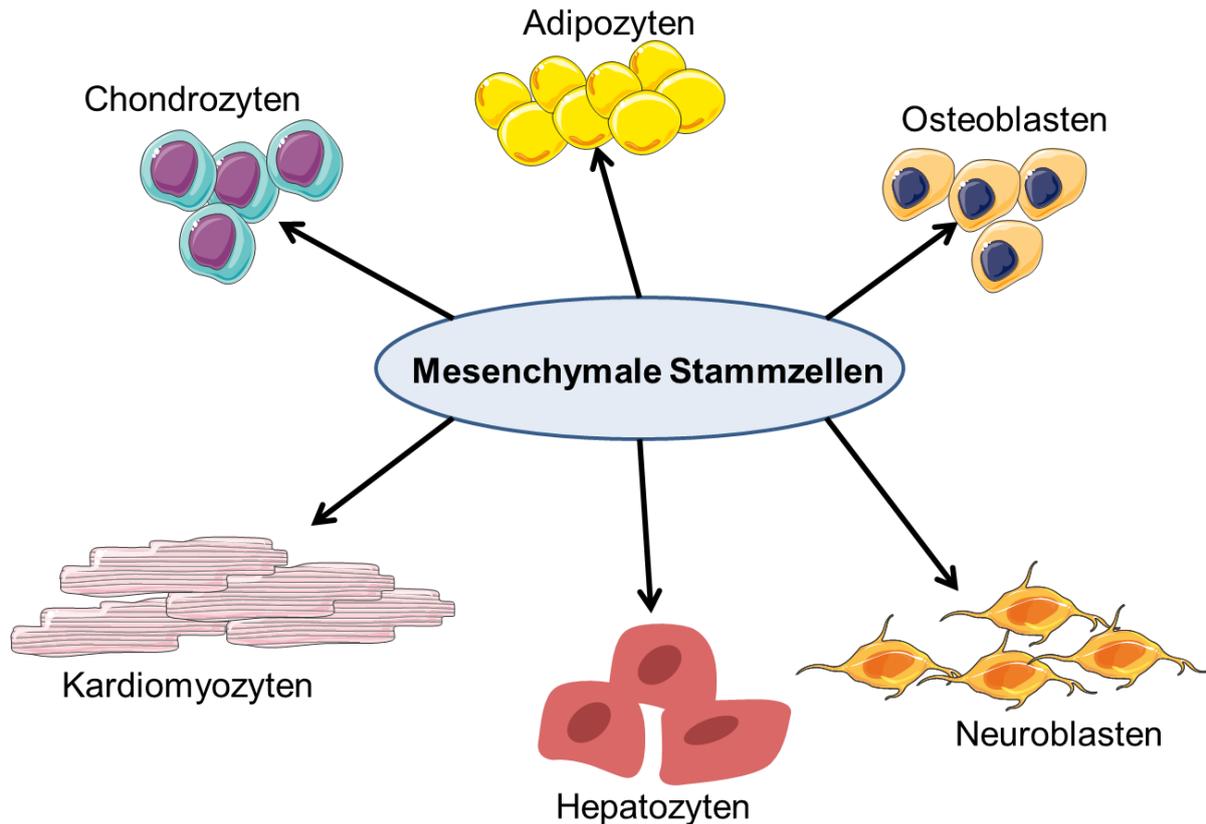


Abbildung 1-10: Mögliche Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen– modifiziert nach [Jerosch 2002; Tuan et al., 2003].

Illustrationen: Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier - all rights reserved

1.6.1.3.2 Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen

Betreffend des Vorkommens und der Differenzierbarkeit stellen MSCs eine sehr große Vielfalt dar, was eine Charakterisierung dieser anhand von unterschiedlichen Oberflächenmarkern, sogenannten CD (cluster of differentiation) - Marker, erfordert. Charakteristisch ist dabei eine Kombination aus der Anwesenheit von z.B. CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 bei gleichzeitig negativem Ergebnis für die Vertreter typischer hämatopoetischer Marker wie CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79alpha und HLA-DR [Dennis et al., 2002; Gronthos et al., 2001; Lei et al., 2007; Schäffler et al., 2007; Varma et al., 2007; Zeidan-Chulia et al., 2009].

Anhand der großen Anzahl der hier genannten typischen Oberflächenmarker lässt sich erkennen, dass es sich um eine sehr heterogene Zellart handelt. Diese Heterogenität der Oberflächenmarker wird durch die Isolation der Zellen aus

verschiedenen Geweben oder unterschiedlichen Kulturbedingungen noch weiter vergrößert, während ähnliche Kulturbedingungen bei unterschiedlichen Spendern zu einer Verkleinerung der Heterogenität führt [Wagner et al., 2005].

Neben den Oberflächenmarkern stellen die Fibroblasten-ähnliche Morphologie und die Plastikadhärenz ein weiteres typisches Merkmal der MSCs dar, genau wie das oben beschriebene Potential in verschiedene Zellarten zu differenzieren [Horwitz et al., 2005].

Zusammenfassend zeigen Dominici et al., dass eine eindeutige Identifikation von MSCs den Nachweis der Plastikadhärenz in Kultur, die mögliche Differenzierbarkeit in Richtung Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten und die Expression von CD73, CD90 und CD105 bei gleichzeitig fehlender Expression von CD11b oder CD14, CD34, CD45, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR erfordert [Dominici et al., 2006].

1.6.1.3.3 Mesenchymale Stammzellen und das Immunsystem

Hinsichtlich eines Einsatzes der MSCs als Therapieoption *in vivo* ist auch ihr immunologisches Verhalten interessant. Bei heterologen Transplantationen stellen Proteinkomplexe des sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexes, im Folgenden abgekürzt mit MHC (major histocompatibility complex) - Proteine, ein entscheidendes Kriterium für Erfolg oder Misserfolg des Verfahrens dar. Aufgrund der Tatsache, dass die MSCs nur ein sehr schwaches Muster an MHC-Proteinen der Klasse I aufweisen und Proteine der Klasse II vollständig fehlen, kann diese Stammzellart ohne erforderliche Immunsuppression des Empfängers transplantiert werden [Chang et al., 2006; Le Blanc et al., 2003; Rasmusson 2006]. Neben diesem besonderen MHC-Expressionsmuster weisen diese Zellen zudem einen gewissen immunmodulatorischen Effekt auf [Aggarwal et al., 2005; Uccelli et al., 2006], der wahrscheinlich auf einer gehemmten T-Zellen-Proliferation und Aktivität basiert [Beyth et al., 2005; Rasmusson et al., 2003]. Diese Eigenschaft macht einen therapeutischen Einsatz von MSCs im Bereich von erfolgtem Gewebeschaden möglich, um die dort entstandene Entzündungsreaktion zu modulieren [Caplan 2009; Giordano et al., 2007; Le Blanc et al., 2005].

MSCs versprechen durch ihre einfache Isolation und Kultivierung und die vielfältigen Differenzierungsmöglichkeiten in Kombination mit ihren immunologischen Eigenschaften einen sehr großen therapeutischen Anwendungsbereich. Dies zusammen mit ihrer mesenchymalen Herkunft und dem daraus folgenden Bezug zum Binde- und Stützgewebe prädestinieren diese Stammzellen als möglichen Therapieansatz bei unfallchirurgischen Fragestellungen, gerade auch im Sinne einer lokalen Anwendung im Fraktur- oder Defektbereich.

1.6.1.3.4 Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen

Adulte MSCs können wie oben erwähnt aus verschiedenen Gewebearten isoliert werden. Dabei bieten unter anderem das Knochen- oder Zahnmark, das Fettgewebe oder die Haut ein vielversprechendes Reservoir für MSCs [Huang et al., 2008; Tuan et al., 2003]. Das wohl am häufigsten verwendete Spendergewebe für MSCs stellt dabei das Knochenmark dar [Zeidan-Chulia et al., 2009]. Die daraus gewonnenen Zellen werden dementsprechend als mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, im Folgenden abgekürzt mit BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells), bezeichnet. Ein Grund für die vielfache Verwendung der BMSCs liegt in der Tatsache, dass ihre Dichte im Knochenmark mit $1 \text{ pro } 10^5$ anderen Zellen [Makhluf et al., 2000] initial zwar gering erscheint, sich aber im Vergleich mit der Anzahl an MSCs in anderen Spendergeweben als zahlreich herausstellt [Wagner et al., 2005; Zhu et al., 2008].

Ein anderer Ursprungsort für mesenchymale Stammzellen liegt im Fettgewebe. Diese Zellart wird als mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe, kurz Ad-MSCs (adipose-derived mesenchymal stem cells), deklariert. Auch wenn das Fettgewebe als Spendergewebe bisher seltener als das Knochenmark verwendet wurde, weist es einige entscheidende Vorteile auf. So ist die Gewinnung der Ad-MSCs nicht nur deutlich günstiger, der notwendige Eingriff ist dabei zusätzlich weniger invasiv und schmerzhaft für den Patienten, was auch dem leichteren Zugangsweg geschuldet ist. Des Weiteren stellt das Fettgewebe als Entnahmeort eine sehr viel größere und voluminösere Gewebestruktur dar, die sich auch in den meisten Fällen nicht nur aus medizinischer Sicht als redundant erweist. Die Möglichkeit auf eine größere Spenderquelle in Kombination mit einer höheren Proliferationsrate der daraus

entnommenen Zellen zurückgreifen zu können, verleiht dem Fettgewebe einen weiteren Vorteil gegenüber dem Knochenmark [Cowan et al., 2004]. Gerade im Hinblick auf die Suche nach Therapieoptionen für ältere und teilweise multimorbide Patienten, muss die Indikation für jede zusätzliche Schädigung der fragilen Knochenstruktur, auch wenn es therapeutischen Zwecken dient, genau geprüft werden.

1.6.1.3.5 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Wie oben erwähnt, können Ad-MSCs in verschiedene Zelltypen differenziert werden. Die osteogene Differenzierung dieser Zellen wird durch die Zugabe von Dexamethason, CaCl_2 , L-Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerolphosphat ins Differenzierungsmedium erreicht.

Als Puffer dient dabei HEPES, der ein stabiles Milieu bei einem pH-Wert im Bereich von 7,2–7,6 schafft, was eine wichtige Voraussetzung für die angestrebte Differenzierung darstellt.

Dexamethason ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid, das positive Auswirkungen auf die Proliferationsrate der Zellen hat. Zusätzlich bewirkt es eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung und veranlasst eine veränderte Morphologie und Anordnung der Zellen *in vitro* [Bellows et al., 1990; Liu et al., 2002; Yang et al., 2003].

L-Ascorbat-2-Phosphat, als Vitamin C, stellt lediglich die stabilere Variante des eigentlich entscheidenden Ascorbats dar. Dieses sorgt im Differenzierungsprozess für eine Induktion der Osteogenese und eine Verstärkung der osteogenen Marker wie Alkalische Phosphatase (AP) und Osteocalcin [Liu et al., 1999]. Des Weiteren stellt es einen wichtigen Cofaktor zur Hydroxylierung von Prolin und Lysin in der Kollagensynthese dar [Hulmes 2008; Takamizawa et al., 2004].

Als Vertreter der organischen Phosphate wird β -Glycerolphosphat dem Differenzierungsmedium hinzugefügt. Dies bewirkt nicht nur eine Bereitstellung eines wichtigen Grundproduktes zur Mineralisierung der Extrazellulärmatrix der Osteoblasten, sondern es wirkt auch auf Osteopontin, einen Vertreter der osteogenen Marker und verursacht zusätzlich die Hochregulierung des core binding

factor alpha 1 (Cbfa1), einem wichtigen Regulator der Osteogenese [Beck et al., 2000; Ducy et al., 1997; Fujita et al., 2001].

Einen schematischen Überblick der komplexen Regulationsmechanismen der einzelnen Substanzen zeigt Abbildung 1-11.

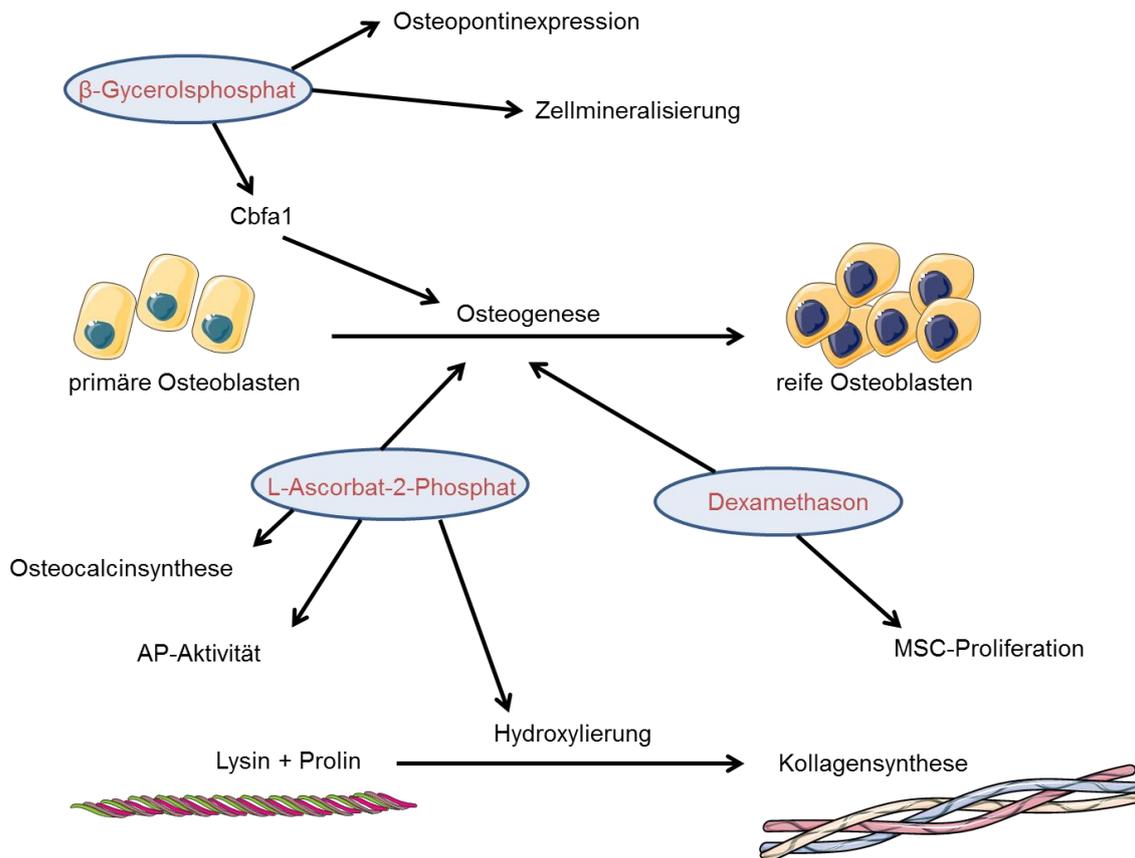


Abbildung 1-11: Angriffspunkte von Ascorbat, Dexamethason und β -Glycerolphosphat bei der osteogenen Differenzierung - nach [Beck et al., 2000; Bellows et al., 1990; Ducy et al., 1997; Fujita et al., 2001; Hulmes 2008; Liu et al., 2002; Liu et al., 1999; Takamizawa et al., 2004; Yang et al., 2003];
Abkürzungen Abbildung 1-11: Alkalische Phosphatase (AP), Mesenchymale Stammzelle (MSC), core binding factor alpha 1 (Cbfa1).

Illustrationen: Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier - all rights reserved

1.6.1.3.6 Differenzierbarkeit alter Spender

Vor dem klinischen Hintergrund auf der Suche nach neuen Therapieansätzen in der Alterstraumatologie spielt auch die Seneszenz der Zellen - im Besonderen der Stammzellen - eine Rolle. Definitionsgemäß weisen Stammzellen ein unbegrenztes

Expansionsverhalten auf. *In vitro* kann dies auch sehr lange aufrechterhalten werden, jedoch gibt es in der Literatur Hinweise, die auf eine Abnahme des Proliferationsverhaltens verweisen. Dies betrifft dabei nicht nur die adulten Stammzellen, sondern auch Stammzellen embryonaler Herkunft, deren Expansionsabnahme im Vergleich zu adulten Stammzellvertretern jedoch deutlich später eintritt [Shi et al., 2005; Stenderup et al., 2003; Wuchter et al., 2010]. So wird in der Literatur von 400 erfolgreichen Populationsverdopplungen bei ESCs berichtet [Tuan et al., 2003]. Im Bereich der adulten Stammzellen beschreiben Bruder et al. ein Einsetzen der Zellseneszenz nach ungefähr 38-facher Verdopplung der Zellpopulationen bei BMSCs [Bruder et al., 1997].

Neben einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit der Stammzellen wird auch ein abnehmendes Differenzierungsverhalten mit zunehmendem Alter diskutiert. Auch hier macht sich dieses Phänomen bei adulten MSCs früher bemerkbar als bei ESCs [Bruder et al., 1997; Shi et al., 2005; Stenderup et al., 2003; Wuchter et al., 2010]. So weisen MSCs, die aus juvenilem Fettgewebe entnommen wurden, eine höhere adipogene Differenzierungskapazität auf als Stammzellen aus vergleichbarem Gewebe erwachsener Spender [Wabitsch 2000].

Dabei zeigte sich, dass Stammzellen mit Abnahme der Expansions- und Proliferationskapazität eine verkürzte Telomerlänge aufweisen und zudem Proteine wie p21 oder p35 hochreguliert waren, die in Zusammenhang mit der Zellseneszenz stehen [Boskey et al., 2010; Stolzing et al., 2008].

Um dieses Phänomen, das in *in vitro* Studien beobachtet wurde, zu vermeiden, werden verschiedene Wege eingeschlagen, um eine abnehmende Expansion dieser Stammzellen im Alter zu verhindern.

1.6.1.3.7 Ansätze zur Verlangsamung des Zellalters

Das Verhindern der Stammzellseneszenz stellt eine weitere Herausforderung für die regenerative Medizin dar. Doch auch hier gibt es inzwischen vielversprechende Ansätze, um zumindest ein Hinauszögern der Zellalterung zu bewirken.

Dabei geht ein Ansatz dahin, die Telomeraseaktivität fördernd zu beeinflussen [Simonsen et al., 2002]. So konnten unter anderem Wolbank et al. zeigen, dass mittels retroviral induzierter Überexpression der humanen Telomerase (hTERT) eine Steigerung der Proliferationskapazität bei gleichzeitig stabilem Differenzierungspotential erreicht werden kann [Shi et al., 2002; Simonsen et al., 2002; Wolbank et al., 2009].

Ein anderer Ansatz befasst sich mit der Auswirkung von veränderten Kulturbedingungen [Luu et al., 2007]. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Verwendung von 3D Strukturen in der Differenzierungsphase dar. Der Gedanke dahinter ist ein physiologischeres Wachsen der Zellen im Vergleich zu einer gängigen 2D Variante zu ermöglichen. Durch die Anordnung der Zellen auf und in der Struktur können vermehrt Zell-Zell-Kontakte gebildet werden und die Interaktion der Zellen wird gestärkt. Dies, so zeigt die Literatur, führt zu einer Verbesserung der Proliferation und Differenzierung in der Zellkultur [Diederichs et al., 2010; Gabbay et al., 2006; Suck et al., 2010; van Griensven et al., 2009].

2 Zielsetzung der Arbeit

Wie oben beschrieben stellen Ad-MSCs eine vielversprechende Zellart dar, um neue, erweiterte Therapieoptionen in der Unfallchirurgie entwickeln zu können. Sie kommen dabei besonders im Bereich von komplizierten Frakturen oder großen Defekten als Erweiterung der bisherigen Therapie zum Einsatz, um eine verbesserte, lokale Versorgung zu erzielen. Gerade im Bereich der Alterstraumatologie kommt es aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen häufig zu komplizierten Frakturen mit langwieriger Rehabilitation. Gerade hier wäre der Einsatz von erweiterten Therapiestrategien nötig, um Morbidität und Mortalität als Folgen der Frakturen zu minimieren. Jedoch würde die in Kapitel 1.6.1.3.6 angesprochene Verschlechterung des Proliferationsverhaltens und der Differenzierbarkeit der alten MSCs die Gruppe der Ad-MSCs als neue Therapieoption unbrauchbar machen.

Der Ansatz dieser Arbeit war es deshalb, die Validität der genannten Aussagen zur Differenzierbarkeit alter Spender zu prüfen und optimierte Bedingungen unter Verwendung einer 3D Kultivierung zu nutzen, um mögliche Verbesserungen hinsichtlich der osteogenen Differenzierung für Zellen auch von älteren Spendern zu generieren.

Dazu wurden Ad-MSCs von jungen und alten Spendern aus Fettgewebe isoliert, kultiviert und nachfolgend osteogen differenziert. Dies wurde für beide Gruppen sowohl in 2D also auch in 3D Kulturen durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurden primäre Osteoblasten isoliert, kultiviert und identisch zu den Ad-MSCs sowohl 2D als auch 3D osteogen differenziert.

Aus diesem Versuchsaufbau heraus wurde sowohl die osteogene Differenzierbarkeit von 2D und 3D Kulturen als auch von jungen und alten Spendern einander gegenübergestellt und analysiert.

Zusammengefasst wurden folgende Ziele für diese Arbeit definiert:

- Vergleich der osteogenen Differenzierung primärer Osteoblasten in 2D und 3D Kulturen hinsichtlich der Expressierung typischer osteogener Marker

- Vergleich der osteogenen Differenzierung junger und alter Ad-MSCs anhand der Expressierung typischer osteogener Marker
- Verwendung von 3D Kulturen zur Optimierung der osteogenen Differenzierung von insbesondere alten Ad-MSCs

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Eine Auflistung der Geräte findet sich in Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

Biophotometer + HELLMA tray cell	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biorevo Fluoreszenz-Mikroskop BZ- 9000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Feinwaage	Kern, Ballingen-Frommern, Deutschland
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gelelektrophoresegeräte	BioRad, Kalifornien, USA
Inkubator HERAcell 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Intas Gel iX Image Instrument	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Mastercycler® S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienzfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, München, Deutschland
Q-PCR CFX96	BioRad, Kalifornien, USA
Sterilwerkbank BDK-SB 1800	BDK, Sonnenbühl, Deutschland
Wasserbad inkl. Thermostat	Memmert, Schwabach, Deutschland
Schwenk-Inkubator	Neo-Lab, Heidelberg, Deutschland
Vortex Genie® 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Eine Liste der Verbrauchsmaterialien findet sich in Tabelle 3-2.

Tabelle 3-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen Inject®, 10, 20 ml 2-teilig	Braun, Melsungen, Deutschland
Multiwellplatten	PAA GmbH, Pasching, Österreich
6-Well Suspensionsplatten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße Multiply® - Strip	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten 5; 10, 25 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Alvatex®Scaffolds	Reinnervate, Sedgefield, England
Reaktionsgefäße 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 + 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 50 ml	BD Falcon, New Jersey, USA
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Einwegskalpelle, No. 10	Feather®, Osaka, Japan
Zellfilter 70 µm	BD Falcon, New Jersey, USA
Zellschaber, 20mm Lamelle	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturschalen 10cm ²	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturflaschen, steril 75 und 175°cm ²	PAA GmbH, Pasching, Österreich

3.1.3 Nährmedien und Zusätze

Eine Auflistung der Nährmedien und Zusätze stellt Tabelle 3-3 dar.

Tabelle 3-3: Verwendete Nährmedien und Zusätze

β-Glycerolphosphat Dinatriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid • 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMEM high glucose (4.5 g/L Glukose, 2 mM L-Glutamin)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMEM low glucose (1 g/L Glukose, 2 mM L-Glutamin)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DPBS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HEPES	PAA GmbH, Pasching, Österreich
L-Ascorbat-2-phosphat sesquimagnesium Salz Hydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pen / Strep (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin / EDTA	PAA GmbH, Pasching, Österreich

Abkürzungen Tabelle 3-3: Wasser (H₂O), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), fetal calf serum (FCS), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

3.1.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien zeigt Tabelle 3-4.

Tabelle 3-4: Verwendete Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	MRI Apotheke, München, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTP	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Echtblau Salz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
99,8% Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (70% / 96%)	MRI Apotheke, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FcR Block Reagenz, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
3,7% Formaldehyd Lösung	MRI Apotheke, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hexadecylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	MRI Apotheke, München, Deutschland
Kollagenase II	Biochrome, Berlin, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumchloridlösung 25 µM	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
99,9% Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Naphtol AS-M X Phosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
pUC 19 DNA Marker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10 x Reaktions-Puffer (Mg ²⁺ frei)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Sulforhodamin B Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
TRI Reagenz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,5% Trypan Blau	Biochrome, Berlin, Deutschland
2 • SsoFast EvaGreen Supermix	BioRad, Kalifornien, USA
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Abkürzungen Tabelle 3-4: Bovine Serum Albumin (BSA), Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP), Magnesiumchlorid (MgCl₂), Natriumhydroxid (NaOH), desoxyribonucleic acid (DNA), complementary desoxyribonucleic acid (cDNA)

3.1.5 Software

Tabelle 3-5 zeigt die verwendete Software.

Tabelle 3-5: Verwendete Software

BZ-II-Analyzer	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
BZ-II-Viewer	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
EndNote X6	Japone/ Team LnDL, Thomson Reuters, San Francisco, USA
Graph Pad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
OMEGA Software für FLUOstar, V1.10	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung, Kultivierung und Passagieren von Osteoblasten

Nach Zustimmung der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar und dem schriftlichen Einverständnis der vorher aufgeklärten Patienten wurden primäre Osteoblasten meist aus Hüftköpfen nach totalendoprothetischer Versorgung gewonnen und durch Anzucht und Passagieren vermehrt und gereinigt, so dass am Ende die gewünschte Zellart in möglichst großer Menge vorlag (Abbildung 3-1).

Insgesamt wurden für den gesamten Versuchsaufbau dieses Projektes primäre Osteoblasten von 8 verschiedenen Patienten (n=8) gewonnen; 6 (n=6) davon für Färbungen und Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) und zwei (n=2) für die Analyse der Ribonukleinsäure, im Folgenden abgekürzt als RNA (ribonucleid acid).

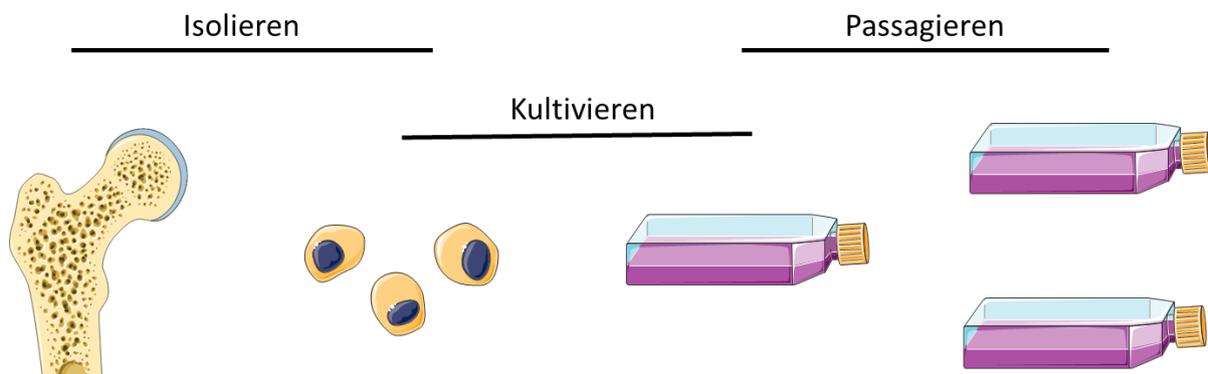


Abbildung 3-1: Isolation, Kultivierung und Passagieren von primären Osteoblasten.

Illustrationen: Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier - all rights reserved

Für die Isolation, Kultivierung und das Passagieren, gemäß standardisiertem Protokoll [Gallagher 2003], wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Es erfolgte die Entnahme des Knochens, in der Regel eines Femurkopfes, aus seiner sterilen Transportbox und Ablage des OP-Präparats auf sterilem Verpackungspapier der chirurgischen Handschuhe. Nun wurden mit Hilfe der Luer Zange Knorpelreste vom Femurkopf entfernt und anschließend der Knochen schrittweise zerkleinert, wobei die so entstandenen kleinen Knochenstücke in einem mit Dulbecco's Phosphate

Buffered Saline (DPBS) gefüllten 50 ml Röhren gesammelt wurden. Nach kurzem Waschen der Knochenfragmente wurde die überstehende Flüssigkeit aspiriert und den Knochenfragmenten erneut DPBS hinzugegeben, um diese erneut zu waschen. Dieser Vorgang wurde sofort wiederholt bis der flüssige Überstand klar erschien. Daraufhin wurden die gewaschenen Knochenfragmente auf kleine Zellkulturflaschen (75 cm²) gegeben und diese mit Osteoblasten-Kulturmedium (10% fetal calf serum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 50 µg/ml L-Ascorbat-2-Phosphat in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose) befüllt. Für die nächsten sieben Tage wurden die Zellkulturflaschen samt Inhalt bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und nicht bewegt. Nach Ablauf einer Woche wurde vorsichtig das Medium abgesaugt und frisches hinzugegeben, möglichst ohne die Lage der Knochenfragmente zu verändern. Dieser Vorgang wurde nach Ablauf einer weiteren Woche wiederholt, bis man in der Regel nach circa zwei Wochen die ersten Zellen auswachsen sehen konnte.

Für die weitere Zellkultivierung erfolgte der Mediumwechsel zweimal pro Woche. Bei Erreichen einer entsprechend dichten Besiedlung der Zellkulturflasche mit auswachsenden Zellen, konnten die Knochenfragmente aus der Kultur entfernt werden. Bei 80%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium aspiriert, die Zellen mit 20 ml, auf 37°C erwärmten, DPBS gewaschen und abhängig von der Flaschengröße mit 1-2 ml erwärmten Trypsin für 5–8 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das gewünschte Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und durch Klopfen mit der Hand gegen die Flaschenseite gegebenenfalls verstärkt. Nach erfolgter Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium, wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhren überführt. Das Zentrifugieren dieser Suspension bei 650 g für 10 min erzeugte am Boden des Röhrchens ein Zell-Pellet, welches nach Absaugen des flüssigen Überstandes in einer gewünschten Menge an Kulturmedium wieder resuspendiert wurde. Nach gutem Durchmischen der Zellen wurde die Suspension zu gleichen Teilen auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Eine mit Zellen dicht bewachsene Zellkulturflasche wurde auf zwei oder drei neue Flaschen aufgeteilt. Der Mediumwechsel erfolgte in der Regel zweimal pro Woche.

3.2.2 Isolation, Kultivierung und Passagieren von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe

Identisch zum Verfahren bei den primären Osteoblasten wurde, nach positiver Prüfung durch die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar und dem schriftlichen Einverständnis der aufgeklärten Patienten, bei Eingriffen in der Viszeralchirurgie oder auch der Plastischen Chirurgie, Fettgewebe von insgesamt 11 verschiedenen Patienten (n=11) entnommen. Davon wurden 6 Patienten (n=6), die unter 50 Jahre alt waren, der jungen Gruppe zugeteilt und die restlichen 5 Patienten (n=5), im Alter von über 50 Jahren, wurden dem alten Kollektiv zugeordnet. In der jungen Gruppe wurden 3 Patienten (n=3) zur Analyse der RNA und 3 weitere (n=3) für Färbungen und Bestimmung der AP-Aktivität verwendet. In der Gruppe der alten Patienten wurden ebenso 3 Patienten (n=3) für die Analyse der RNA und 2 (n=2) für Färbungen und die Bestimmung der AP-Aktivität eingeschlossen. Aus dem Fettgewebe wurden nach standardisiertem Verfahren [Schneider et al., 2017] MSCs isoliert, um im weiteren Verlauf durch Kultivierung und Passagieren eine möglichst große und homogene Zellmenge zu generieren (Abbildung 3-2).

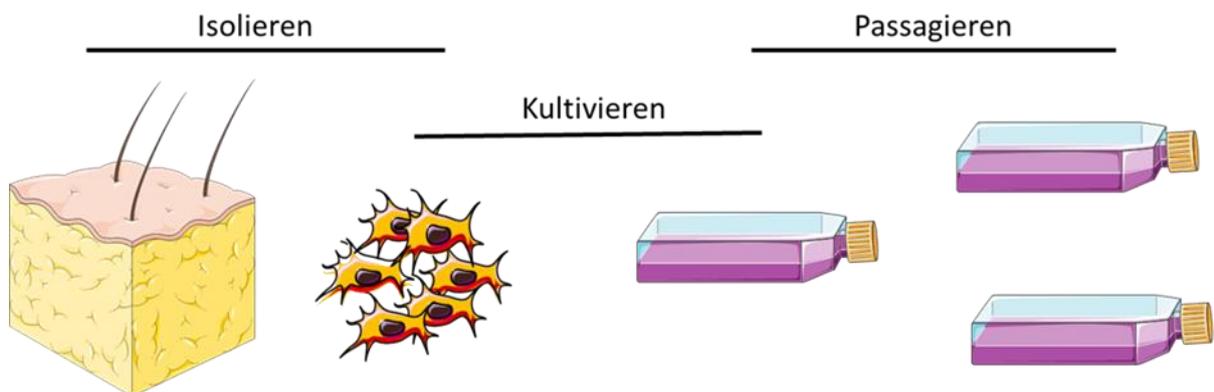


Abbildung 3-2: Isolation, Kultivierung und Passagieren von Ad-MSCs.
 Illustrationen: Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier - all rights reserved

Für die Isolation wurde eine sterile Kollagenase-Lösung, bestehend aus 2 mg Kollagenase II in 5 ml DPBS, hergestellt. Das Volumen letztgenannter richtete sich

nach der Menge des zu isolierenden Fettgewebes, grundsätzlich wurden 5,5 ml Kollagenase-Lösung pro 5 ml zerkleinertem Fettgewebe verwendet.

Das Fettgewebe wurde in eine Petrischale gegeben und dort unter Verwendung eines Skalpell oder einer Schere in kleine, Millimeter große, Stücke zerteilt. Danach erfolgte der Transfer von 10 ml des zerkleinerten Fettgewebes in ein bereitgestelltes 50 ml Röhrchen und Hinzugabe von 40 ml DPBS zum Waschen. Handelte es sich bei dem Fettgewebe um Material aus einer Liposuktion, so wurden 20–25 ml dieser direkt in ein 50 ml Röhrchen gegeben und dieses mit DPBS aufgefüllt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 430 g bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremsen zentrifugiert. Das oben schwimmende Fettgewebe wurde in ein neues 50 ml Röhrchen transferiert und dieses, erneut wie zuvor beschrieben mit DPBS gewaschen. Dieser Schritt wurde mehrere Male wiederholt, bis die Flüssigkeit klar erschien. Nach einer weiteren Überführung des Fettes in ein neues 50 ml Röhrchen wurde das entsprechende Volumen an Kollagenase-Lösung zugegeben und bei 37°C im Wasserbad für 30-40 min inkubiert. Alle 10 min erfolgte durch Bewegen des Röhrchens eine erneute Vermischung der Suspension. Nach visueller Kontrolle einer stattgefundenen Zersetzung des Fettgewebes wurde dieser Prozess durch Zugabe von auf 37°C erwärmtem Kulturmedium (10% FCS, 1% Pen/Strep in DMEM high glucose) gestoppt und nach kräftigem Mischen erfolgte das Zentrifugieren mit 600 g für 10 min mit Bremse. Die oben schwimmende Fettschicht wurde verworfen, der flüssige Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das am Boden liegende Zellpellet wurde mit 12 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch einen Zellfilter (Maschengröße 70 µm) in ein neues Röhrchen transferiert und von dort in eine Zellkulturflasche gegeben. Zum Abschluss der Isolation wurde noch das Volumen des Kulturmediums (10% FCS, 1% Pen/Strep in DMEM high glucose) in der Zell-Kulturflasche auf 25 ml aufgefüllt und es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂.

Am Tag nach der Isolation erfolgte der Mediumwechsel, der anschließend zweimal pro Woche durchgeführt wurde.

Nach Erreichen von 80%iger Konfluenz wurden die Zellen identisch zu den primären Osteoblasten gesplittet.

3.2.3 Auszählen

Ein genauer Kenntnisstand über die Menge der kultivierten Zellen war insbesondere zum Zeitpunkt des Ausplattierens notwendig, um die gewünschte Zellzahl auf die verschiedenen Zellkulturflaschen, 24-Well-Platten oder Scaffolds zu verteilen.

Dazu wurden zunächst wie oben beschrieben die Zellen unter Verwendung von Trypsin von ihren Kulturflaschen gelöst und in Suspension mit je nach Zellart passendem Kulturmedium gebracht.

Das Auszählen der Zellen erfolgte mittels Stichprobe der in Suspension befindlichen Zellen unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und einer 0,5%igen Trypan Blau Lösung in DPBS, um lebendige von abgestorbenen Zellen unterscheiden zu können. Anschließend konnte auf Grundlage der Stichprobe auf die Gesamtzahl der in Suspension befindlichen Zellen hochgerechnet werden.

3.2.4 Ausplattieren und Differenzieren

Die Zellen wurden bis in Passage zwei oder drei kultiviert und anschließend für die anstehende Differenzierung ausplattiert.

Um die kultivierten Zellen in 2D oder 3D Kultur osteogen zu differenzieren, wurden sie auf verschiedene Zellträger verteilt und zu definierten Zeitpunkten analysiert. Wie in Abbildung 3-3 schematisch dargestellt, erfolgte an Tag 0 sowohl in der 2D als auch in der 3D Differenzierung eine Auswertung der Färbungen und der RNA-Expression. Dies erfolgte ebenso an Tag 7. An Tag 3 beschränkte sich die Analyse auf die Auswertung der RNA-Expression, an Tag 14 auf die Auswertung der Färbungen.

	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 14
2D Färbungen				
2D RNA				
3D Färbungen				
3D RNA				

Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungen der osteogenen Differenzierung zu definierten Zeitpunkten in der 2D und 3D Differenzierung. In der 2D Färbung Verwendung von je 1-2 Wells der 24-Well-Platten, in der 3D Färbung Verwendung 1/4 bzw. 1/8 eines Scaffolds.

Illustrationen: Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier - all rights reserved

In der 2D Differenzierung wurden hierbei 24-Well-Platten für die Färbungen und die Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase (AP-Aktivität) oder kleine (75 cm²) Zellkulturflaschen für die osteogenen Marker verwendet, wohingegen für die 3D Differenzierung Scaffolds zum Einsatz kamen (Abbildung 3-5). Diese 200 µm dicken Polystyren Membran (Firma Reinnervate) kamen in zwei verschiedenen Größen (Ø 15 mm oder Ø 22 mm) zum Einsatz. Dabei weist die Membran eine Gitterstruktur mit 13 µm dünnen Stegen und dazwischen liegenden Hohlräumen, deren durchschnittlicher Durchmesser 40 µm beträgt, auf, was Zell-Zell-Kontakte großflächig erlaubt (Abbildung 3-4) [Reinnverate 2012].

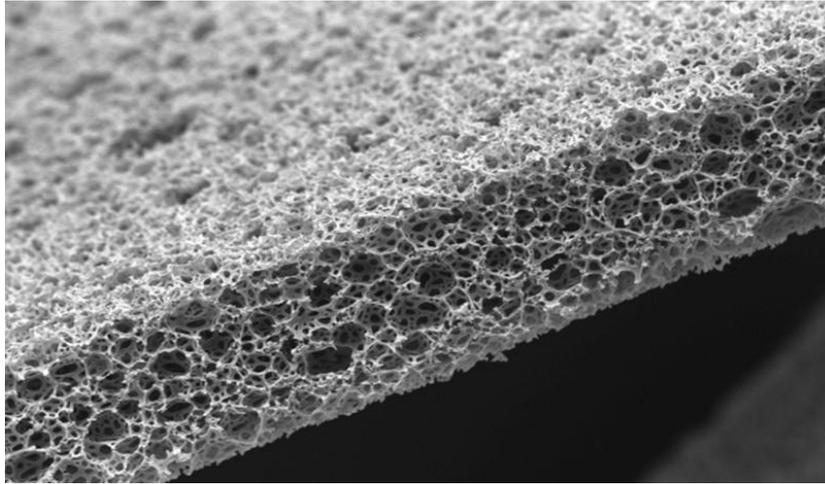


Abbildung 3-4: Mikroskopische Darstellung der Feinstruktur der verwendeten Scaffolds [Reinnervate 2014]

Abhängig von der Größe wurden auf einen kleinen Scaffold (\varnothing 15 mm) $1,0 \times 10^6$ oder auf einen großen Scaffold (\varnothing 22 mm) $1,5 \times 10^6$ Zellen gesät [Reinnverate 2012]. In der 2D Differenzierung wurden 10 000 Zellen/cm² ausgesät.

Vor der Besiedelung der Scaffolds wurden diese konditioniert. Dazu wurden sie mehrmals mit sterilem 70%igem Ethanol gespült und anschließend mit dem, der jeweiligen Zellart entsprechenden, Kulturmedium gewaschen. Während der Differenzierung wurden die 3D Strukturen beider Durchmesser mit ihren Plastikrahmen in 6-Well-Suspensionsplatten gehängt (Abbildung 3-5) [Reinnverate 2012].



Abbildung 3-5: Scaffolds in Plastikrahmen zum Einhängen in 6-Well-Suspensionsplatten.
[Reinnervate 2014]

Zellen, die für einen Scaffold bestimmt waren, wurden in entsprechender Anzahl in 100 μ l (kleiner Scaffold) oder 150 μ l (großer Scaffold) Medium in Suspension gebracht, auf den vorbereiteten Scaffold aufgetragen und für 2 Stunden im Inkubator belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Well mit dem enthaltenen Scaffold mit 8 ml Kulturmedium aufgefüllt [Reinnervate 2012].

Nach 24 Stunden wurden die für Tag 0 bestimmten Zellen den verschiedenen Nachweismethoden unterzogen. Die restlichen Zellen (Tag 3, 7 oder 14) wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (5% FCS, 1% Pen/Strep, 10 mM β -Glycerolphosphat, 1,56 mM Kalziumchlorid (CaCl_2), 100 nM Dexamethason, 0,025 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 0,2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat in DMEM low glucose), welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde, inkubiert [Gallagher 2003].

In Abbildung 3-6 ist ein Nachweisschema exemplarisch für Tag 0 und 7 dargestellt. Für die Färbungen und die Aktivitätsbestimmung der AP wurde in der 3D Differenzierung je ein Viertel eines großen Scaffolds (\varnothing 22 mm) pro Zeitpunkt verwendet, wobei für die Immunfluoreszenzfärbung nur 1/8 des Scaffolds für Osteocalcin (OC) und 1/8 für Osteoprotegerin (OPG) und Kollagen I (COL I) verwendet wurde. Im 2D Bereich erfolgte die Datenerfassung für die oben genannten Nachweismethoden in Zweifachbestimmung beziehungsweise bei der

Immunfluoreszenzfärbung jeweils in einfacher Bestimmung für OC und für OPG/ COL I.

Die Analyse der Boten-Ribonukleinsäure, im weiteren Text bezeichnet mit mRNA (messenger ribonucleic acid), erfolgte nach Differenzierung auf einem ganzen Scaffold, beziehungsweise einer 75 cm² Kulturflasche.

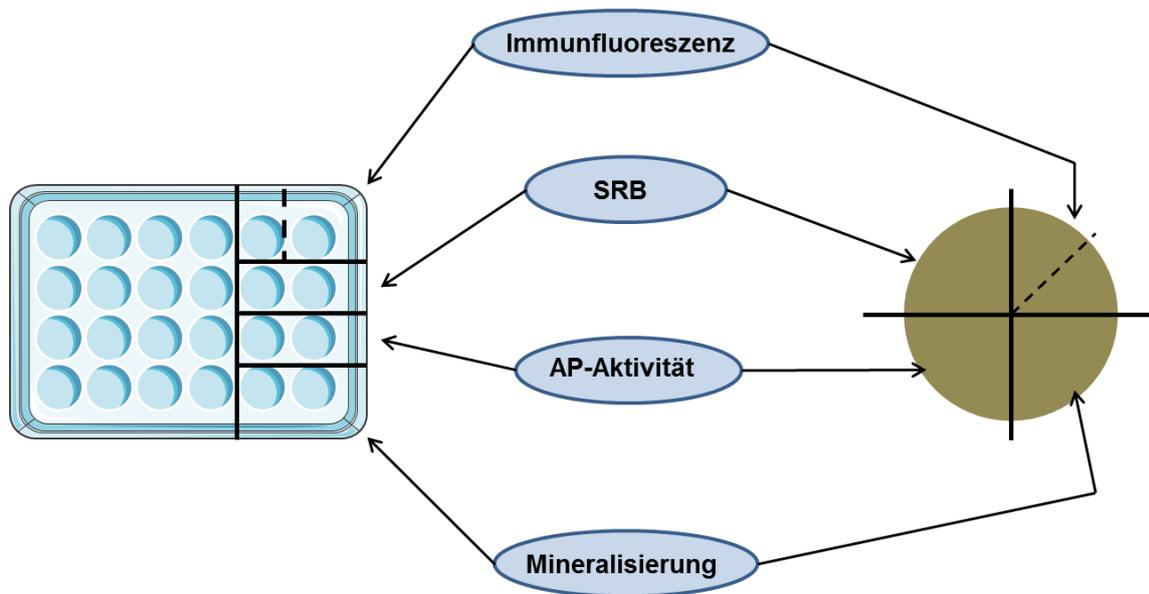


Abbildung 3-6: Nachweisschema der 2D und 3D Differenzierung für einen Zeitpunkt . Im 2D Bereich wurden für jede Nachweismethode 2 Wells mit Zellen besiedelt (links) im 3D Bereich wurde je ein Viertel des Scaffolds verwendet (rechts). Lediglich die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nur in je einem Well bzw. auf 1/8 des Scaffolds.

Illustrationen: Copyright © 2006, Les Laboratoires Servier - all rights reserved

3.2.5 Alkalische Phosphatase Aktivität

Grundsätzliche Aufgabe der Alkalischen Phosphatase (AP) ist die Abspaltung von Phosphatgruppen. Dies dient als Grundlage bei der Aktivitätsbestimmung, indem das farblose 4-Nitrophenyl Phosphat Di-Natrium Hexahydrat als Substrat verwendet wird. Durch Anwesenheit des Enzyms AP kommt es durch Hydrolyse zu dem Produkt p-Nitrophenol und zu einem Farbumschlag. Je mehr AP vorhanden, umso stärker der messbare Farbumschlag. Das Enzym AP wird unter anderem in Osteoblasten exprimiert. Somit kann die Aktivitätsbestimmung zur Charakterisierung dieser Zellen

und zur Analyse der osteogenen Differenzierung verwendet werden. Die Bestimmung der AP-Aktivität erfolgte wie von Ehnert et al. [Ehnert et al., 2011] beschrieben.

Mit Hilfe des 0,1 M AP Puffers (50 mM Glycin, 100 mM Tris-Base, 2 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), pH 10,5) erfolgte die Herstellung der AP Substrat Lösung. Hierfür wurden 3,5 mM 4-Nitrophenyl Phosphat Di-Natrium Hexahydrat Salz in 1 ml 0,1 M AP Puffer gelöst. Die Zellen, beziehungsweise die geviertelten Scaffolds, wurden in 24-Well-Platten gefärbt, wobei je Well, nach zweimaligen Waschen mit PBS, 500 μ l der AP Substrat Lösung zugesetzt wurde. Anschließend erfolgte für 30 Minuten bei 37°C die Inkubation. Als Blindwert diente AP Substrat Lösung ohne Zellen. Während der Inkubationszeit konnte die erforderliche Standardkurve vorbereitet werden.

Dafür wurden 900 μ l 0,1 M AP Puffer und 100 μ l 10 mM 4-Nitrophenol Lösung als Ausgangskonzentration gemischt. Aus dieser erfolgte eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 0,1 M AP Puffer, so dass die höchste Konzentration 0,139 mg/ml und die niedrigste 0,001 mg/ml der 10 mM 4-Nitrophenol Lösung war. Die so entstandene Verdünnungsreihe wurde auf eine 96-Well-Platte mit je 100 μ l pro Well in dreifacher Bestimmung übertragen. Als Negativkontrolle diente der 0,1 M AP Puffer. Auf die gleiche Platte wurde, nach erfolgter Inkubation, auch die entstandene Reaktionslösung der Zellen in dreifacher Bestimmung zu je 100 μ l pro Well übertragen. Um die erfolgte Reaktion zu quantifizieren, wurde nun die Absorption der Reaktionslösung bei 405 nm mittels Mikroplatten-Reader gemessen. Die gemessene p-Nitrophenol Konzentration wurde in Bezug auf die Standardreihe kalkuliert und auf den Proteingehalt normiert.

3.2.6 Alkalische Phosphatase Färbung

Bei dieser Färbung wurden die Zellen mit einem Diazonium-Salz und einem aromatischen Phosphorsäureester inkubiert. AP verursacht dabei eine Überführung des aromatischen Phosphorsäureesters durch Hydrolysierung in einen aromatischen Alkohol, der in Verbindung mit dem Diazonium-Salz zu einem blauvioletten Farbniederschlag führt (Abbildung 3-7) [Schmidt 1993]. Die Färbung wurde gemäß

der Verfahrensbeschreibung von Wildemann et al. [Wildemann et al., 2007] durchgeführt.

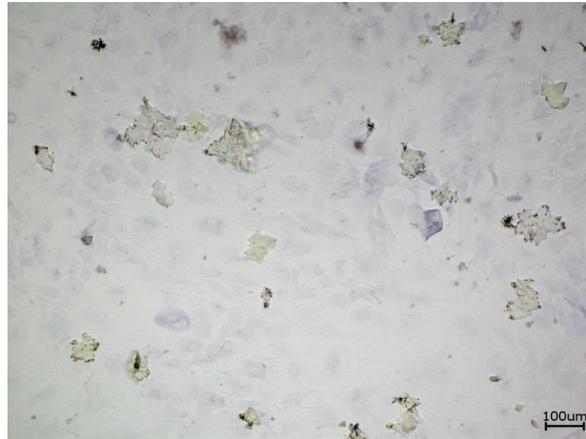


Abbildung 3-7: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs (adipose-derived mesenchymal stem cells). Es ist eine blauviolette Verfärbung der Zellen zu erkennen.

Zu Beginn wurden drei Lösungen hergestellt. Einerseits ein 0,1 M Tris-Puffer in dH_2O mit einem pH-Wert von 8,5. Als zweite Lösung wurde ein AP Färbe-Puffer (0,5% Dimethylformamid, 2 mM MgCl_2 in 0,1 M Tris-Puffer) mit dem gleichen pH-Wert benötigt. Zuletzt erforderte die Färbung noch eine AP Färbe-Lösung (0,06% Echtblau Salz, 0,01% Naphtol-AS-MX-Phosphat in AP Färbe-Puffer), die für jede Färbung frisch zubereitet werden musste. Zu den Zellen wurden, nach Waschen mit DPBS und 10 minütiger Fixierung mittels Formaldehyd (3,7%), je Well 500 μl Färbe-Lösung gegeben.

Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen und mit Formaldehyd (3,7%) für 10 Minuten bei RT fixiert. Nachfolgend wurde die Inkubation für 30 Minuten bei 37°C mit der AP Färbe-Lösung durchgeführt. Nach abgelaufener Inkubationszeit erfolgte zum letzten Mal das Waschen der Zellen mit DPBS, woraufhin anschließend eine Betrachtung der positiven, blau gefärbten Zellen unter Verwendung des Lichtmikroskops erfolgte.

3.2.7 Alizarin Rot Färbung

Die Alizarin Rot (AR) Färbung findet Anwendung, um die Mineralisierung von Zellen nachzuweisen. Als Grundlage hierfür dient die Eigenschaft von Alizarin an Kalzium zu binden und dabei eine ultraviolette Färbung zu verursachen. Die AR-Färbung erfolgte nach Vorgabe von Stanford et al. [Stanford et al., 1995].

Für die Färbung wurde eine 0,5% Alizarin Rot Färbelösung in dH₂O, pH 4 und eine 10%ige Hexadecylpyridiniumchlorid Lösung (10 mM Natrium Phosphat, pH 7 in dH₂O) vorbereitet.

Die Zellen wurden für diese Färbung zunächst mit eiskaltem Ethanol (96%) für eine halbe Stunde fixiert. Nach der Fixation erfolgte zweimal eine Spülung der Zellen mit dH₂O, woraufhin 400 µl der Alizarin Rot Färbelösung je Well zugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT wurden die Zellen nun viermal, alle fünf Minuten, erneut mit dH₂O gewaschen und der Farbstoff mit 400 µl der Hexadecylpyridiniumchlorid Lösung gelöst. Diese wurde für 10-20 Minuten bei RT auf den Zellen belassen, bis sich die gebundene Farbe komplett gelöst hatte, um anschließend je 100 µl pro Well in dreifacher Bestimmung auf eine 96-Well-Platte zu übertragen und die Absorption bei 562 nm mittels Mikroplatten-Reader zu vermessen.

Für die Standardkurve wurden je 500 µl 0,5% Alizarin Rot Färbelösung und Hexadecylpyridiniumchlorid Lösung gemischt. Die so entstandene Lösung wurde neunmal mit der Hexadecylpyridiniumchlorid Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt, so dass eine Verdünnungsreihe mit der höchsten Konzentration von 2,5 mg/ml der Alizarin Rot Färbelösung bis zu einer Konzentration von 0,005 mg/ml entstand. Anschließend wurde die Standardreihe auf eine 96-Well-Platte zu je 100 µl pro Well in dreifach Bestimmung und unverdünnte 10%ige Hexadecylpyridiniumchlorid Lösung als Negativkontrolle übertragen und vermessen.

Die gemessene Alizarin Rot Konzentration wurde nun mit Hilfe der Standardkurve berechnet und im Bezug zum gemessenen Proteingehalt gesetzt.

3.2.8 Sulforhodamin B-Färbung

Aufgrund der Eigenschaft dieser Färbung, an Zellproteine zu binden, wurde diese Methode verwendet, um Rückschlüsse auf die Zellzahl und Zelldichte zu erhalten. Dabei wurde gemäß Protokoll [Voigt 2005] vorgegangen. Auf die erhaltenen Ergebnisse der Sulforhodamin B (SRB)-Bestimmung konnten die AR-Färbung oder die AP-Aktivität normiert werden.

Für diese Färbung wurden die SRB Lösung (0,4% SRB in 1%iger Essigsäure) und die 10 mM ungepufferte TRIS Lösung (10 mM TRIS in dH₂O, pH von 10–10,5) vorbereitet.

Als erster Schritt wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und diese mit DPBS gewaschen. Nach Entfernen des DPBS wurden die Zellen unter dem Abzug mit Methanol für 15 min bei RT fixiert. Daraufhin erfolgte die Färbung mit der SRB-Lösung für 30 min bei RT auf dem Schwenk-Inkubator. Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen mit Essigsäure (1%) mehrmals gewaschen, um zu verhindern, dass ungebundene Färbereste zurückblieben. Besonders häufig musste dieser Schritt bei der Färbung des Scaffolds erfolgen. Für die Ermittlung des gebundenen Farbstoffs wurde dieser für 15 min mit der 10 mM ungepufferten TRIS Lösung bei RT herausgelöst. Der nun gelöste Farbstoff wurde in dreifacher Bestimmung auf eine 96-Well-Platte gegeben und die spezifische optische Dichte (OD) der SRB-Färbung bei $\lambda = 565 \text{ nm}$ und die unspezifische Absorption, die durch Störeinflüsse der Umgebung wie z.B. Kratzer im Plastikrahmen verursacht wurde, bei $\lambda = 690 \text{ nm}$ gemessen. Aus der Differenz der beiden OD-Messungen ($OD_{565 \text{ nm}} - OD_{690 \text{ nm}}$) konnte der Proteingehalt abhängig von der Zellart unter Verwendung der Formel:

- Proteingehalt = $(OD - 0,021) / 0,0197$ bei Ad-MSCs bzw.
- Proteingehalt = $(OD - 0,036) / 0,0360$ bei Osteoblasten

kalkuliert werden.

3.2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis der erfolgten osteogenen Differenzierung wurden neben der Analyse der mRNA und der oben beschriebenen Färbungen zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen auf bestimmte osteogene Marker durchgeführt.

Dazu wurde zunächst der mit Zellen besiedelte Scaffold geviertelt und ein Viertel sowie die Zellen in 2D mit 3,7% Formaldehyd fixiert.

Während der Fixation wurden verschiedene Lösungen vorbereitet: eine 0,02% Bovine Serum Albumin (BSA) - Lösung in DPBS, eine 0,2% Triton-X 100 in DPBS und eine Block-Lösung (1% BSA, 0,2% Triton-X 100 in DPBS). Nach der Fixation der Zellen wurden diese zunächst dreimal mit der Waschlösung gewaschen und mit der 0,2% Triton-X Lösung für 15 min bei RT inkubiert, worauf wieder ein dreimaliger Waschgang mit der Waschlösung erfolgte. Anschließend wurde die Blocklösung für 15 min bei RT auf die Zellen gegeben und pro Well zusätzlich noch 7 µl des FcR humanen Block Reagenz hinzugefügt, um die Spezifität der Antikörperbindung zu erhöhen [Miltenyi Biotec 2014]. Vor der Verwendung der Erstantikörper, die in Tabelle 3-6 aufgeführt sind, wurden diese in der BSA-Lösung verdünnt (1:200). Daraufhin wurden 250 µl dieser Lösung pro Well pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen der Zellen mit der BSA-Lösung, um anschließend in jedes Well 250 µl des Zweitantikörpers zu geben (siehe Tabelle 3-7) und diesen ohne Lichteinfluss für eine Stunde bei RT zu inkubieren.

Tabelle 3-6: Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Größe [kD]	Firma
OPG	Kaninchen IgG1	1:200	46	Gene Tex, Irvine, USA
OC	Kaninchen IgG1	1:200	22	Millipore, Billerica, USA
COL I	Maus IgG1	1:200	130-140	Abcam, Cambridge, England

Abkürzungen Tabelle 3-6: Osteoprotegerin (OPG), Osteocalcin (OC) und Kollagen I (COL I)

Tabelle 3-7: Verwendete Zweitantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege anti Maus IgG1	1:800	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ziege anti Kaninchen IgG1	1:800	Invitrogen, Carlsbad, USA

Während der letzten 15 min dieser Einwirkungsphase wurde jedem Well Hoechst Lösung (1:1000 DPBS/BSA) zur Anfärbung der Zellkerne hinzugegeben. Zum Abschluss der Färbung erfolgte ein dreimaliges Waschen mit anschließender mikroskopischer Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop.

3.2.10 RNA Isolation

Nach Zugabe von TRI Reagenz zu den Zellen wurden diese bei -80°C für mindestens einen Tag eingefroren. Genauso wurde mit dem Scaffold verfahren. Anschließend erfolgte die Isolation nach Chomczynski und Sacchi [Chomczynski 1993]. Dabei entstanden durch Verwendung von Chloroform neben einer oben aufliegenden, wässrigen Phase, eine unten befindliche organische Phase und die dazwischen liegende Interphase, wobei in den letztgenannten beiden Phasen die denaturierten Proteine enthalten waren. Die wässrige Phase dagegen enthielt die RNA.

Zur erfolgreichen Isolation war es notwendig, zu jeder Zeit Handschuhe zu tragen und die Proben stets zu kühlen.

Die Isolation selbst begann mit dem Absaugen des Kulturmediums von den Zellen und der Zugabe von 1 ml TRI Reagenz auf einen Scaffold, bzw. 1 ml desselben Reagenz auf Zellen in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche. Anschließend wurden die Zellen im Gefrierschrank bei -80°C eingefroren, wobei sich die Scaffolds in 6-Well-Platten befanden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellkratzer in der Zellkulturflasche in einer Ecke gesammelt und die entstandene Suspension in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß eingefüllt. Zwischen verschiedenen Proben wurde der Zellkratzer mit 10 mM Natriumhydroxid (NaOH) gereinigt. Die Scaffolds wurden nach dem Auftauen mit Hilfe einer 1000 μl Pipette mehrmals von beiden Seiten mit dem aufgetauten TRI Reagenz gespült und anschließend wurde auch hier die entstandene Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Diese wurden für 5 min auf Eis gekühlt um anschließend pro 500 μl TRI Reagenz 100 μl Chloroform der Suspension hinzuzufügen. Vor und nach dem nun folgenden, erneuten Kühlen auf Eis für 10 min wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße gründlich gemischt und

anschließend bei 14.000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurden erneut je 500 µl verwendetem TRI Reagenz, 250 µl Isopropanol in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die nach dem Zentrifugieren entstandene obere, wässrige Phase hinzugefügt. Es folgte ein vorsichtiges Schwenken und ein wiederholtes Kühlen auf Eis für 10 min. Erneutes Zentrifugieren mit 14.000 g für 10 min bei 4°C und darauffolgendes, vorsichtiges Dekantieren des flüssigen Überstandes waren die nächsten Schritte. Zum Reinigen des RNA-Pellets wurde dieses zweimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße nun offen stehen gelassen um das Verdampfen des Alkohols zu ermöglichen. Nach 5 min wurden die entstandenen RNA-Pellets mit 30 µl aqua ad iniectabilia resuspendiert.

3.2.11 RNA-Vermessung und Nachweis der RNA-Integrität

Nach der RNA-Isolation erfolgte die spektralphotometrische Vermessung der RNA-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm, zur Bestimmung der Reinheit der Probe. Basierend darauf konnte die RNA-Konzentration berechnet werden.

Vor dem Umschreiben der RNA wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese, gemäß dem Protokoll von Chomczynski et al. [Chomczynski 1993], die Integrität dieser überprüft.

Dazu wurde zunächst ein Ethidiumbromid haltiges 1,5% Agarose Gel in 1x TBE Puffer (0,09 M TRIS, 0,09 M Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3 in dH₂O) gegossen.

Unter Verwendung der gemessenen RNA-Konzentrationen wurden 0,5 µg der RNA-Proben mit 5 µl des 5x Ladepuffers (0,005% Bromophenol Blau, 10% Glycerol in 5x TBE) in einem Endvolumen von 20 µl aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe diente der pUC 19 Marker. Die Elektrophorese wurde bei 90 V für 40 min durchgeführt. Die auf dem Gel entstandenen Banden wurden mit Hilfe des INTAS Gel Doc Systems sichtbar gemacht und gaben somit Aufschluss über die Vollständigkeit der isolierten RNA, wie in Abbildung 3-8 dargestellt.

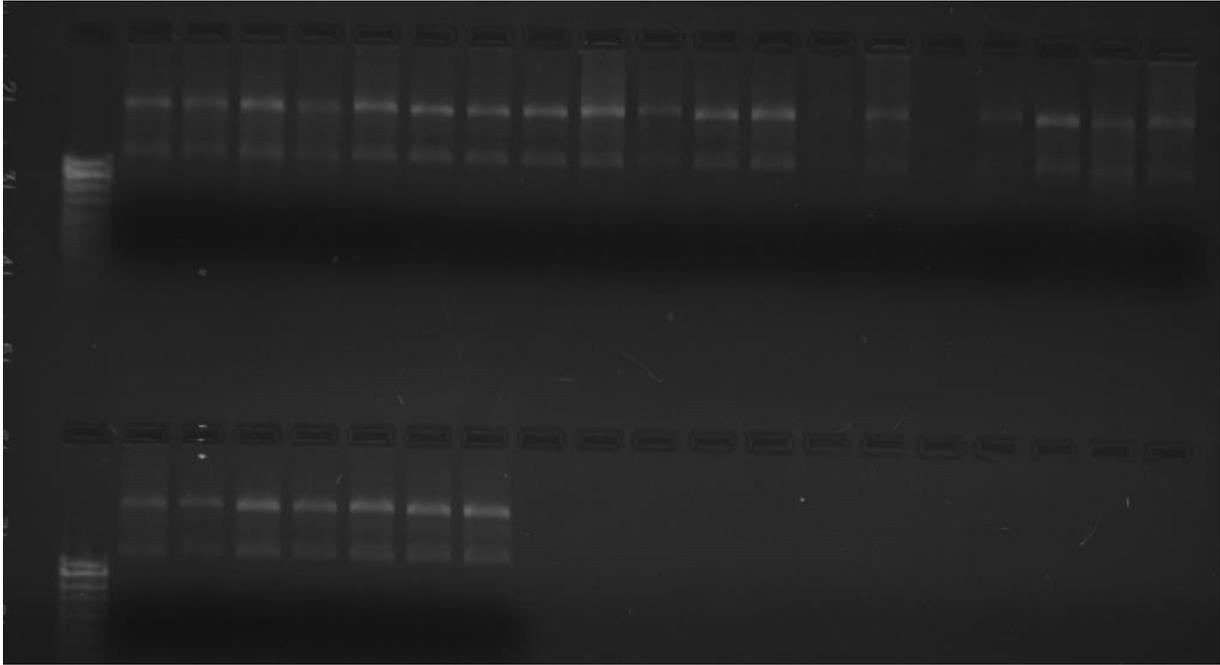


Abbildung 3-8: Darstellung einer abgelaufenen Gelelektrophorese zur Überprüfung der Vollständigkeit der isolierten RNA. Typisch für eine intakte RNA sind zwei getrennte ribosomale Banden pro Spur, wie hier zu sehen.

3.2.12 Synthese der komplementären DNA

Ziel dieser Methode, die wie von Wiame et al. [Wiame et al., 2000] beschrieben durchgeführt wurde, ist es, nach Vorlage der isolierten mRNA eine entsprechende komplementäre Desoxyribonukleinsäure, im Weiteren als cDNA (complementary desoxyribonucleic acid) bezeichnet, zu transkribieren, die im weiteren Verlauf als Grundlage für Polymerase-Ketten-Reaktionen, nachfolgend als PCR (polymerase chain reaction) abgekürzt, verwendet werden kann. Zur Stabilisation tragen die meisten mRNAs an einem Ende eine vielfache Basenwiederholung mit Adenosin (poly A). Diese Region dient bei der Transkription als Bindestelle für die benötigten Primer, was dazu führt, dass nur die mRNA-Sequenz umgeschrieben wird.

Es wurden 2 µg RNA in PCR Röhrcchen vorgelegt und je 1 µl oligo(dT)₁₈-Primer und Random Hexamer Primer zugegeben. Anschließend wurden die Röhrcchen mit aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt und in den Thermocycler gestellt. Nach Anlaufen der standardisierten RNA Transkription bei 65°C, wurde diese nach 5 min gestoppt und je 9 µl des Master Mix mit reverser Transkriptase zu

jeder Probe hinzugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde die cDNA Synthese bei 37°C für 60 min fortgesetzt, gefolgt von einem abschließenden Erhitzen der Proben auf 70°C für 5 min.

Die umgeschriebenen cDNA Proben wurden im Anschluss mit aqua ad iniectabilia bis zu einer Endkonzentration von 10 ng/µl verdünnt und bei -20°C eingefroren.

3.2.13 Genexpressionsanalyse mittels Real Time-PCR

Im Verlauf der Genexpressionsanalyse stellte die Real Time-PCR (RT-PCR) eine wichtige Rolle dar. Diese wurde nach dem Protokoll von Bonetta [Bonetta 2005] durchgeführt. Nachdem in den zuvor beschriebenen Schritten die RNA isoliert, vermessen und mit Hilfe der reversen Transkription zu cDNA umgeschrieben worden war, wurde mittels RT-PCR die Expression bestimmter Gene ermittelt. Die PCR läuft normalerweise in 3 Schritten ab, die sich zu einem Zyklus zusammensetzen, welcher mehrmals (35 – 40-mal) wiederholt wird.

Nach Vorlegen von je 50 ng cDNA wurde der Master Mix gemischt und anschließend zu je 15 µl auf die Proben verteilt. Das Volumen und die Zusammensetzung des Master Mix ist in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8: Zusammensetzung des Master Mix

Reaktionspuffer	2 µl
MgCl ₂	1,5 µl
Vorwärts- & Rückwärtsprimer	je 1 µl
10 mM dNTP Mix	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	0,1 µl
aqua ad iniectabilia	(20-(6,1 + template cDNA))

Abkürzungen Tabelle 3-8: Magnesiumchlorid (MgCl₂), Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP), desoxyribonucleic acid (DNA), complementary desoxyribonucleic acid (cDNA)

Eine Auflistung der verwendeten RT-PCR Primer zeigt Tabelle 3-9.

Tabelle 3-9: Verwendete RT-PCR-Primer

Gen	Vorwärtsprimer 5' → 3'	Rückwärtsprimer 5' → 3'	Annealing [°C]	[bp]
OC	CCAGCGGTGCAGAGTCCAG C	GACACCCTAGACCGGGCCGT	60	236
OP	CTCCATTGACTCGAACGACT C	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG	60	257
AP	CTGGGCTCCAGGGATAAAG C	TCAGTGTCTCTTGCGCTTGG	60	149
OPG	CCGGAACAGTGAATCAAC TC	AGGTTAGCATGTCCAATGTG	60	313
COL I	AGCGGACGCTAACCCCTC C	CAGACGGGACAGCACTCGCC	60	340
GAPDH	AATTGAGCCCGCAGCCTCC C	TCGGCTGGCGACGCAAAGA	60	82

Abkürzungen Tabelle 3-9: Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP), Alkalische Phosphatase (AP), Osteoprotegerin (OPG), Kollagen I (COL I) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Zu Beginn eines Zyklus wurden die Proben erhitzt, um die Doppelstrangstruktur der cDNA zu lösen. Anschließend erfolgte die Primeranlagerung. Den letzten Zyklusschritt stellte die primerabhängige Strangverlängerung durch die Taq Polymerase dar (Abbildung 3-9).

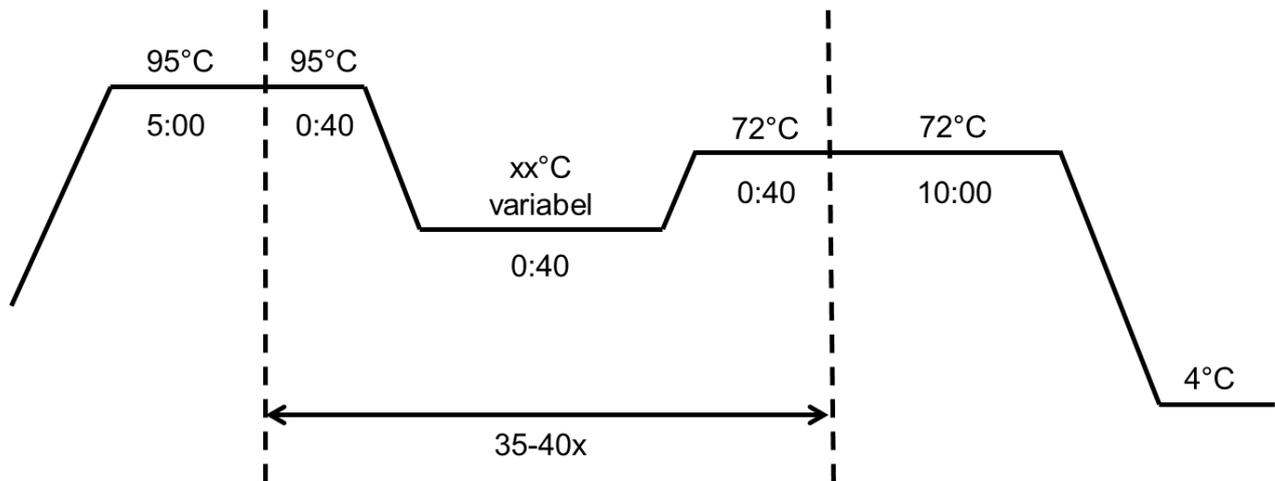


Abbildung 3-9: Schematischer Ablauf der RealTime-PCR nach Protokoll von Bonetta [Bonetta 2005].

Dabei folgt nach anfänglichem Erhitzen der Proben auf 95°C die Primeranlagerung, bei variabler Temperatur, gefolgt von einem Temperaturanstieg auf 72°C, wobei die Strangverlängerung erfolgt. Insgesamt wird dieser Zyklus 35 – 40-mal durchlaufen. Zum Abschluss der PCR bleibt die Temperatur für 10 min bei 72°C bestehen, gefolgt von einem abschließenden Temperaturabfall auf 4°C. Pro Zyklus dauern die Strangdenaturierung, die Primeranlagerung und Strangverlängerung jeweils 40 Sekunden.

Die Messung erfolgte in zweifacher Bestimmung.

Um die abgelaufene Reaktion quantifizieren zu können, wurde die Gelelektrophorese verwendet, wobei die PCR Proben mit 12 µl 5x Ladepuffer vermischt wurden und auf das Agarose-Gel gegeben wurden. Als Größenmarker dienen 3 µl des pUC 19. Die Elektrophorese wurde bei 90 V für 40 min durchgeführt, worauf die photographische Auswertung der Gelbanden unter Normierung auf das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit Hilfe des INTAS Gel Doc Systems erfolgte.

3.2.14 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer PCR

Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung von Genexpression stellt die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion, nachfolgend als qPCR (quantitative polymerase chain reaction) bezeichnet, dar. Diese wurde gemäß dem Protokoll von Morin et al. [Morin et al., 1995] durchgeführt. Der Mechanismus dieser Methode ist in Abbildung 3-10 dargestellt und beruht auf einem Farbstoff (SYBR Green), welcher bei Interkalierung in einen DNA Doppelstrang leuchtet. Je mehr Doppelstrang - DNA in der Reaktion

vorhanden ist, umso mehr Farbstoff kann gebunden werden und umso stärker wird das in jedem Zyklus gemessene Farbsignal. Von diesem wird anschließend auf die DNA Konzentration geschlossen. Die Analyse der Schmelzkurve ist notwendig, um die Reinheit und Spezifität des PCR-Produktes zu überprüfen. Bei einem reinen PCR-Produkt wird ein gemeinsamer Peak im Verlauf der Schmelzkurve als Reaktion auf die Auflösung der Doppelstrang Konfiguration bei einer spezifischen Temperatur erwartet. Der Peak entsteht durch die Freisetzung des Farbstoffes aus dem aufgelösten Doppelstrang bei Erreichen der notwendigen Temperatur [Köllmer et al., 2013; Morin et al., 1995].

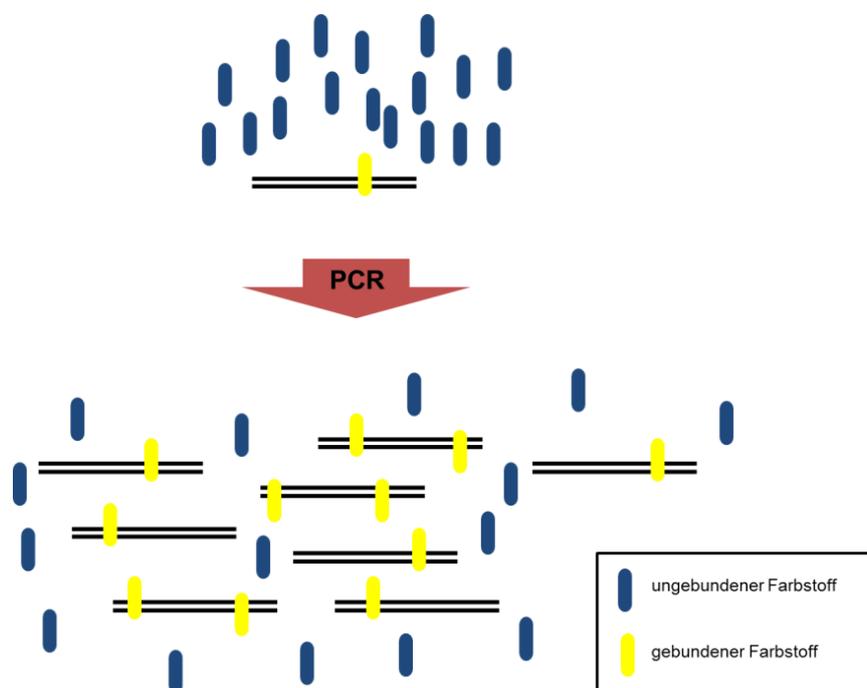


Abbildung 3-10: Schematische Funktionsweise der qPCR . Die Bindung an Doppelstrang-DNA führt zu einem Leuchten des gebundenen Farbstoffs – modifiziert nach [Bio-Rad Laboratories 2016]

Nach dem Erstellen des gewünschten Ablaufs der PCR und der Planung des Plattendesigns wurde ein Master Mix erstellt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

- SYBR Green 5 µl
- Vorwärts- & Rückwärtsprimer je 0,4 µl
- aqua ad iniectabilia 1,2 µl

Je 9 µl dieser Lösung wurden zu 30 ng cDNA Probe pipettiert.
Eine Auflistung der verwendeten Primer ist in Tabelle 3-10 zu sehen.

Tabelle 3-10: Verwendete qPCR-Primer

Gen	Vorwärtsprimer 5' → 3'	Rückwärtsprimer 5' → 3'	Accession number
OC	CCAGCGGTGCAGAGTCCAGC	GACACCCTAGACCGGGCCGT	NM-199173.3
OP	CTCCATTGACTCGAACGACTC	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG	NM-000582
AP	CTGGGCTCCAGGGATAAAGC	TCAGTGTCTCTTGCGCTTGG	NM-000478.4
OPG	CCGGAAACAGTGAATCAACTC	AGGTTAGCATGTCCAATGTG	NM-002546.3
COL I	AGCGGACGCTAACCCCTCC	CAGACGGGACAGCACTCGCC	NM-000088.3
β-Tub	GAGGGCGAGGACGAGGCTTA	TCTAACAGAGGCCAAAAGTGGCACC	NM-001069.2

Abkürzungen Tabelle 3-10: Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP), Alkalische Phosphatase (AP), Osteoprotegerin (OPG), Kollagen I (COL I) und β-Tubulin (β-Tub), quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Entsprechend des Ablaufs der PCR wurden im ersten Schritt die Doppelstrang Konfiguration der cDNA durch Erhitzen aufgelöst. Daraufhin wurde die Temperatur spezifisch auf die verwendeten Primer abgestimmt, um ein Anlagern derselben an den komplementären Abschnitten der DNA zu ermöglichen und damit eine Doppelstrangbildung zu ermöglichen. Nach einer ersten Datenerfassung wurden diese Schritte 38-mal wiederholt.

Anschließend erfolgte durch Abkühlen der Proben das Erstellen der Schmelzkurve mit erneuter Datenerfassung, gefolgt von erneutem Erhitzen der Proben. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 3-11 dargestellt.

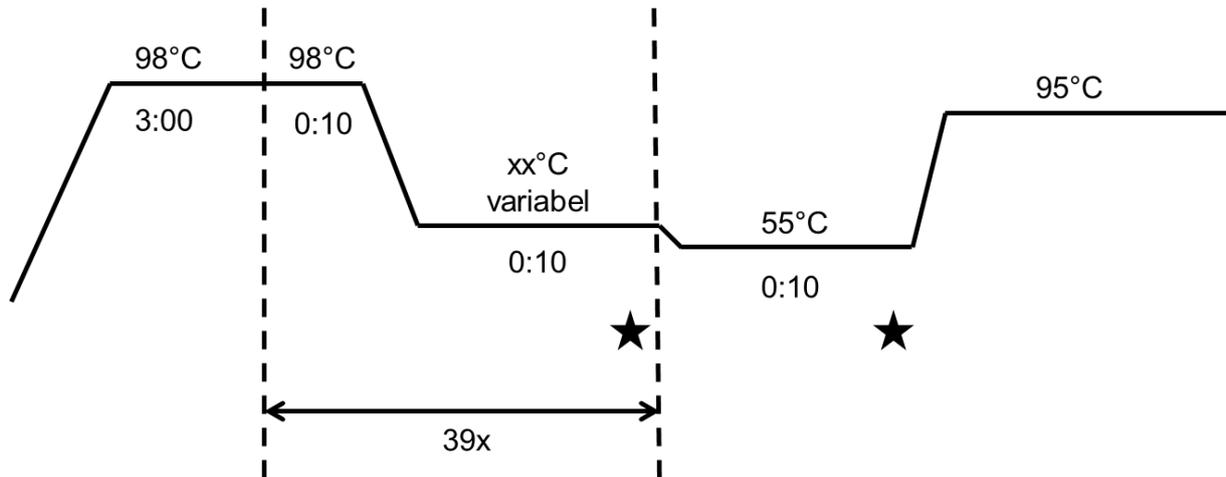


Abbildung 3-11: Schematischer Ablauf der qPCR nach Protoll von Morin et al. [Morin et al., 1995] mit Temperaturanstieg auf 98°C zu Beginn, gefolgt von einem primerabhängigen Temperaturabfall. Dieser Zyklus wird insgesamt 39mal durchlaufen, bei einer Dauer von je 10 Sekunden für die Strangdenaturierung und Primeranlagerung. Anschließendes Abkühlen auf 55°C gefolgt von einem erneuten Temperaturanstieg auf 95°C. Die Zeitpunkte der Datenerfassung sind mit Sternen gekennzeichnet.

Die Messung erfolgte in zweifacher Bestimmung. Normiert wurde die Quantifizierung auf das Gen β -Tubulin unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ Methode in der logarithmisch-linearen Phase der Amplifikationskurve.

3.2.15 Statistik

Zur Darstellung der Ergebnisse und für die statistischen Berechnungen wurde GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet. Die gezeigten Balkendiagramme bilden die erhobenen Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung ab.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des nicht parametrischen Kruskal-Wallis Tests, da die Stichproben nicht normal verteilt waren; gefolgt von Dunns multiplem Vergleichstest. Das Vorliegen einer statistischen Signifikanz wurde für $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivität der Alkalische Phosphatase

4.1.1 Primäre Osteoblasten

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden primäre Osteoblasten sowohl in der 2D als auch in der 3D Kultur über 14 Tage differenziert. Zum Nachweis der erfolgten Differenzierung wurde an Tag 7 und an Tag 14 die Enzymaktivität der AP photometrisch bestimmt (Kapitel 3.2.5). Als Ausgangswert diente die Enzymaktivität an Tag 0. Die ermittelten Aktivitätswerte wurden auf die gleichzeitig mithilfe der SRB-Färbung bestimmte Proteinmenge normiert.

Im entsprechenden Graphen (Abbildung 4-1) wird die 2D Differenzierung auf der linken Seite der 3D Differenzierung auf der rechten Seite gegenübergestellt. Beide weisen ihren höchsten Wert an Tag 7 auf und zeigen anschließend einen Abfall hin zu Tag 14. Im Vergleich der beiden Differenzierungsarten zeigt sich jedoch ein stärkerer Anstieg von Tag 0 zu Tag 7 in der 3D Differenzierung (3,3-fach erhöhter Wert an Tag 7) gegenüber einem niedrigeren (1,9-fach erhöhter Wert an Tag 7) in der 2D Differenzierung.

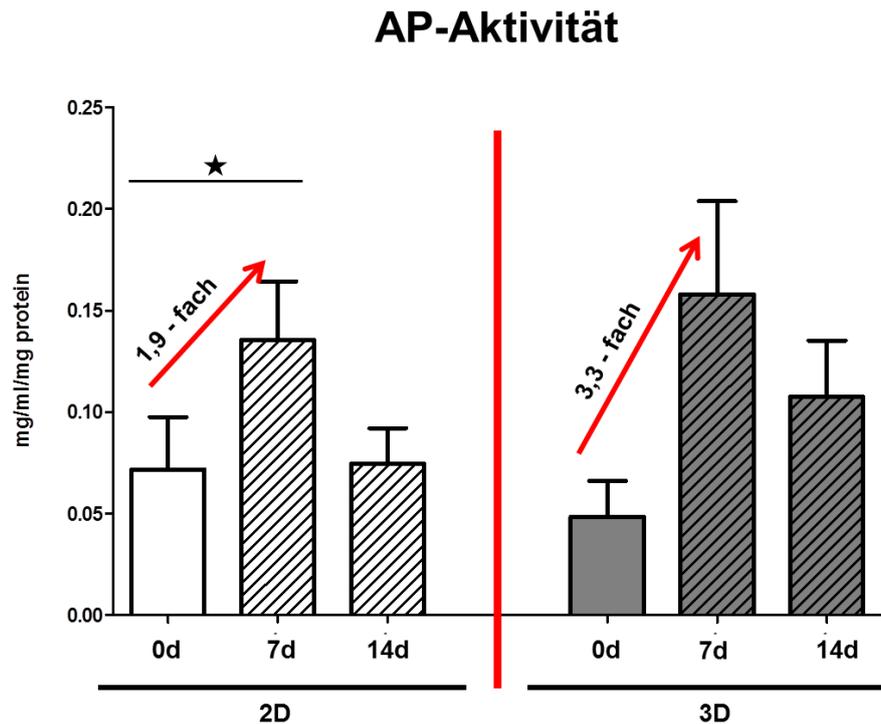


Abbildung 4-1: Alkalische Phosphatase-Aktivität der primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung über 14 Tage. (* = $p < 0,05$)

4.1.2 Ad-MSCs

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung durch Messung der Enzymaktivität der AP wurden die Spender der Ad-MSCs in zwei Gruppen unterteilt.

Entsprechend der Methodik bei den primären Osteoblasten erfolgte die osteogene Differenzierung über 14 Tage für junge und alte Spender sowohl in 2D als auch in 3D Kultur. Neben dem Ausgangswert an Tag 0 wurden auch hier an Tag 7 und an Tag 14 Aktivitätswerte der AP photometrisch bestimmt.

Im dazugehörigen Graphen (Abbildung 4-2) sind auf der linken Seite erneut die 2D Daten aufgetragen und auf der rechten Seite die Daten aus der 3D Differenzierung gegenübergestellt. Jede Gruppe ist zusätzlich noch in junge (links) und alte (rechts) Spender unterteilt.

Den Verlauf betreffend zeigen sich hier Besonderheiten im Vergleich zu den Osteoblasten. So kann bei allen Differenzierungsgruppen, bis auf die jungen Spender im 3D Bereich, ein von Tag 0 aus beginnender kontinuierlicher Zuwachs der Enzymaktivität beobachtet werden. Das Maximum liegt somit stets auf Tag 14. Lediglich die genannte Gruppe weist eine Ausnahme auf und erreicht ihren Maximalwert bereits an Tag 7.

Die im klinischen Kontext dieser Arbeit interessante Gruppe der alten Spender zeigt im Vergleich der unterschiedlichen Differenzierungsarten im 3D Bereich einen 2,2-fachen Anstieg im Verlauf von Tag 0 zu Tag 7, im 2D Bereich einen 1,7-fachen Anstieg. Der Anstieg von Tag 0 zu Tag 14 in der 2D Differenzierung in der jungen Gruppe zeigt sich signifikant ($p < 0,05$).

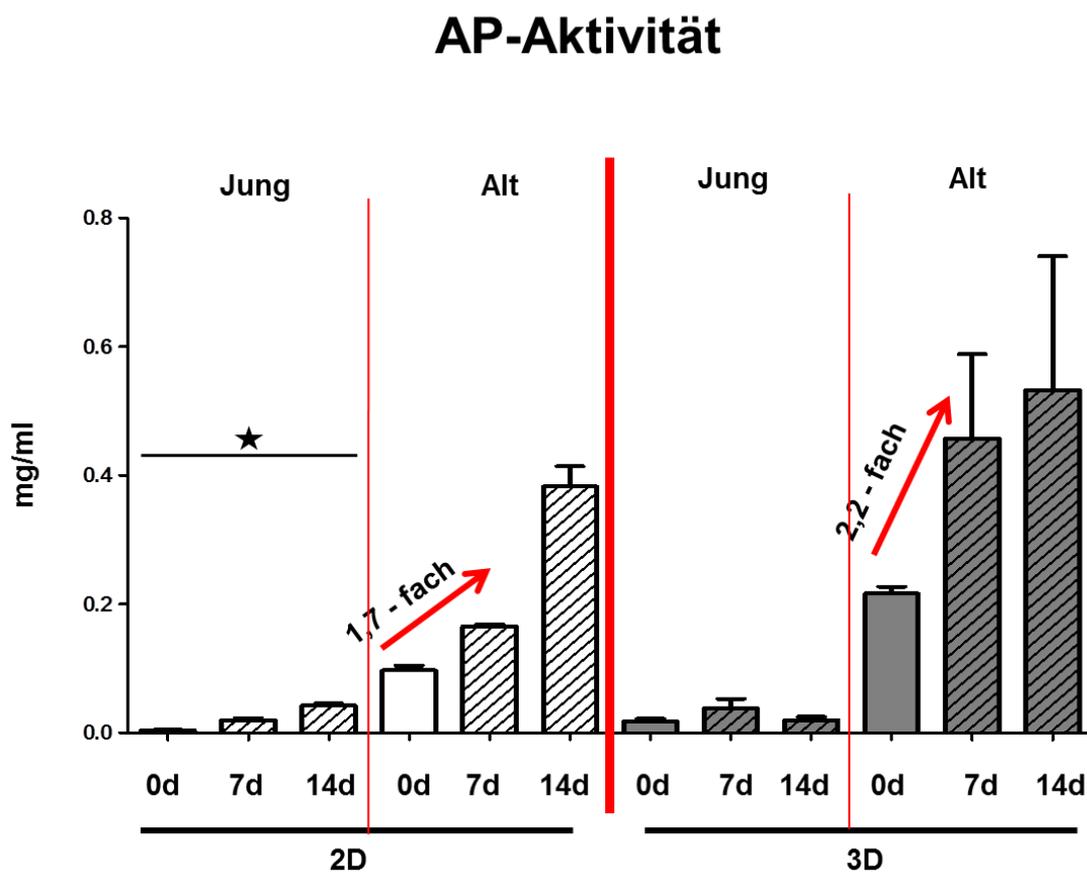


Abbildung 4-2: Alkalische Phosphatase-Aktivität bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung über 14 Tage. (* = $p < 0,05$)

4.2 Alkalische Phosphatase-Färbung

4.2.1 Primäre Osteoblasten

Nachdem zunächst der im Folgenden (Kapitel 4.2.2) beschriebene Vorversuch mit Ad-MSCs durchgeführt wurde und es sich dabei zeigte, dass eine strukturierte Integration der AP-Färbung in den geplanten Versuchsaufbau nicht möglich war, wurden keine AP-Färbungen bei primären Osteoblasten durchgeführt.

4.2.2 Ad-MSCs

Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, sollte neben der Aktivität und der im weiteren Verlauf beschriebenen Expressionsanalyse der AP eine Färbung der Zellen auf dieses Enzym durchgeführt werden.

Dazu wurden in einem Vorversuch Ad-MSCs 11 Tage in 2D und 3D Kultur differenziert, um anschließend eine AP-Färbung und eine fotografische Analyse unter dem Mikroskop durchzuführen.

Die Abbildung 4-3 zeigt die Zellen in 2D Differenzierung an Tag 11 der Differenzierung. Zu sehen ist eine bläulich-violette Verfärbung der Zellen als Nachweis einer Expression der AP. Neben den gefärbten Zellen befinden sich im Bild noch Kristalle als Artefakte der Färbelösung.

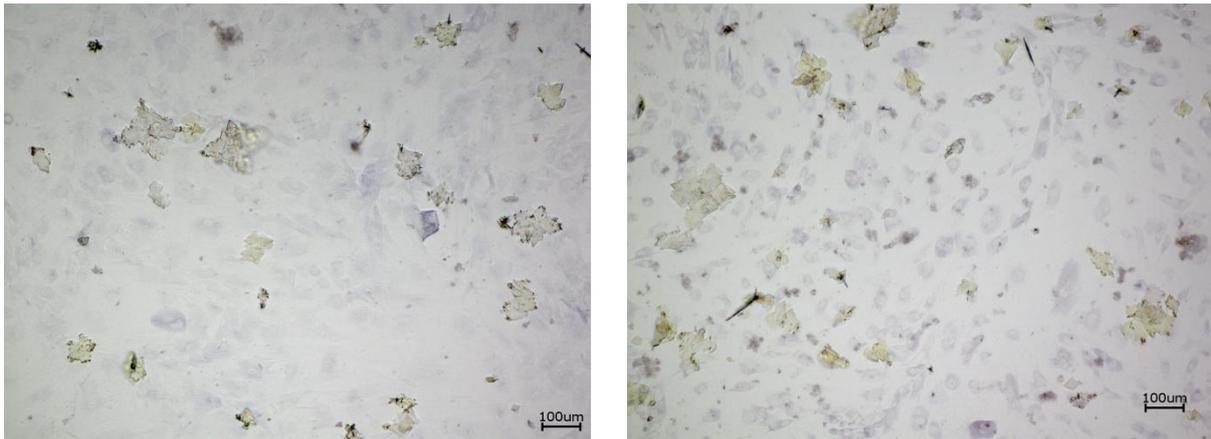


Abbildung 4-3: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs an Tag 11 in 2D Differenzierung. Typisch für den positiven Enzymnachweis ist die blauviolette Verfärbung der Zellen. Beide Bilder zeigen zudem gelblich erscheinende Kristallstrukturen, die Färbeartefakte darstellen.

Die Zellen in 3D Differenzierung sind in Abbildung 4-4 zu sehen. Dabei erweist sich der Scaffold als Hindernis für eine differenzierte Betrachtung der darin befindlichen Zellen. Trotzdem lässt sich eine leichte blau-violette Färbung an manchen Stellen erkennen.

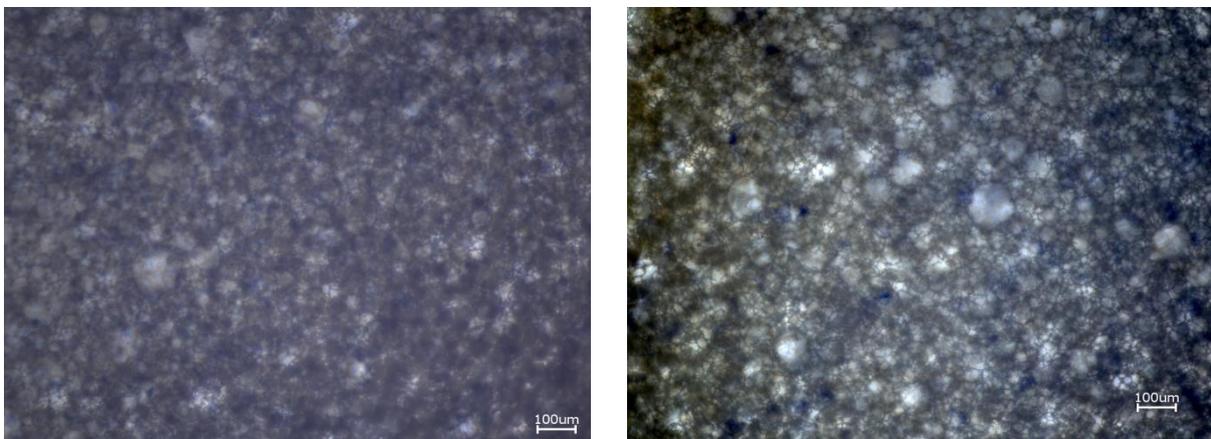


Abbildung 4-4: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs an Tag 11 in 3D Differenzierung

Nachdem auch bei dieser Färbung der Vergleich zwischen 2D und 3D im Mittelpunkt stehen sollte und die vier möglichen Teile des Scaffolds bereits für AP-Aktivität, SRB-Färbung, AR-Färbung und die Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden, wurden in einem 2. Vorversuch die Zellen eines Spenders nach erfolgter SRB-Färbung mit

10 mM ungepufferter TRIS Lösung wiederholt gewaschen und anschließend die AP-Färbung durchgeführt.

Die 2D differenzierten Zellen wiesen keinerlei blauviolette Färbung mehr auf (Abbildung 4-5). Stattdessen zeigten sich bei einigen Zellen lediglich rötliche Verfärbungen der vorangegangenen SRB-Färbung. Auch in 3D Differenzierung (Abbildung 4-6) kam es nach vorheriger SRB-Färbung zu einer Verminderung der blauvioletten Verfärbung der Zellen.

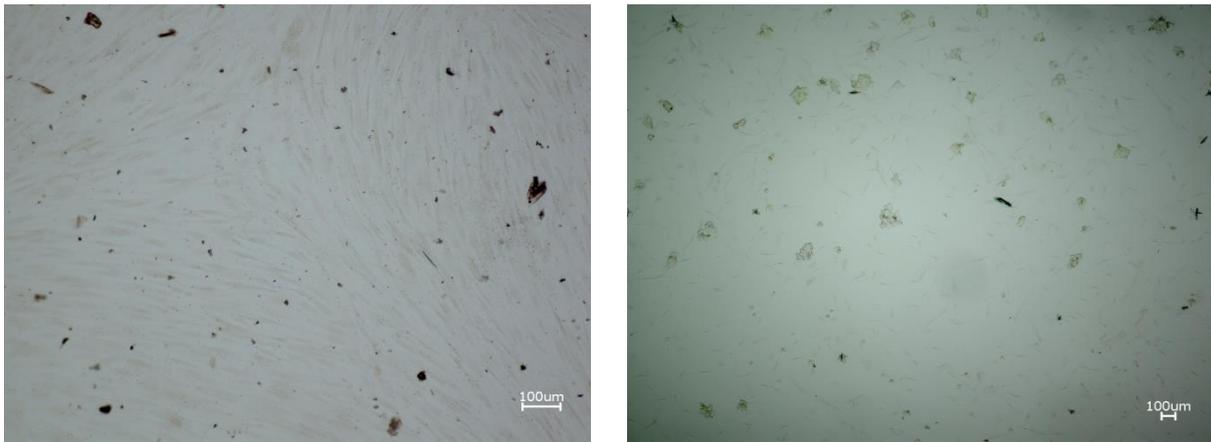


Abbildung 4-5: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs in 2D Differenzierung . Es zeigt sich keine blauviolette Verfärbung der Zellen. Die rötliche Verfärbung der Zellen (links) war Folge der vorher durchgeführten SRB-Färbung

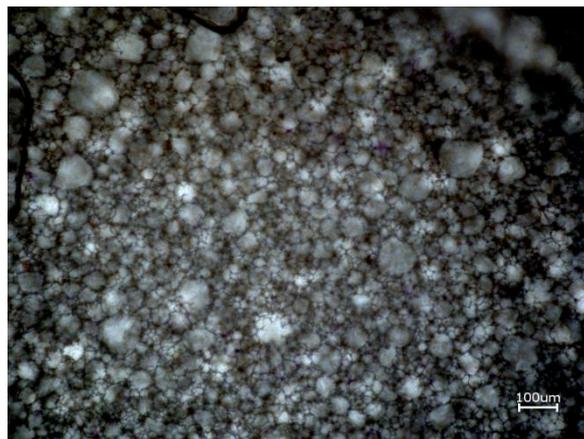


Abbildung 4-6: Alkalische Phosphatase-Färbung bei Ad-MSCs in 3D Differenzierung nach vorheriger SRB-Färbung

Somit wurde nach den Ergebnissen der Vorversuche bei Ad-MSCs im Versuchsaufbau keine weitere AP-Färbung mehr durchgeführt, da diese selbst bei direkter Färbung der Zellen aufgrund der 3D Struktur kein eindeutig differenzierbares Ergebnis hervorbrachte.

4.3 Mineralisierung

4.3.1 Primäre Osteoblasten

Als weiterer Nachweis der erfolgten osteogenen Differenzierung wurde die Mineralisierung der primären Osteoblasten mithilfe der AR-Färbung dargestellt. Bei der über 14 Tage laufenden Differenzierung wurde an Tag 0 ein Startwert ermittelt. Weitere Messungen wurden an Tag 7 sowie an Tag 14 durchgeführt. Auch hier wurden die photometrisch bestimmten Werte auf die zum entsprechenden Zeitpunkt gemessene Proteinmenge normiert.

Im unten angeführten Graphen (Abbildung 4-7) wurden auf der linken Seite die Werte aus der 2D Differenzierung den auf der rechten Seite aufgeführten Werten der 3D Differenzierung gegenüber gestellt. Im 2D Bereich lag der niedrigste Wert an Tag 0, gefolgt von einem hoch signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$) zum höchsten Wert an Tag 7, während die gemessene Mineralisierung an Tag 14 zwischen den Messwerten von Tag 0 und Tag 7 lag.

Anders verhielt es sich bei den Mineralisierungswerten im 3D Bereich. Während auch hier noch der geringste Wert an Tag 0 verzeichnet wurde, zeigte sich ein Anstieg über Tag 7 hin zu Tag 14. Signifikante ($p < 0,001$) Unterschiede wiesen auch die erhobenen Werte zu Beginn der Differenzierung zwischen 2D und 3D Differenzierung auf.

Der fehlende Anstieg hin zu Tag 14 lässt in diesem Fall keinen guten Vergleich der normalerweise am Ende der Differenzierung typischen Maximalwerte zwischen den beiden Kulturbedingungen zu.

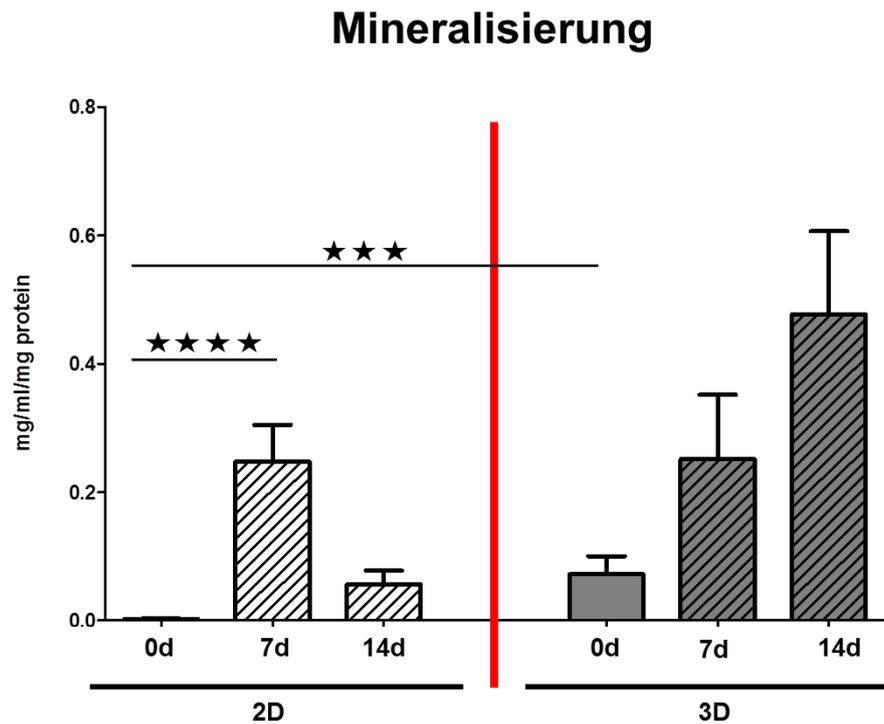


Abbildung 4-7: Mineralisierung der primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung über 14 Tage.

(*** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$)

4.3.2 Ad-MSCs

Analog zur Positivkontrolle, den Osteoblasten, wurde auch bei den Ad-MSCs als weiterer Nachweis der osteogenen Differenzierung die AR-Färbung zur Bestimmung der Zellmineralisierung, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, durchgeführt. Auch hier erfolgte neben dem Vergleich der Differenzierungsarten eine differenzierte Betrachtung anhand des Alters.

Der in Abbildung 4-8 aufgeführte Graph weist ebenso wie die Darstellung der AP-Aktivität bei Ad-MSCs eine Unterteilung in 2D auf der linken und 3D auf der rechten Seite, sowie eine Unterteilung in junge (links) und alte (rechts) Spender auf.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der primären Osteoblasten wiesen auch hier fast alle Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg der Werte beginnend von Tag 0 hin zu Tag 14 auf. Somit lag auch bei diesen Gruppen der Maximalwert an Tag 14.

Lediglich die jungen Spender in 2D Differenzierung wiesen nach einem Anstieg und Maximum an Tag 7 einen Abfall hin zu Tag 14 auf.

Hinsichtlich des Vergleiches zwischen der jungen und alten Gruppe fiel auf, dass identisch zu den Ergebnissen der AP-Aktivität, auch im Bereich der Zellmineralisierung die alten Spender unabhängig der 2D oder 3D Kultur einen höheren Ausgangswert an Tag 0 aufwiesen.

Im Vergleich der 2D und 3D Differenzierung der alten Spender zeigte sich, dass zwar wie oben beschrieben beide einen kontinuierlichen Anstieg der gemessenen Werte hin zu Tag 14 aufwiesen, dieser aber unterschiedlich stark ausfiel. Während in der 2D Differenzierung ein Zuwachs der Mineralisierung über 14 Tage um das 1,8 fache gemessen wurde, fiel dieser bei den Zellen in 3D Differenzierung mit 4,3 deutlich größer aus.

Ein ähnlicher Vergleich der Kulturbedingungen bei der Gruppe „Jung“ war aufgrund des Abfalls in der 2D Differenzierung an Tag 14 nicht möglich. Hier stellte sich der Zuwachs von Tag 0 zu Tag 7 ($p < 0,0001$) und ebenso von Tag 0 zu Tag 14 ($p < 0,001$) als signifikant dar.

Mineralisierung

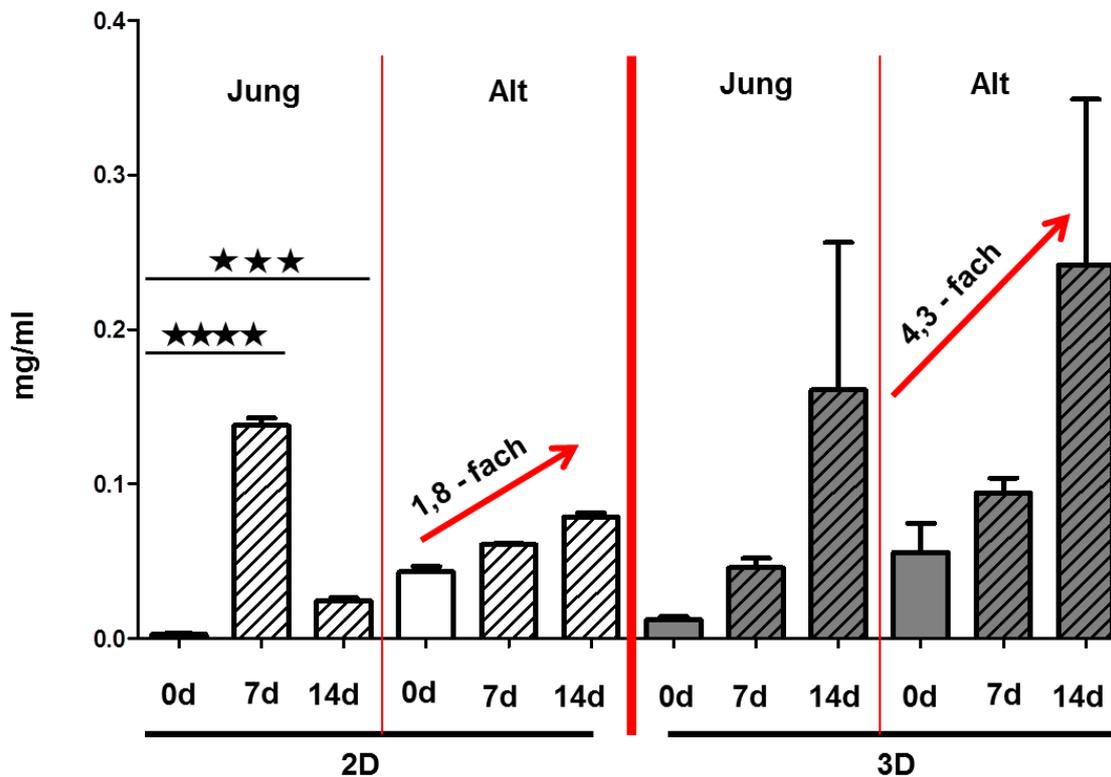


Abbildung 4-8: Mineralisierung der jungen und alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung über 14 Tage. (** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$)

4.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen auf bestimmte osteogene Proteine stellte einen weiteren Bestandteil der Differenzierungsanalyse dar.

Die Differenzierungsanalyse dieser ausgewählten Proteine bei Ad-MSCs und primären Osteoblasten erfolgte einerseits hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs über 7 bzw. 14 Tage und andererseits im Vergleich der beiden Differenzierungskulturen, 2D und 3D.

4.4.1 2D Differenzierung

4.4.1.1 Primäre Osteoblasten - Osteocalcin

Die unten dargestellten Bilder (Abbildung 4-9) zeigen eine Gegenüberstellung des Fluoreszenzsignals für Osteocalcin an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts) im Verlauf der 2D Differenzierung. Im Vergleich war dabei auffallend, dass das Signal zu Beginn der Differenzierung bedeutend geringer ausfiel als das Signal der Zellen an Tag 7.

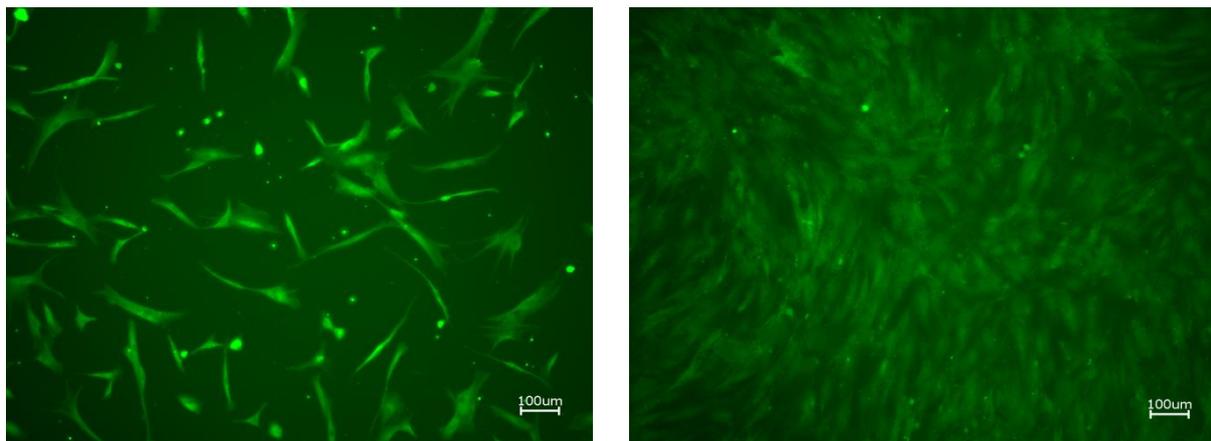


Abbildung 4-9: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Osteocalcin an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts)

4.4.1.2 Primäre Osteoblasten – Kollagen I

Auch die Gegenüberstellung der Fluoreszenzfärbung für Kollagen I (Abbildung 4-10) zu Beginn der Differenzierung (linkes Bild) und nach einer Woche (rechtes Bild) wies deutliche Unterschiede in der Signalintensität auf. So zeigten sich an Tag 0 (linkes Bild) nur vereinzelte, schmale Farbsignale, während sich an Tag 7 (rechtes Bild) ein in Quantität und Intensität erhöhtes Signal darstellte.

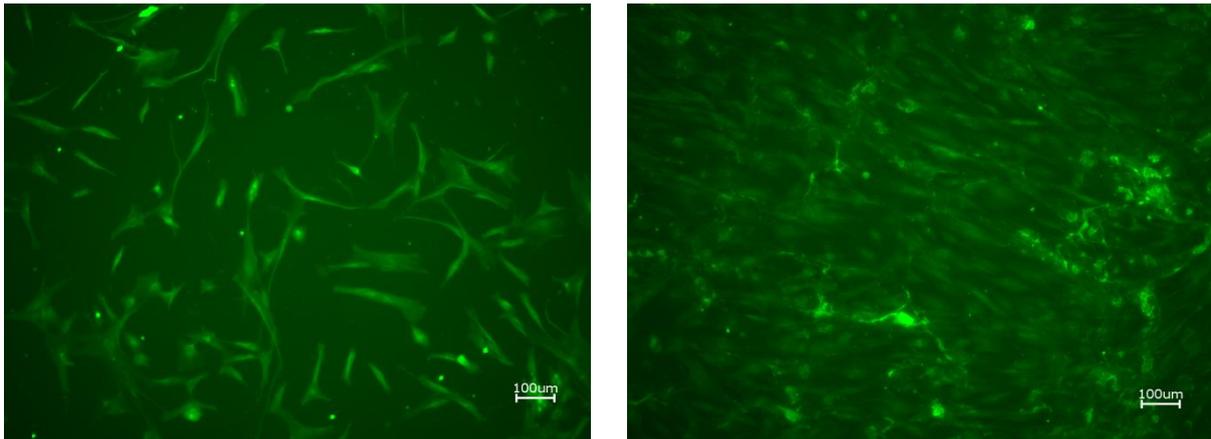


Abbildung 4-10: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I in 2D Differenzierung an Tag 0 (links) und an Tag 7 (rechts)

4.4.1.3 Ad-MSCs - Osteocalcin

Die unten dargestellten Bilder (Abbildung 4-11) zeigen das Ergebnis der Fluoreszenzfärbung für Osteocalcin nach einwöchiger Differenzierung der Ad-MSCs in 2D. Das linke Bild zeigt die Ad-MSCs zu Beginn der Differenzierung an Tag 0; das Bild rechts weist die Zellen an Tag 7 auf.

Der Vergleich beider Bilder zeigte eine Zunahme des Fluoreszenzfarbstoffes an Tag 7 im Vergleich zum Beginn der Differenzierung an Tag 0, was eine Hochregulation von Osteocalcin vermuten lässt.

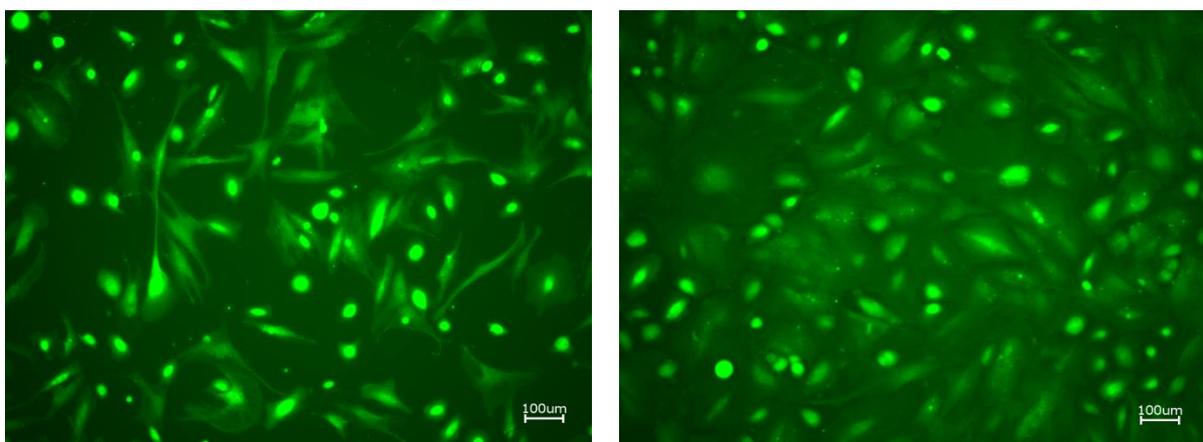


Abbildung 4-11: Fluoreszenzfärbung Ad-MSCs für Osteocalcin in 2D Differenzierung an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts)

4.4.1.4 Ad-MSCs - Kollagen I

Die in Abbildung 4-12 dargestellte Fluoreszenzfärbung für Kollagen I zeigt die 2D Differenzierung der Ad-MSCs an Tag 0 (links) und an Tag 7 (rechts).

Hier zeigte sich zu Beginn (Tag 0) ein relativ schwaches Fluoreszenzsignal, was auf eine niedrige Kollagenkonzentration der Zellen schließen lässt. Im Verlauf wurde eine deutlich erhöhte Signalstärke sichtbar, im Sinne einer abgelaufenen, positiv regulierten Kollagenbildung.

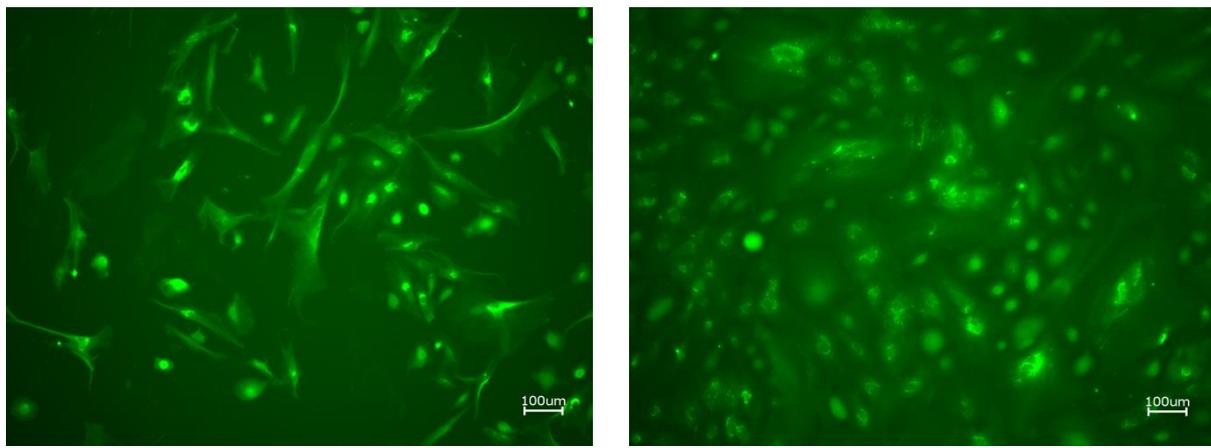


Abbildung 4-12: Fluoreszenzfärbung Ad-MSCs für Kollagen I in 2D Differenzierung an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts)

4.4.1.5 Overlays

Neben den bisher beschriebenen Fluoreszenzfärbungen auf einen bestimmten Marker der osteogenen Differenzierung wurden zusätzlich zu einigen Zeitpunkten während der Differenzierung sowohl bei Ad-MSCs als auch bei primären Osteoblasten Fluoreszenzfärbungen für verschiedene Proteine und den Zellkern durchgeführt und bei unterschiedlichen Wellenlängen fotografiert. Die einzelnen Bilder wurden anschließend übereinandergelegt.

In Abbildung 4-13 sind Ad-MSCs an Tag 7 der 2D Differenzierung zu sehen mit einer grün erscheinenden Fluoreszenzfärbung für Osteocalcin und den blau gefärbten Zellkernen.

Abbildung 4-14 bis Abbildung 4-16 zeigen primäre Osteoblasten, die an Tag 14 der 2D Differenzierung gefärbt wurden. Auch hier stellen sich die Zellkerne blau dar, das grüne Farbsignal repräsentiert die Bindung an Kollagen I und rot erscheint ein weiterer osteogener Marker, Osteoprotegerin.

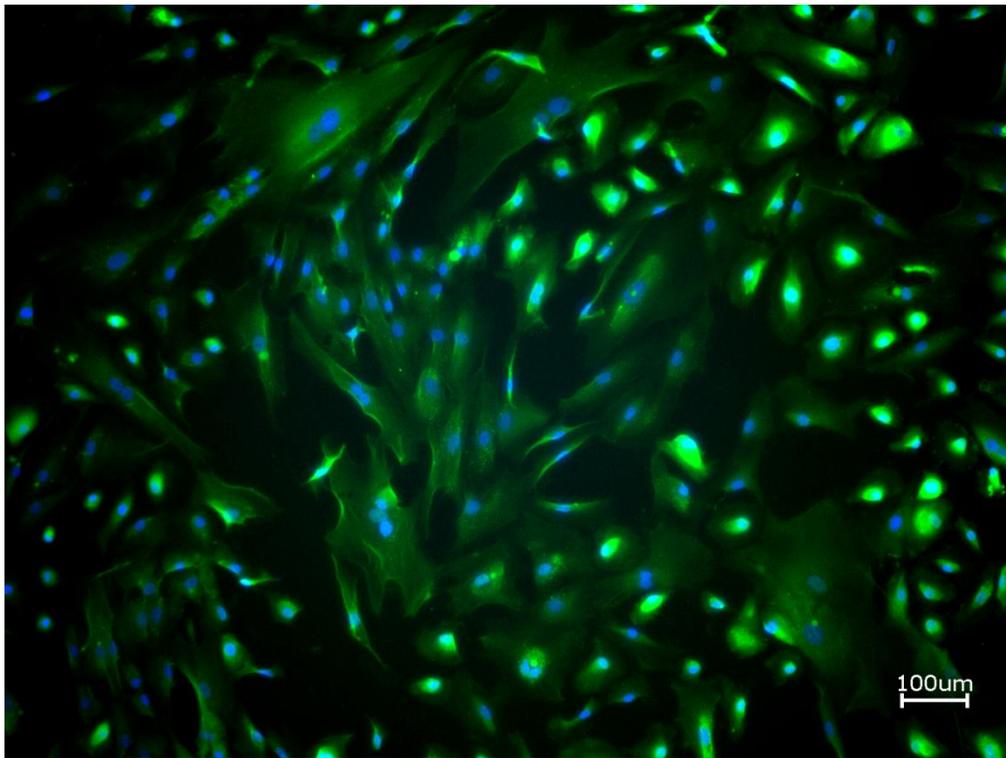


Abbildung 4-13: Fluoreszenzfärbung Ad-MSCs für Osteocalcin (grün) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung an Tag 7

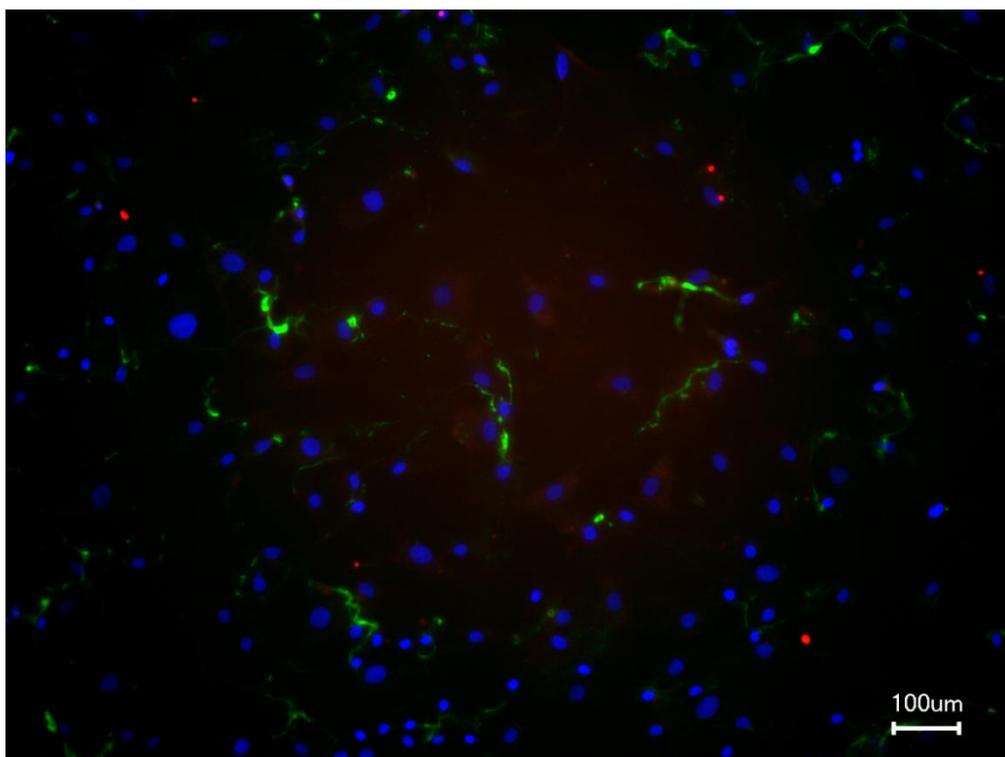


Abbildung 4-14: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I (grün), Osteoprotegerin (rot) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung an Tag 14

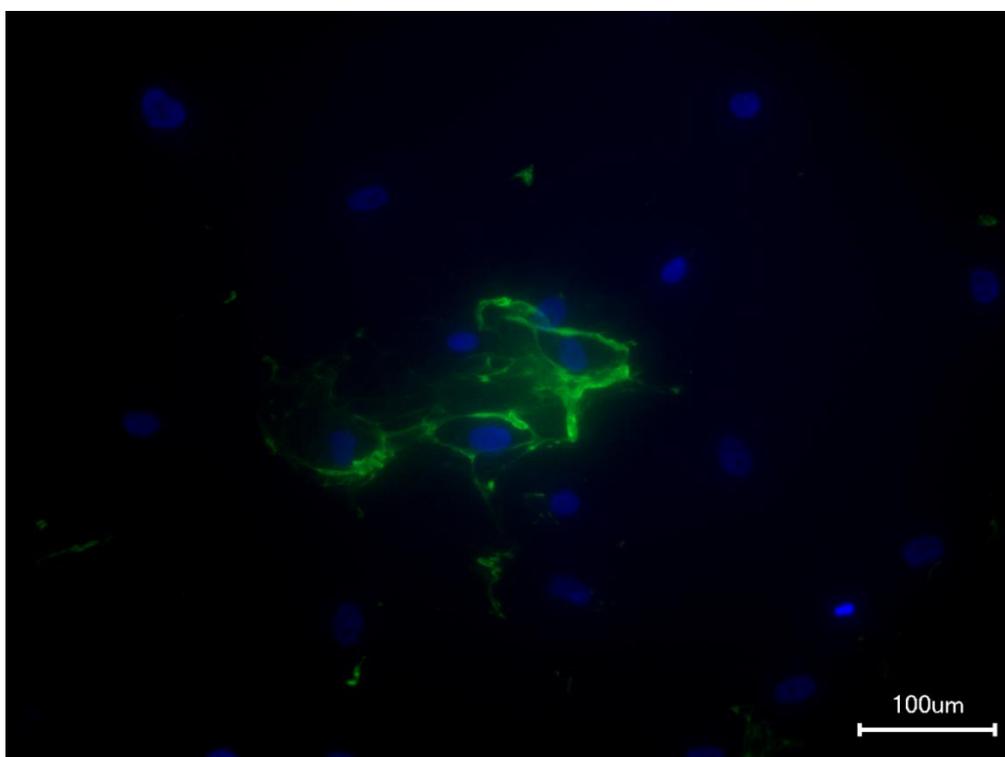


Abbildung 4-15: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I (grün) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung an Tag 14

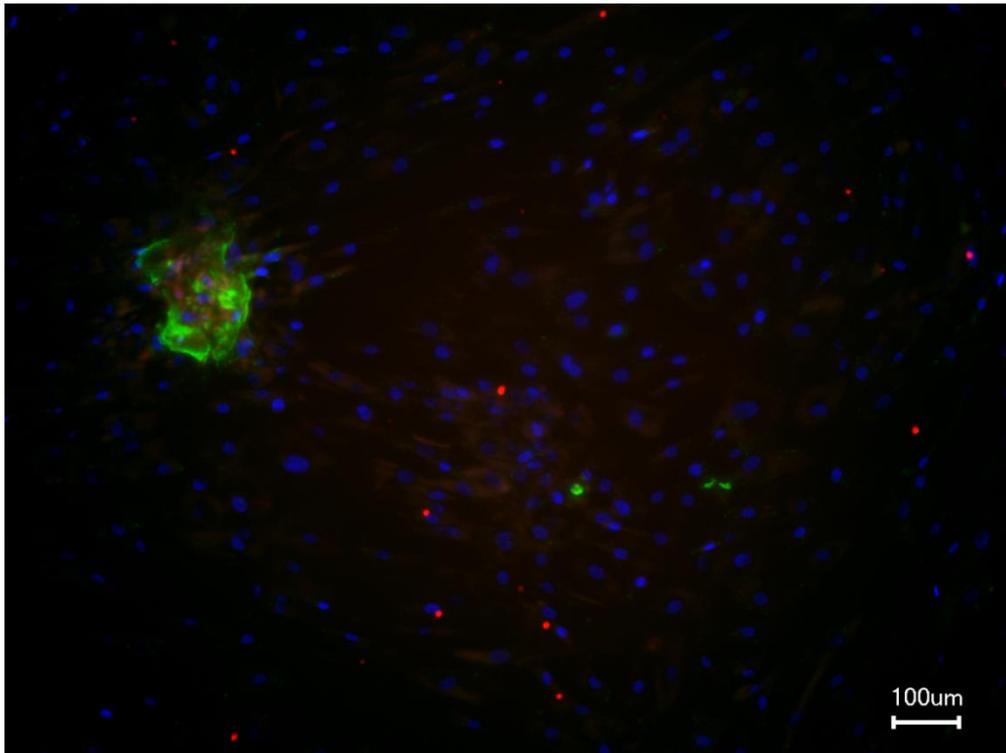


Abbildung 4-16: Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten für Kollagen I (grün), Osteoprotegerin (rot) und Hoechst (blau) in 2D Differenzierung an Tag 14

4.4.2 3D Differenzierung

4.4.2.1 Primäre Osteoblasten – Kollagen I und Osteoprotegerin

Die Bilder in Abbildung 4-17 zeigen mikroskopische Aufnahmen der 3D Differenzierung. Sowohl bei der Fluoreszenzfärbung für Kollagen I, als auch bei der Fluoreszenzfärbung für Osteoprotegerin gab es aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Scaffolds keine Möglichkeit der Differenzierung der Signale zwischen Zellen einerseits und der 3D Struktur andererseits. Verdeutlicht wurde dieses Phänomen durch die Übersichtsaufnahme des Scaffolds nach Färbung der Zellen auf OPG.

Lediglich die Färbung der Zellkerne führte zu einem spezifischen Fluoreszenzsignal.

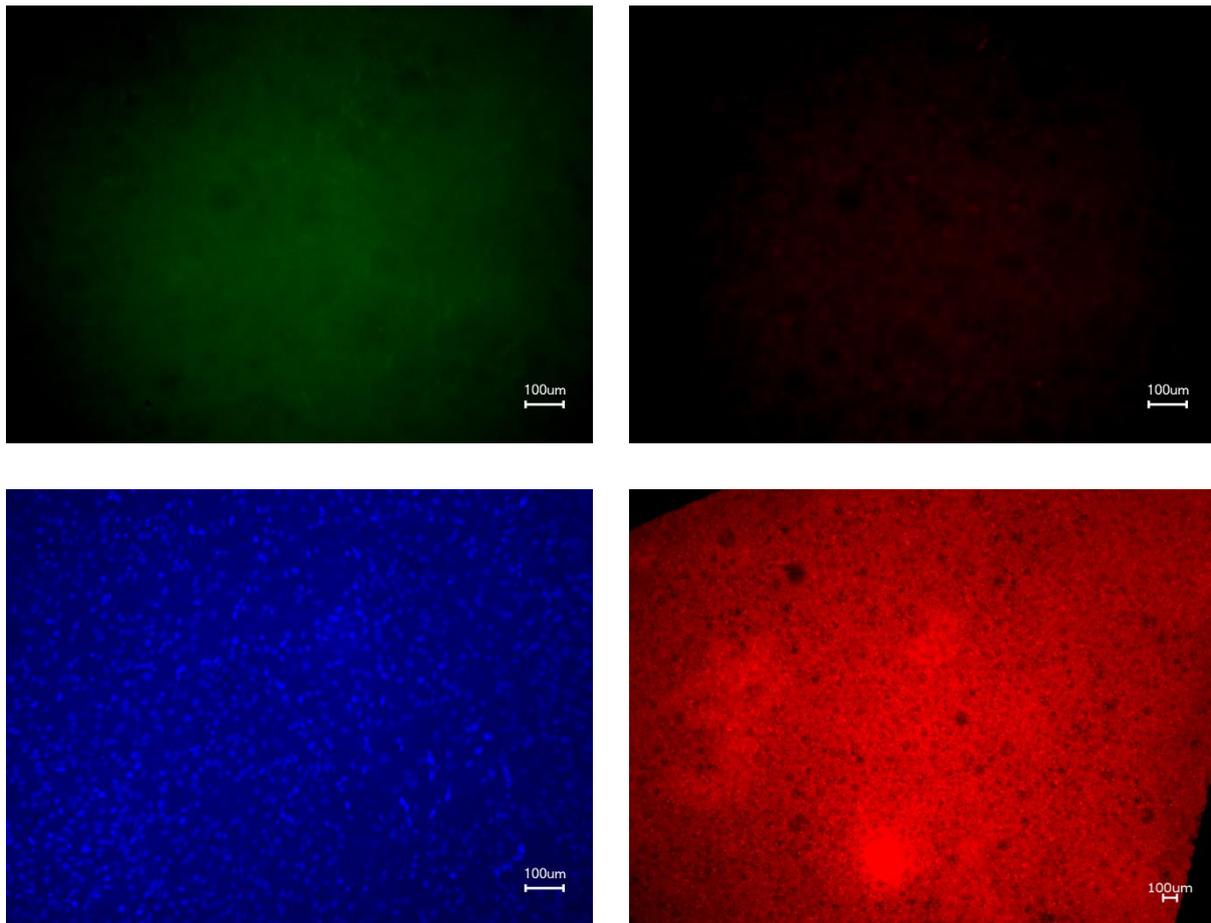


Abbildung 4-17: Mikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenzfärbung primärer Osteoblasten in 3D Differenzierung .Fluoreszenzfärbung für Kollagen I (links oben), Osteoprotegerin (rechts oben), Hoechst (links unten) und Übersichtsaufnahme des Scaffolds bei Färbung für Osteoprotegerin (rechts unten)

4.4.2.2 Ad-MSCs

Auch die Fluoreszenzfärbungen der Ad-MSCs für verschiedene osteogene Proteine brachten aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz des Scaffolds keine verwertbaren Ergebnisse hervor. Aufgrund der vergleichbaren Bilder zu denen der primären Osteoblasten wurde auf eine Abbildung verzichtet.

4.5 Osteogene Marker auf molekularer Ebene

Zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung von primären Osteoblasten und Ad-MSCs wurde die Expression typischer osteogener Marker mittels qPCR gemessen.

Initial war im Versuchsaufbau der Nachweis der osteogenen Differenzierung auf molekularer Ebene mittels RT-PCR geplant, wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben. Aufgrund technischer Schwierigkeiten im Rahmen der Vorversuche wurde im Weiteren ausschließlich die qPCR zur Analyse der Genexpression verwendet. Alle im Weiteren aufgelisteten Daten der osteogen differenzierten Ad-MSCs und primären Osteoblasten wurden deshalb mittels qPCR erhoben.

Die primären Osteoblasten wurden entsprechend den Ad-MSCs über 7 Tage osteogen differenziert. Dabei erfolgte die Differenzierung wie bisher für eine Gruppe in einer 2D Kultur, für die zweite Gruppe unter Verwendung einer 3D Struktur. Bei den Ad-MSCs wurde zusätzlich noch die Unterscheidung der jungen und alten Gruppe beibehalten.

4.5.1 Alkalische Phosphatase

4.5.1.1 Primäre Osteoblasten

Während der einwöchigen Differenzierung der zwei verschiedenen Differenzierungsarten, wurde nach einer Messung der Expression an Tag 0, diese zusätzlich an Tag 7 gemessen. Die erhobenen Daten wurden anschließend auf den Tag 0 normiert und im unten dargestellten Graph (Abbildung 4-18) abgebildet.

Dabei zeigte sich sowohl bei den links auf der X-Achse aufgetragenen Daten der 2D Differenzierung wie auch bei den rechts gegenübergestellten Daten der 3D Differenzierung ein Anstieg der Expressionswerte hin zu Tag 7.

Im Vergleich der Zuwachsfaktoren beider Kulturbedingungen fiel der Zuwachs im 3D Bereich (Faktor 4,7) größer aus als in der 2D Differenzierung (Faktor 3,7).

Alkalische Phosphatase

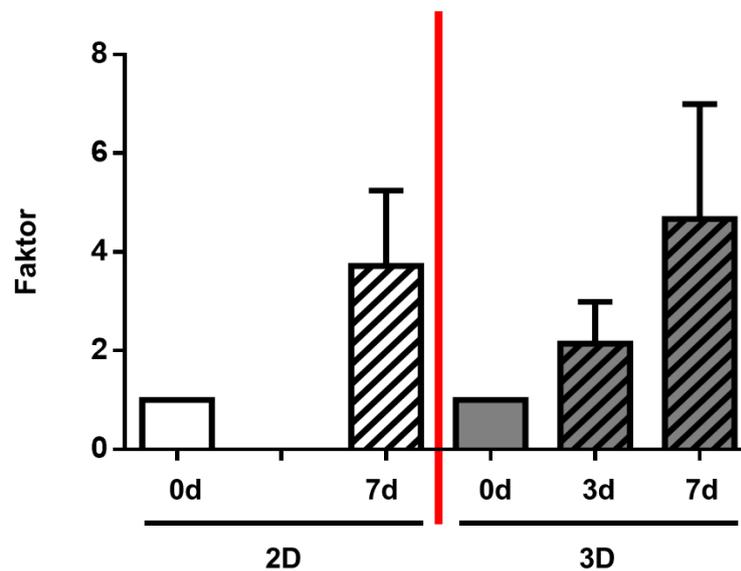


Abbildung 4-18: Genexpression der Alkalischen Phosphatase bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung im Verlauf über 7 Tage
(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.1.2 Ad-MSCs

Neben der Aktivitätsmessung der AP durch photometrische Bestimmung wurde auch die Enzymexpression auf Ebene der mRNA als typischer osteogener Marker analysiert.

Die Graphik (Abbildung 4-19) zeigt zunächst eine Darstellung der Ergebnisse von beiden Altersgruppen in 3D Differenzierung. Während die Werte der jungen Spender in der linken Hälfte X-Achse aufgetragen sind, befinden sich in der rechten Hälfte die alten Spender. Alle dargestellten Daten stellen auch hier den auf den Ausgangswert an Tag 0 normierten Zuwachs dar.

Die junge Spendergruppe wies dabei einen anderen Expressionsverlauf über 7 Tage auf als die alte Gruppe. Während bei den alten Spendern ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) von Tag 0 zu Tag 3 zu sehen war und es nach diesem Maximalwert zu einem Abfall hin zu Tag 7 kam, erfolgte bei der Gruppe der jungen Spender ein

kontinuierlicher Anstieg vom Ausgangswert an Tag 0 bis hin zum Ende der Differenzierung.

Im genaueren Vergleich der ermittelten Anstiegsdaten zeigte sich, dass dieser bei den alten Zellen größer ausfiel als bei den jungen. Während bei letztgenannter Gruppe von Tag 0 zu Tag 3 ein Zuwachs um den Faktor 2,6 erzielt wurde, lag dieser im Gegensatz dazu bei den alten Spendern bei 5,8. Selbst der Maximalwert an Tag 7 in der jungen Gruppe ist mit dem Faktor 3,95 deutlich geringer.

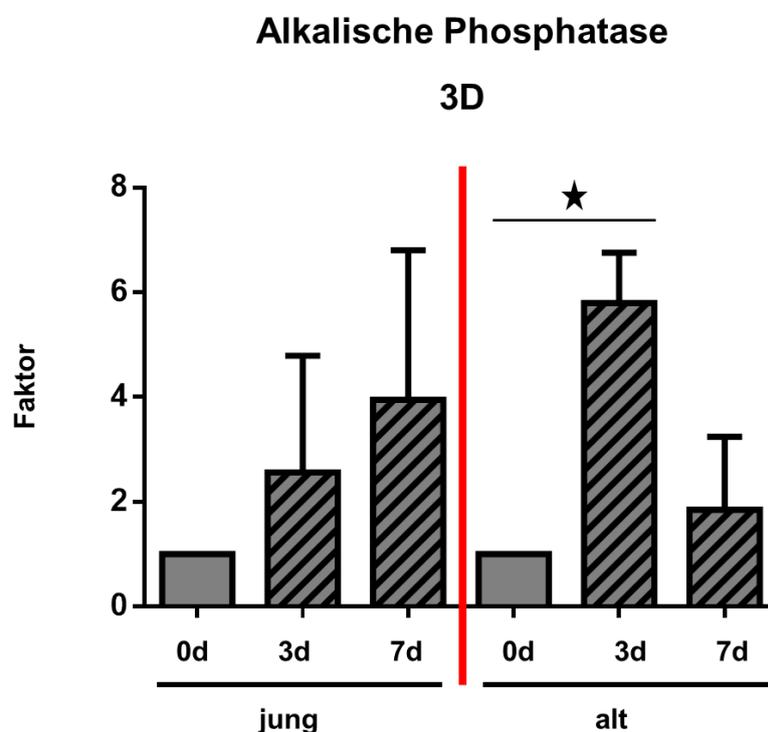


Abbildung 4-19: Genexpression der Alkalischen Phosphatase bei jungen und alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung über 7 Tage. (* = $p < 0,05$); (Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

Neben der 3D Differenzierung stellt die unten angeführte Graphik (Abbildung 4-20) die Ergebnisse für die 2D Differenzierung beider Altersgruppen dar. Der Aufbau ist dabei identisch zu Abbildung 4-19.

Der Verlauf stellte sich dabei für beide Gruppen identisch dar. Angefangen von einem Ausgangswert an Tag 0, der gleichzeitig der niedrigste Wert ist, folgte ein

signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) zu Tag 3, an dem der Maximalwert gemessen wurde, gefolgt von einem Abfall hin zu Tag 7. Der Verlauf entsprach dem oben dargestellten Verlauf der alten Spender in der 3D Differenzierung.

Während der Verlauf beider Gruppen noch identisch war, zeigte sich im Vergleich der beiden Altersgruppen bei Betrachtung des gesamten Differenzierungszeitraums ein deutlicher Unterschied. So wies die Gruppe der alten Spender insgesamt gesehen eine deutlich höhere Expression des osteogenen Markers AP auf.

Dies bestätigte sich auch bei einer Gegenüberstellung der beiden maximalen Zuwachsraten. Während der Anstieg von Tag 0 zu Tag 3 bei den jungen Spendern um den Faktor 3,65 zunimmt, liegt der Zuwachs im gleichen Zeitraum bei den alten Spendern bei 12,1.

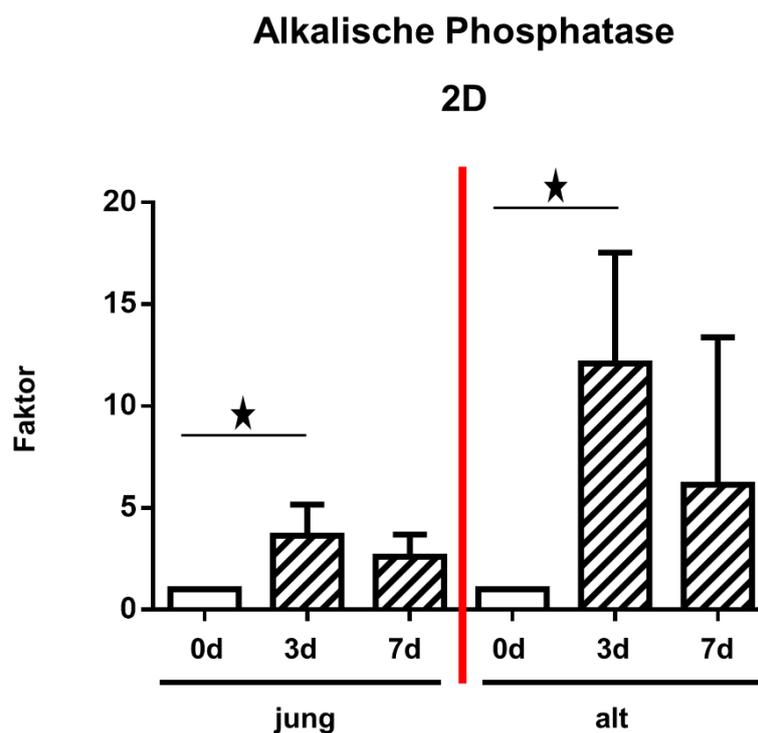


Abbildung 4-20: Genexpression der Alkalischen Phosphatase bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D Differenzierung über 7 Tage. (* = $p < 0,05$); (Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.2 Osteoprotegerin

4.5.2.1 Primäre Osteoblasten

Als zweiter Marker nach der AP, wurde nach 7-tägiger Differenzierung die Expression von Osteoprotegerin quantifiziert. Dies erfolgte an Tag 0 sowie an Tag 7 in 2D und in 3D Differenzierung.

In Abbildung 4-21 wurden wie bisher die 2D Daten auf der linken Hälfte der X-Achse und die 3D Daten auf der rechten Hälfte dargestellt. Ebenso wurden alle Expressionswerte auf den jeweiligen Ausgangswert an Tag 0 normiert.

Die beiden Differenzierungsarten unterschieden sich in der Art ihres Verlaufes. Während in der 2D Differenzierung die Werte an Tag 7 fast mit denen an Tag 0 identisch blieben, wiesen die Daten der 3D Differenzierung einen Anstieg von Tag 0 zu Tag 7 um den Faktor 8,2 auf.

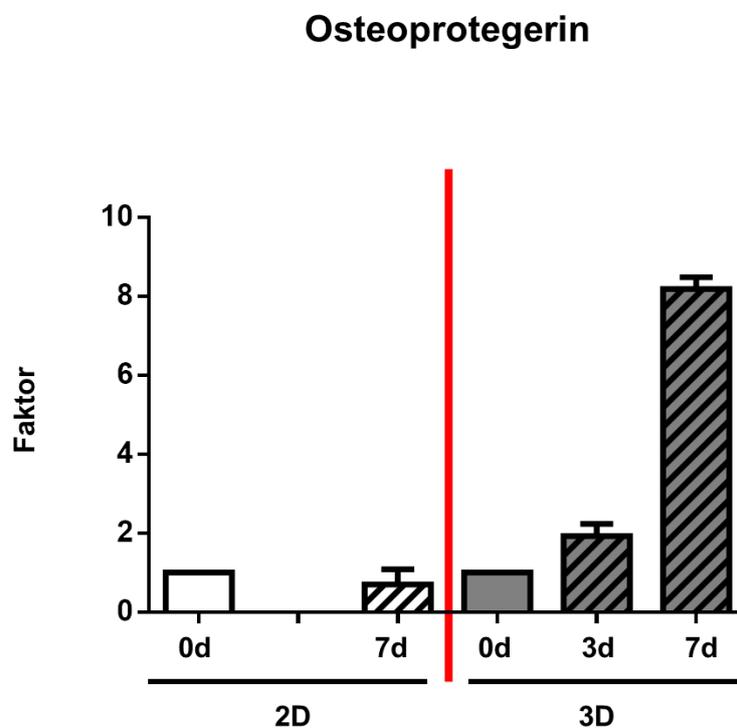


Abbildung 4-21: Osteoprotegerinexpression bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage

(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.2.2 Ad-MSCs

Simultan zu den primären Osteoblasten erfolgte auch bei den Ad-MSCs die Bestimmung von Osteoprotegerin als weiteren osteogenen Marker während der Differenzierung.

Auch hier wurde die Differenzierung in beiden Altersgruppen über 7 Tage durchgeführt. In der 2D Differenzierung wurden hierbei an Tag 0, 3 und 7 Expressionsanalysen durchgeführt, in der 3D Differenzierung an Tag 0 und 7. Die gemessenen Expressionswerte der eingeschlossenen Gruppe wurden alle auf den jeweiligen Ausgangswert an Tag 0 normiert.

In der folgenden Abbildung 4-22 wurden die jungen (links) und alten (rechts) Spender in der 3D Differenzierung gegenübergestellt. Die ermittelten Daten zeigten für beide Gruppen einen nahezu konstanten Verlauf über die 7 Tage.

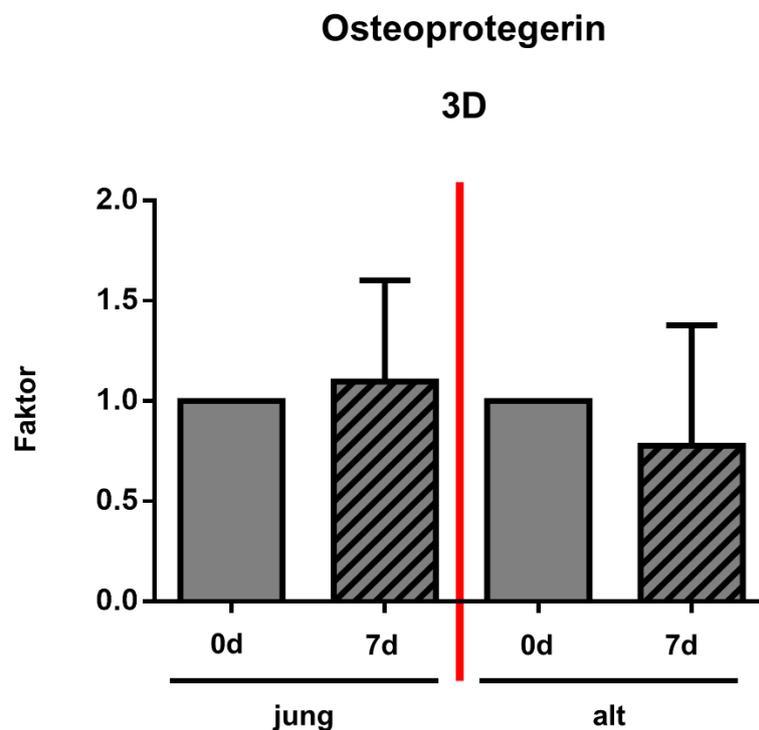


Abbildung 4-22: Osteoprotegerinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung über 7 Tage
(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

Anders stellten sich die Ergebnisse in der 2D Differenzierung dar. Die Expressionswerte (Abbildung 4-23) zeigten keinen konstanten Verlauf, sondern einen Anstieg vom Ausgangswert an Tag 0 hin zum Maximum an Tag 3, gefolgt von einem Abfall zu Tag 7.

Im Vergleich der beiden Altersgruppen erfolgte der Zuwachs von Tag 0 zu Tag 3 bei den jungen Spendern um den Faktor 1,9 während dieser bei der alten Gruppe knapp doppelt so hoch (Faktor 3,6) ausfiel.

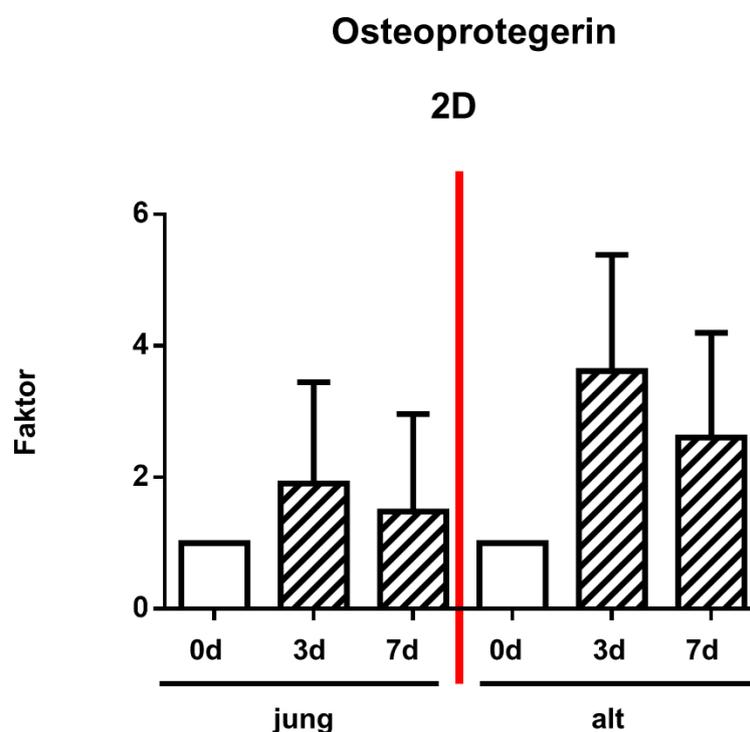


Abbildung 4-23: Osteoprotegerinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D Differenzierung über 7 Tage
(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.3 Osteocalcin

4.5.3.1 Primäre Osteoblasten

Auch dieser Marker wurde zu Beginn und nach durchgeführter osteogener Differenzierung über eine Woche mittels qPCR gemessen. Die ermittelten Werte wurden wie bei den vorherigen Genen auf den Ausgangswert an Tag 0 normiert.

Der Aufbau der Graphiken (Abbildung 4-24) erfolgte identisch zu den oben aufgeführten Abbildungen mit einer Gegenüberstellung der 2D Daten links auf der X-Achse und den 3D Daten rechts.

Beide Differenzierungsgruppen wiesen einen ähnlichen Verlauf auf. Ausgehend vom Startwert an Tag 0 erfolgte ein Abfall hin zu Tag 7. Im 2D Bereich fiel dieser dabei geringer aus, da an Tag 7 noch 85% des Startwertes gemessen wurden, während dagegen im 3D Bereich ein Abfall bis auf die Hälfte des gemessenen Wertes an Tag 0 stattfand.

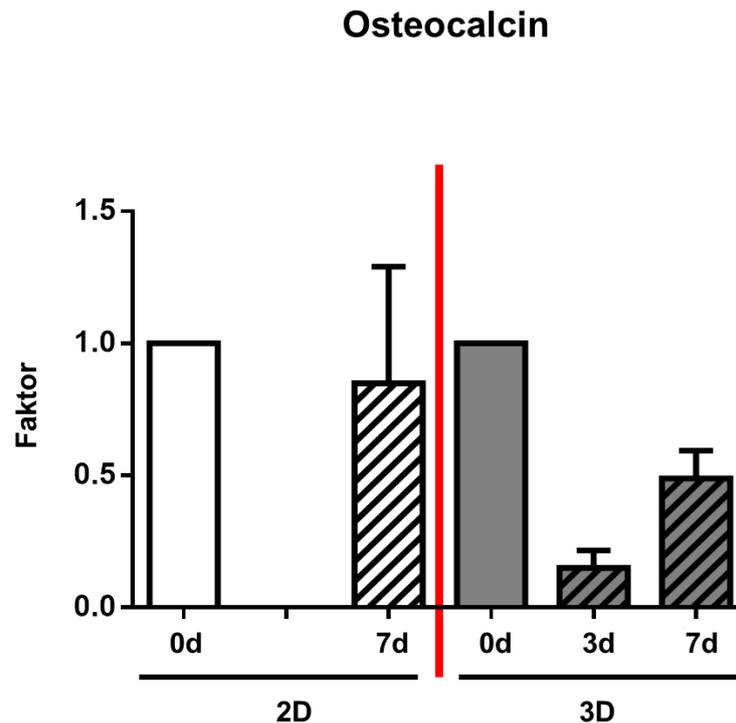


Abbildung 4-24: Osteocalcinexpression bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage (Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.3.2 Ad-MSCs

Die Abbildung 4-25 zeigt die Expressionswerte für Osteocalcin. Dabei wurde in der linken Hälfte die 2D und in der rechten Hälfte die 3D Differenzierung über eine Woche dargestellt. Beide Differenzierungsarten wiesen zudem eine Unterteilung für junge (links) und alte (rechts) Spender auf. Dabei stellt die Graphik eine Abbildung der absoluten Messwerte dar. Um eine Vergleichbarkeit der Werte zu schaffen, wird der Messwert an Tag 7 auf den jeweiligen Tag 0 normiert, zur besseren Detektion der Höhe einer Zu- bzw. Abnahme.

Bis auf die Gruppe der jungen Spender in 2D Differenzierung, die einen Anstieg der Expressionswerte über den beobachteten Zeitraum aufwies, zeigten alle anderen Gruppen einen Abfall der Messwerte. Bei den alten Spendern in der 2D Differenzierung lag der Ausgangswert an Tag 0 dabei um den Faktor 1,4 höher als der Endwert an Tag 7. Ebenso zeigte sich in der 3D Differenzierung bei der jungen Gruppe ein Abfall von Tag 0 hin zu Tag 7 um den Faktor 1,4. Lediglich bei der

Gruppe der alten Spender in der 3D Differenzierung fiel dieser größer (Faktor 1,9) aus.

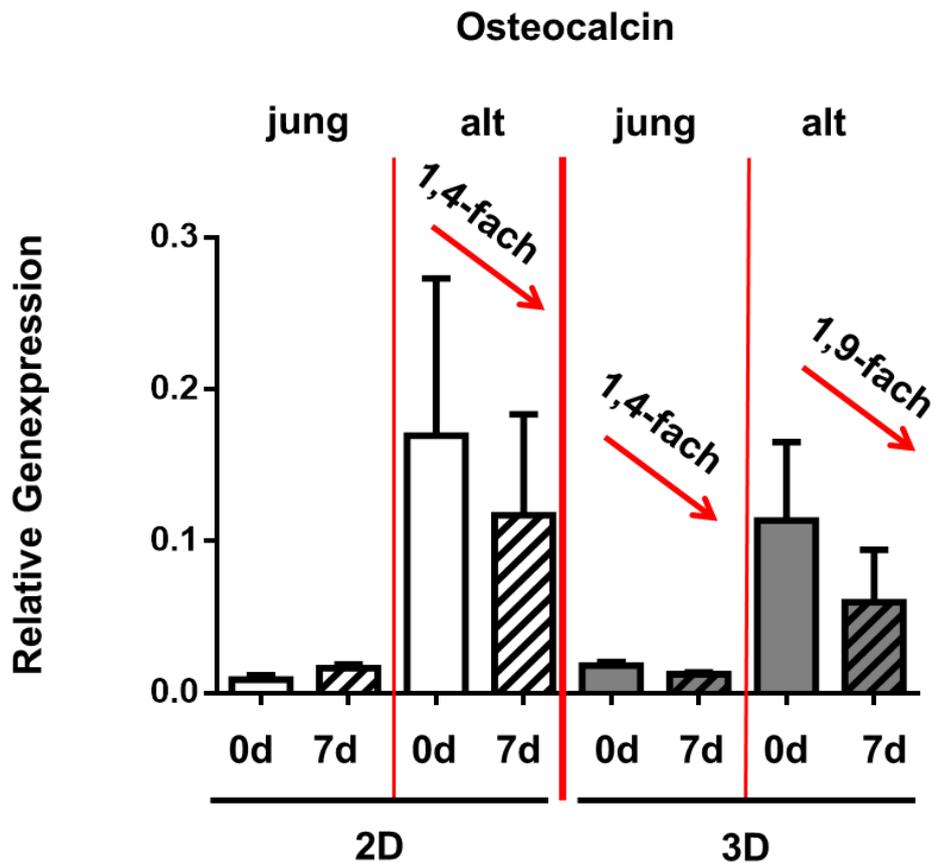


Abbildung 4-25: Osteocalcinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage

4.5.4 Kollagen I

4.5.4.1 Primäre Osteoblasten

Als vierter Marker, zum Nachweis der erfolgten osteogenen Differenzierung, wurde die Genexpression von Kollagen I ermittelt.

Entsprechend der Vorgehensweise bei den anderen Differenzierungsparametern, wurde auch hier zu Beginn des Differenzierungsprozesses an Tag 0 ein

Ausgangswert gemessen und ein zusätzlicher Wert im Verlauf an Tag 7. Für die 3D Differenzierung wurden zusätzlich an Tag 3 Messwerte erhoben. Die erhobenen Werte wurden auf den Wert an Tag 0 normiert.

Angepasst an den Vergleich der Expressionswerte in den beiden unterschiedlichen Differenzierungsarten wurden diese in Abbildung 4-26 einander gegenübergestellt. Die Daten der Spender in der 2D Differenzierung wurden links auf der X-Achse, die Ergebnisse der Spender aus der 3D Differenzierung rechts aufgetragen.

Die Verlaufsanalyse für die beiden Kulturarten fiel unterschiedlich aus. Während in der 2D Differenzierung ein konstantes Niveau der Genexpression über 7 Tage vorlag, zeigte sich im 3D Bereich zunächst ein Abfall hin zu Tag 3 mit anschließender Zunahme der Expression hin zu Tag 7.

Dadurch lag das Maximum der 3D Differenzierung an Tag 7, was eine Zunahme im Vergleich zu Tag 0 um den Faktor 1,4 bedeutete.

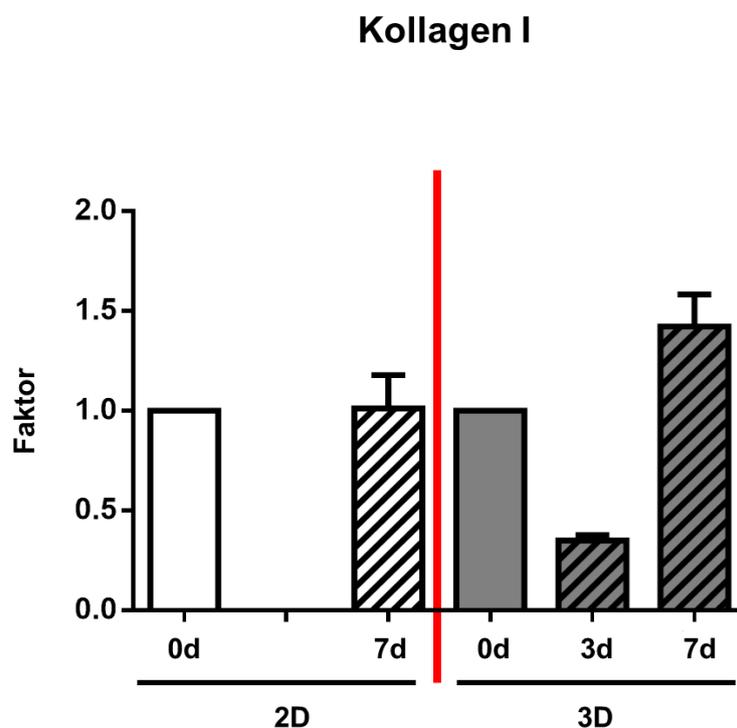


Abbildung 4-26: Expression Kollagen I bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage (Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.4.2 Ad-MSCS

Die folgende Graphik (Abbildung 4-27) zeigt die Ergebnisse der jungen Spender, wobei die Ergebnisse aus der 2D Differenzierung (links) denen der 3D Differenzierung (rechts) gegenübergestellt sind. Alle in diesem Graph dargestellten Daten wurden auf den jeweiligen Ausgangswert an Tag 0 normiert und zeigen somit den relativen Zuwachs.

Im Vergleich der beiden Kulturbedingungen zeigte sich, dass es an Tag 7 im 2D Bereich zu keiner nennenswerten Veränderung gemessener Expressionswerte kam. Unter Verwendung der 3D Struktur hingegen war nach einer Woche osteogener Differenzierung ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der Expression von Kollagen I zu detektieren.

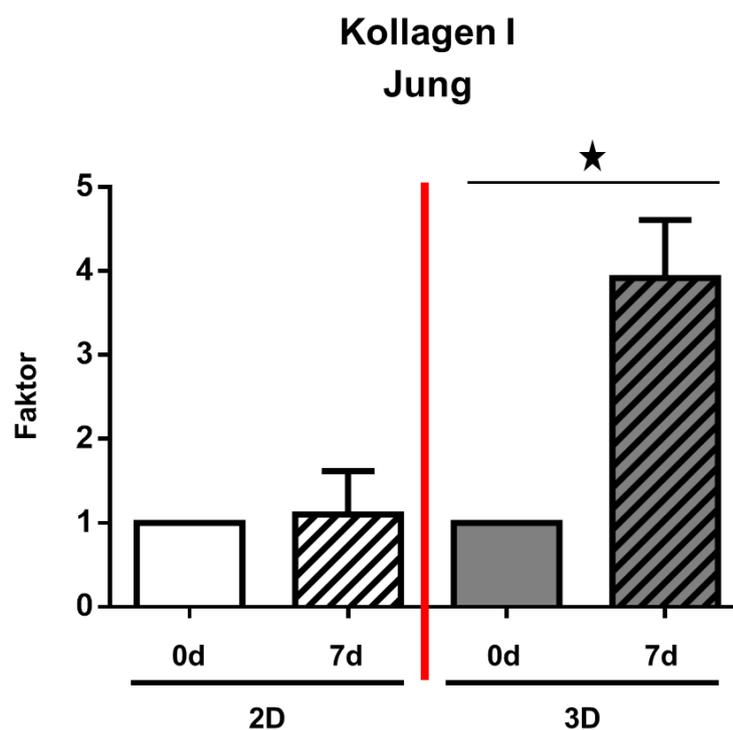


Abbildung 4-27: Expression Kollagen I bei jungen Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage (* = $p < 0,05$);

(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

Entsprechend den jungen Spendern wurden auch die Daten für die Gruppe der alten Spender erhoben und in unten gezeigter Abbildung 4-28 dargestellt.

Während sich auch hier im Bereich der 2D Differenzierung von Tag 0 zu Tag 7 keine nennenswerten Veränderungen ergaben, zeigten die Ergebnisse im 3D Bereich einen signifikanten Abfall ($p < 0,05$) von Tag 0 hin zum Ende der Differenzierung an Tag 7. Im Vergleich der beiden Differenzierungsarten ist der Expressionswert an Tag 7 nach 2D Differenzierung signifikant höher ($p < 0,05$) als der entsprechende Wert in 3D.

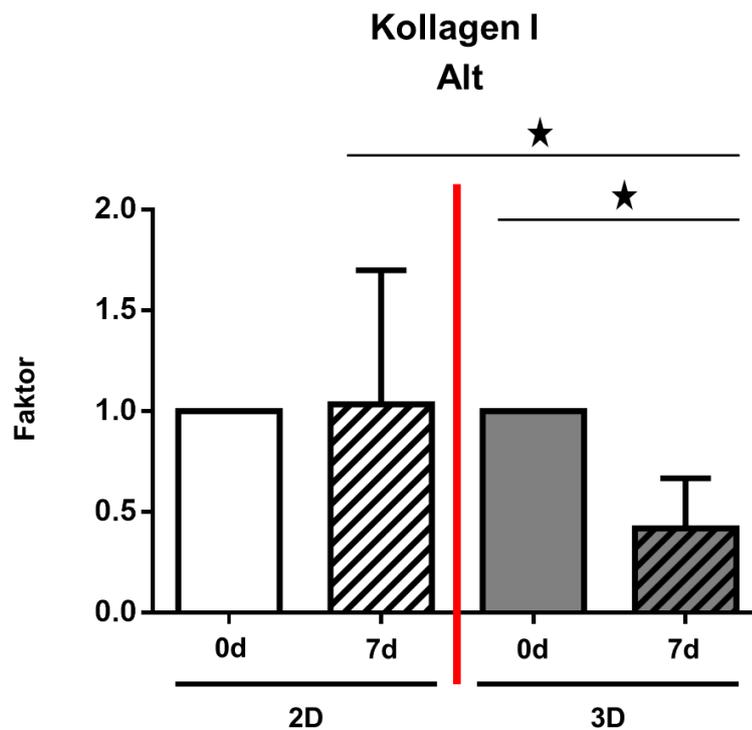


Abbildung 4-28: Expression Kollagen I bei alten Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage
(* = $p < 0,05$);
(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

4.5.5 Osteopontin

4.5.5.1 Primäre Osteoblasten

Osteopontin stellte den letzten analysierten Marker der osteogen differenzierten primären Osteoblasten dar.

Wie bisher beschrieben, wurden auch bei diesem Marker die primären Osteoblasten über eine Woche in 2D beziehungsweise in 3D Kultur differenziert.

Neben einem Ausgangswert an Tag 0 wurde der Expressionswert an Tag 7 zum Ende der Differenzierung erhoben. Für Osteopontin wurden diese nicht zusätzlich auf den Ausgangswert normiert, da dadurch der Verlauf im Graph besser dargestellt werden konnte.

Die unten aufgeführte Graphik (Abbildung 4-29) beinhaltet die 2D Daten auf der linken Hälfte der X-Achse gegenüber den 3D Daten auf der rechten Seite. Im Vergleich der beiden Verläufe zeigte sich im 2D Bereich ein starker Abfall der Expressionswerte ausgehend von einem hohen Ausgangswert an Tag 0 ($1,06 \pm 0,24$) hin zu einem signifikant niedrigeren Wert ($p < 0,05$) an Tag 7 ($0,09 \pm 0,01$). Im Gegensatz dazu startete die 3D Differenzierung mit einem etwas geringeren Ausgangswert ($0,54 \pm 0,37$), wies allerdings im Verlauf zu Tag 7 einen stetigen Zuwachs auf.

Somit lag das Maximum in dieser Differenzierungsart mit ($1,09 \pm 0,30$) an Tag 7, während es in der 2D Differenzierung an Tag 0 nachgewiesen wurde.

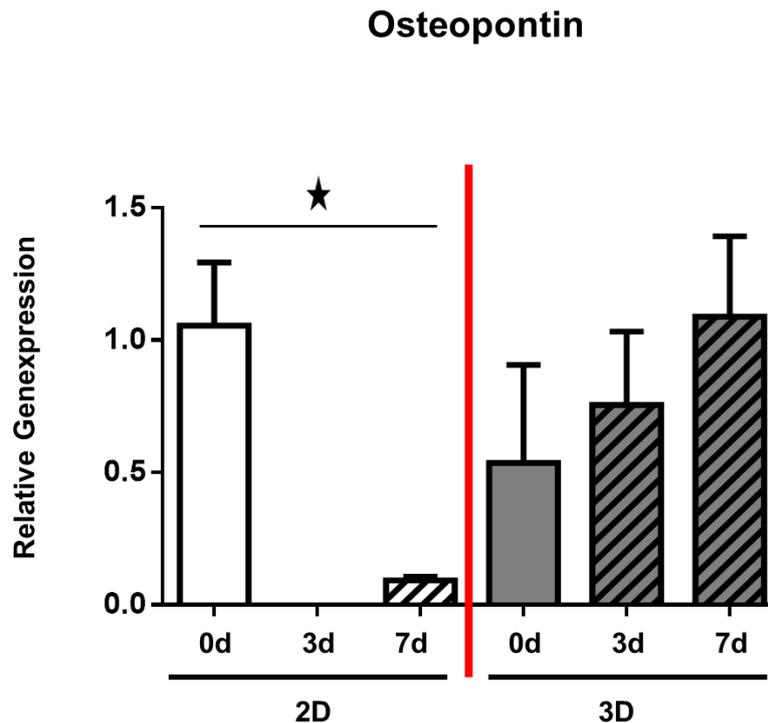


Abbildung 4-29: Osteopontinexpression bei primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage. (* = $p < 0,05$)

4.5.5.2 Ad-MSCs

Auch die osteogen differenzierten Ad-MSCs wurden hinsichtlich ihrer Expression von Osteopontin analysiert.

Ebenso wie bei den bisher beschriebenen Markern, lief die Differenzierung der beiden Altersgruppen jeweils in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage. Nach einem Ausgangswert an Tag 0 wurde ein Endwert an Tag 7 gemessen.

Die Abbildung 4-30 zeigt die Ergebnisse der jungen und alten Spender in 2D Differenzierung. Dabei wurde wie bisher die Gruppe „jung“ auf der linken Seite der X-Achse und die Gruppe „alt“ rechts aufgetragen. Die gemessenen Daten wurden auf den Ausgangswert an Tag 0 normiert.

Die jungen Spender zeigten in Bezug auf das Expressionsverhalten von Osteopontin keine Veränderung von Tag 0 zu Tag 7. Im Gegensatz dazu kam es bei den alten Spendern zu einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$) im Verlauf der einwöchigen

Differenzierung. Auch der Vergleich der an Tag 7 gemessenen Expressionswerte zeigte einen signifikant erniedrigten Wert ($p < 0,05$) der 3D Differenzierung gegenüber der 2D Differenzierung.

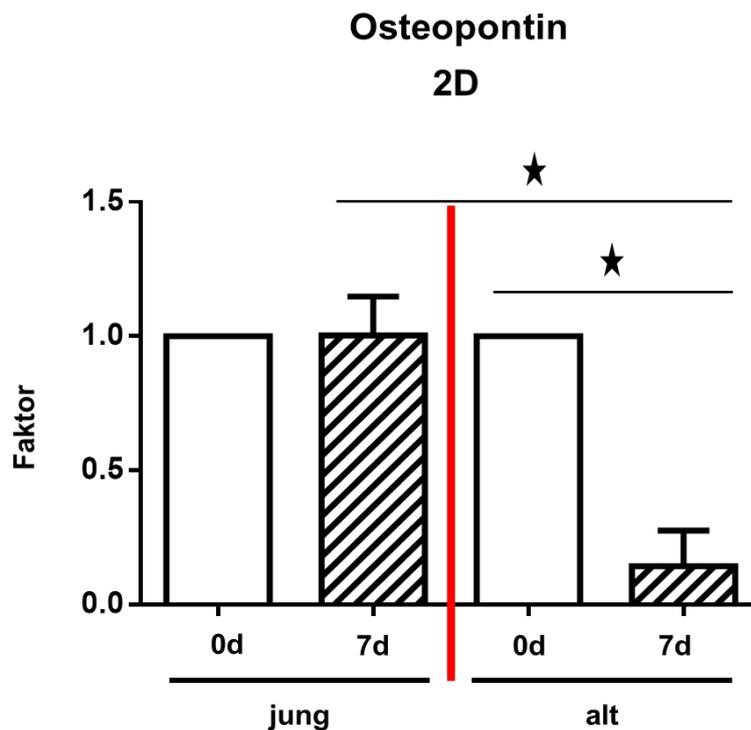


Abbildung 4-30: Osteopontinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 2D Differenzierung über 7 Tage (* = $p < 0,05$);
(Faktor: gemessene Expressionswerte jeweils normiert auf den Ausgangswert an Tag 0)

Die Ergebnisse der Expression von Osteopontin in der 3D Differenzierung wurden in unten dargestellter Graphik (Abbildung 4-31) vermerkt, deren Aufbau zu der oben gezeigten Graphik identisch ist. Um eine bessere Darstellung in der Graphik zu erzielen, wurden hierbei die gemessenen Daten nicht auf den Ausgangswert an Tag 0 normiert.

Auch hier zeigten die jungen Spender einen nahezu konstanten Verlauf von Tag 0 ($0,26 \pm 0,23$) hin zu Tag 7 ($0,16 \pm 0,05$) auf. Die alten Spender wiesen dagegen einen Anstieg hin zu Tag 7 ($7,34 \pm 11,53$) um den Faktor 2,2 im Vergleich zu ihrem Ausgangswert an Tag 0 ($3,39 \pm 5,10$) auf.

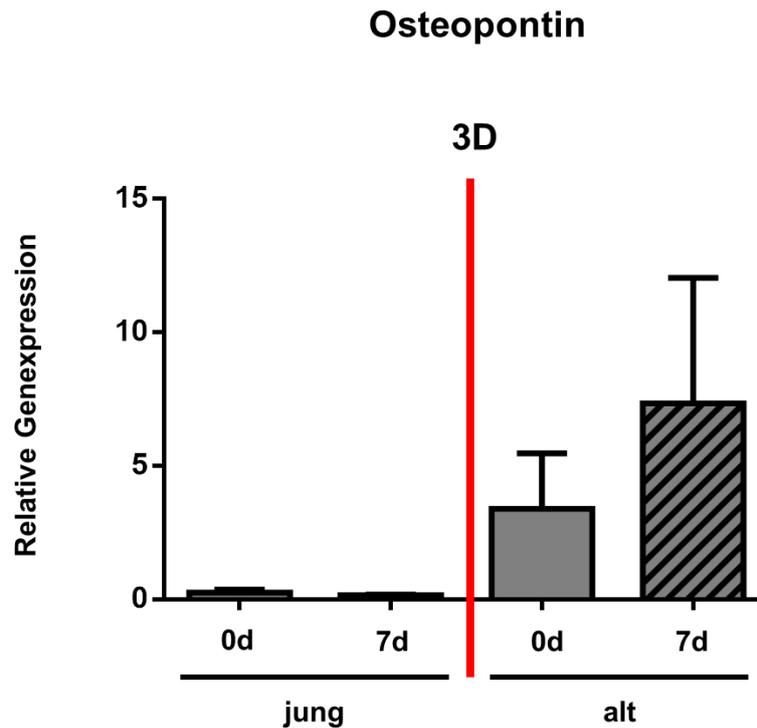


Abbildung 4-31: Osteopontinexpression bei jungen und alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung über 7 Tage

Die Abbildung 4-32 zeigt eine Übersicht aller Expressionswerte für Osteopontin ohne Normierung. Dabei stehen sich 2D (links) und 3D (rechts) Differenzierung über eine Woche gegenüber. Beide Differenzierungsarten weisen zudem eine Unterteilung für junge und alte Spender auf.

Neben den oben beschriebenen Auffälligkeiten war hier das um den Faktor 15,7 erhöhte Niveau der Expressionswerte der alten Spender an Tag 0 ($2,35 \pm 3,61$) in 2D Differenzierung gegenüber den jungen Spendern an Tag 0 ($0,15 \pm 0,10$) in 2D Differenzierung und ebenso die um den Faktor 13 erhöhten Expressionswerte der alten Spender in 3D Differenzierung an Tag 0 ($3,39 \pm 5,10$) gegenüber den jungen Spendern in 3D Differenzierung an Tag 0 ($0,26 \pm 0,23$) zu sehen. Im Unterschied zur 2D Differenzierung, die nachfolgend einen Abfall zu Tag 7 ($0,05 \pm 0,07$) aufwies, stiegen die beschriebenen hohen Ausgangswerte der alten Spender in 3D Differenzierung noch weiter bis zu ihrem Maximum an Tag 7 ($7,34 \pm 11,53$) an.

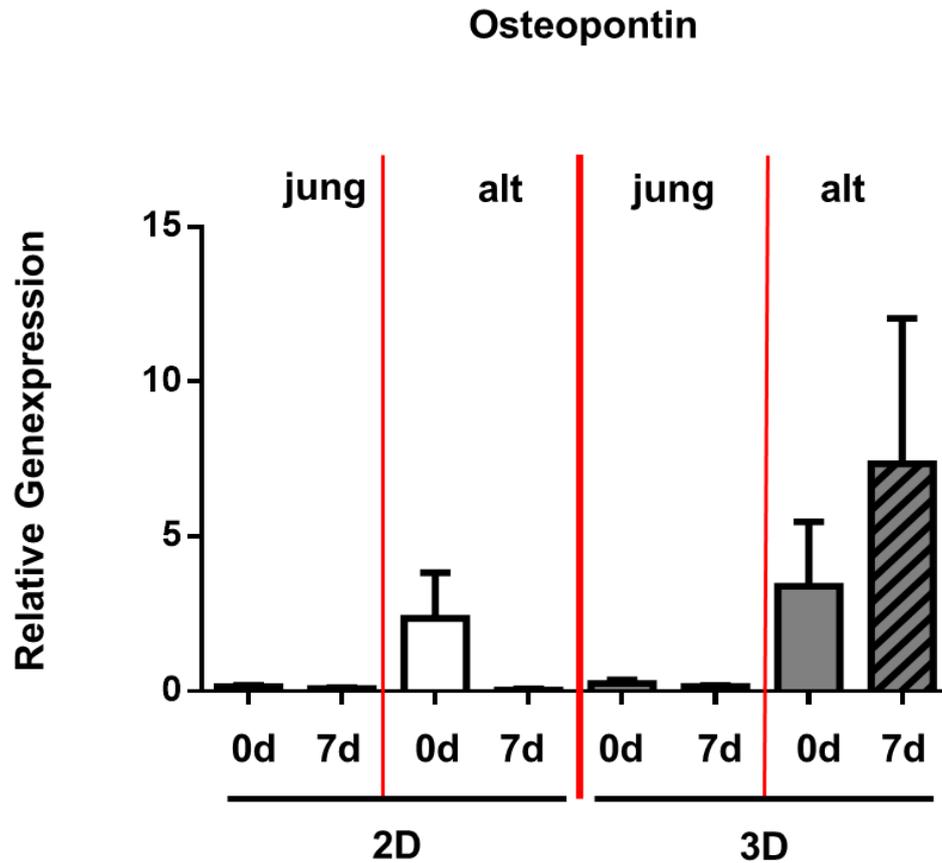


Abbildung 4-32: Osteopontinexpression junger und alter Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung über 7 Tage

4.6 Morphologische Veränderung der differenzierten Zellen

Einfach optisch zu detektierende, charakteristische Merkmale von primären Osteoblasten stellen neben der Plastikadhärenz die typische spindelförmige Morphologie und das fischzugartige Ausrichten der Zellen dar (Abbildung 4-33). Diese konnten visuell mithilfe eines Mikroskops während des Auswachsens und der Kultivierung überprüft werden. Während der Differenzierung blieb die Plastikadhärenz bis zu einem gewissen Zeitpunkt gegeben; anschließend kam es zur Ablösung meist des gesamten Zellverbandes. Auch morphologisch veränderten sich die differenzierenden Zellen. Lagen diese während der Kultivierung langgestreckt

nebeneinander, kam es in der Differenzierung zu einem Zusammenziehen der Zellkörper und der Bildung von „Zellnestern“ (Abbildung 4-34).

Auch die morphologische Veränderung der Ad-MSCs in Differenzierung von anfänglich ausgestreckten sternförmigen Zellen zu zusammengelagerten Zellformationen, die sich auch wie oben beschrieben teilweise als Zellverband vom Plastik lösten, konnten beobachtet werden. Diese Veränderungen wurden in regelmäßigem Abstand mikroskopisch dokumentiert.

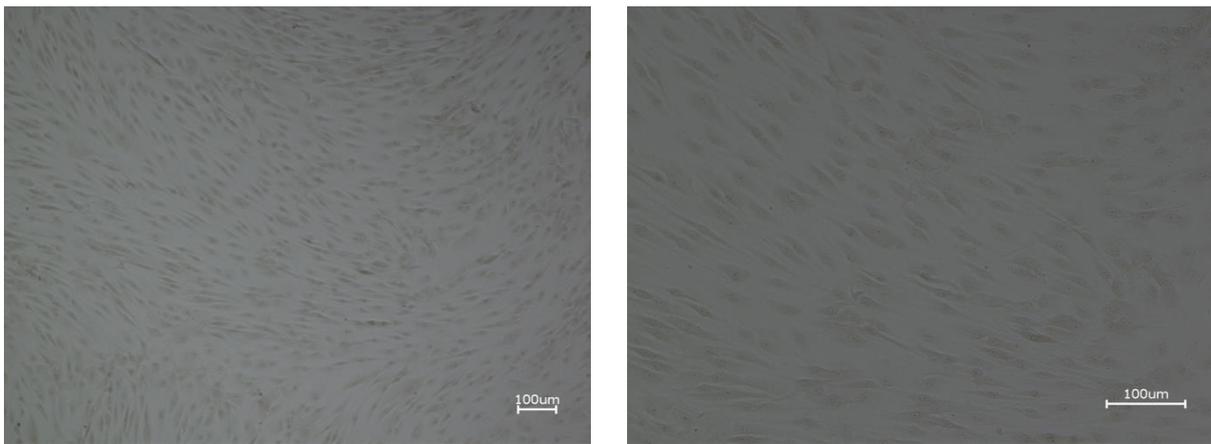


Abbildung 4-33: Mikroskopische Aufnahme der spindelförmigen Morphologie der primären Osteoblasten zu Beginn der Kultivierung

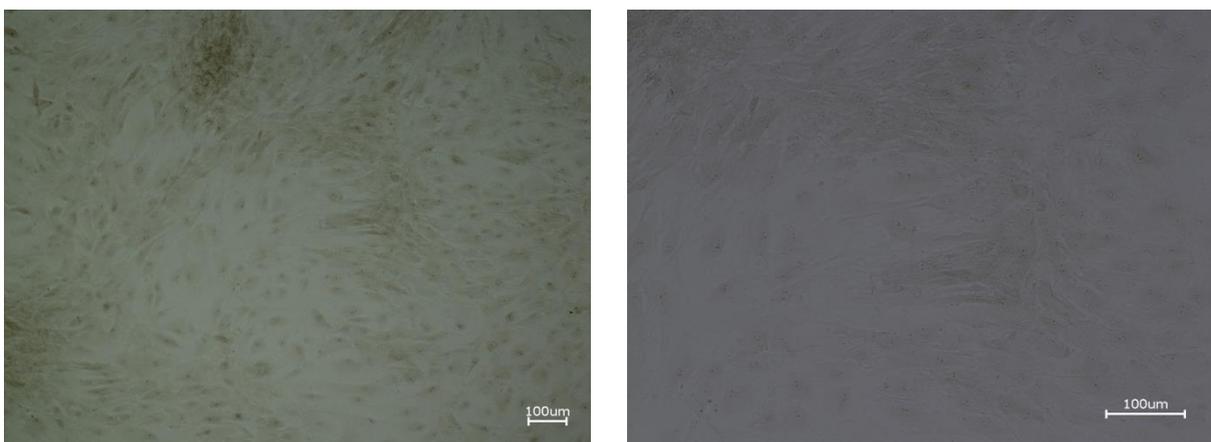


Abbildung 4-34: Typische morphologische Veränderungen der primären Osteoblasten bei osteogener Differenzierung mit Bildung von Zellnestern

5 Diskussion

Dieses Projekt ist vor dem klinischen Hintergrund entstanden, Ansätze zur Lösung der bekannten und größer werdenden therapeutischen Schwierigkeiten in der Alterstraumatologie zu analysieren und Ansätze für neue Entwicklungen zu schaffen.

In wenigen Worten lässt sich das klinische Problem wie folgt umreißen. Die Summe aus immer älter werdenden Menschen und einer beständig wachsenden Zahl dieser sorgt für eine Zunahme altersassoziierter Morbiditäten im Bereich vieler klinischer Fachrichtungen, so auch der Unfallchirurgie. Das klinische, unfallchirurgische Erscheinungsbild setzt sich dabei meist aus Frakturen aufgrund von Stürzen in Verbindung mit den oft vielfachen Komorbiditäten des Patienten zusammen. Als Folge davon wird trotz, oder gerade wegen, der sehr aufwendigen und langwierigen Therapie in den meisten Fällen eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten im Krankenhaus beobachtet. Ziel ist es deshalb neue, möglichst wenig invasive Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, die dem Patienten einen schnellen Genesungsprozess und damit verbunden eine frühestmögliche Entlassung zurück in sein gewohntes Umfeld ermöglichen.

Um speziell die traumatologischen Aspekte dieses Problems, also die eingeschränkte Frakturheilung des alten Patienten positiv zu entwickeln wurde dazu das große Feld des Tissue Engineerings als Grundlage verwendet, um auf bisher in der Literatur oder der Arbeitsgruppe bekannten Ansätzen aufzubauen und diese weiterzuentwickeln.

Ziel war es dabei sowohl primäre Osteoblasten als auch Ad-MSCs nach erfolgter Isolation in einer 2D Kultur zu vermehren, um sie anschließend osteogen zu differenzieren. Im Bereich der primären Osteoblasten lag das Augenmerk besonders auf einem Vergleich der 2D Differenzierung gegenüber der 3D Differenzierung. Auch bei Ad-MSCs, als alternative Zellquelle für osteogen differenzierbare Stammzellen, lag der Schwerpunkt zum einen auf dem Vergleich dieser beiden Differenzierungsarten, zum anderen auf den altersassozierten Unterschieden bei der Differenzierung dieser Zellen.

5.1 Differenzierungsanalyse

Der Differenzierungsnachweis der eingeschlossenen primären Osteoblasten und Ad-MSCs basiert auf standardisierten Verfahren und Methoden. Dabei sind sowohl Färbungen also auch Enzymnachweise und Expressionsanalysen auf molekularer Ebene durchgeführt worden. Die Abbildung 5-1 zeigt eine schematische Ausführung der durchgeführten Nachweise.

So ist die Mineralisierung der Zellen nicht nur durch die Alizarin Rot Färbung sondern zusätzlich durch Immunfluoreszenzfärbung und Genexpressionsanalysen mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion auf bestimmte osteogene Marker quantifiziert worden. Die Analyse der Alkalischen Phosphatase, als eines der in der Osteogenese am häufigsten verwendeten Enzyme, ist durch Aktivitätsnachweis und durch PCR-Analyse auf molekularer Ebene erfolgt.

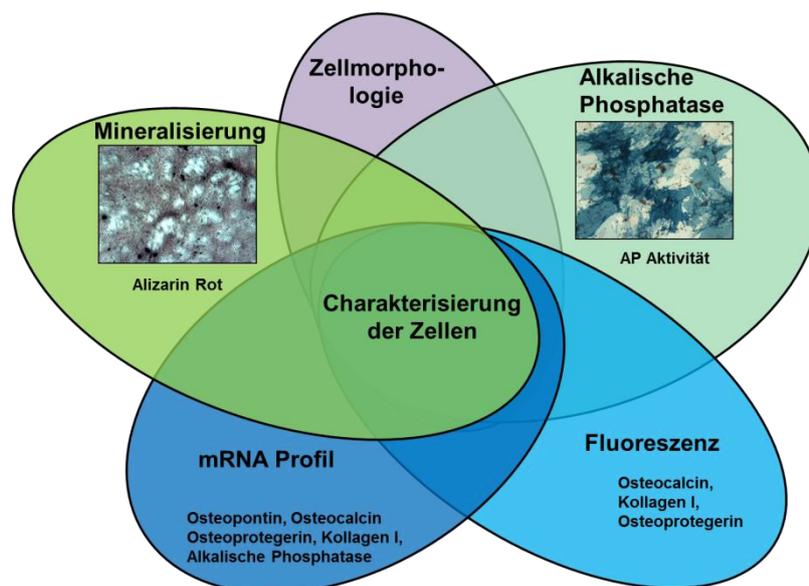


Abbildung 5-1: Schematischer Überblick der erbrachten Nachweismethoden im Rahmen der osteogenen Differenzierung

5.1.1 Alkalische Phosphatase

Die AP kommt im Körper in verschiedenen Organen vor. Das Herkunftsorgan bedingt dabei teilweise die Isoenzymform. So gibt es neben der Plazenta auch für den Darm eine spezifische Isoenzymform. Die dritte bekannte Isoenzymform ist gewebeunspezifisch und wird auch als "tissue non specific alkaline phosphatase" (TNSALP/TNAP) bezeichnet. Diese spielt im klinischen Alltag eine wichtige Rolle sowohl als Laborparameter in der Leberdiagnostik als auch im Knochenstoffwechsel, wo sie die vorherrschende Isoenzymform darstellt. Letzteres macht man sich im Rahmen der osteogenen Differenzierung zur Überwachung des Differenzierungsprozesses zu Nutzen. Ein positiver Nachweis lässt dabei auf eine ablaufende Differenzierung der Zellen mit Reifung und Kalzifizierung der Matrix schließen [Beck et al., 2000; Ehnert et al., 2011; Fedde et al., 1988; Kaunitz et al., 2008; Owen et al., 1990]. Dies beeinflusst die AP besonders durch ihre Eigenschaft, Kalziumphosphatgruppen abzuspalten, die wiederum eine Grundlage für die osteogenen Zellveränderungen darstellen [Golub et al., 2007; Gronthos et al., 1999]. Typischerweise stellt die AP einen frühen Marker der osteogenen Differenzierung dar, auf dessen initialen Anstieg, dessen Dauer gelegentlich Unterschiede aufweist, ein Abfall folgt, der in der Regel eine Zunahme der Zellmineralisierung und somit einen Übergang der Zelle in einen weiter differenzierten Zustand darstellt [Aubin et al., 1995; Donzelli et al., 2007; Jaiswal et al., 1997]

5.1.1.1 Aktivität und Genexpression der Alkalischen Phosphatase

Primäre Osteoblasten in 2D Differenzierung

Wie andere Arbeitsgruppen gezeigt haben, ist der typische Verlauf der Aktivitätsmessung der AP in der osteogenen 2D Differenzierung bei primären Osteoblasten ein Anstieg hin zum Maximum an Tag 7, gefolgt von einem Abfall hin zu Tag 14 [Stangenberg et al., 2005]. Diesen Verlauf können wir durch unsere Daten bestätigen.

Dazu passend stellen sich die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der AP mittels qPCR dar, die einen Anstieg über die gesamte Differenzierungsdauer von 7 Tagen aufweist. Somit zeigt sich in der Aktivitätsmessung das durch die hochregulierte Genexpression zu erwartende Ergebnis.

Primäre Osteoblasten in 3D Differenzierung

Im Hinblick auf die Aktivitätsmessung der AP in der 3D Differenzierung zeigen Stangenberg et al. eine konstante Zunahme der Messwerte von Tag 0 hin zu Tag 14, also über die gesamte Differenzierungsdauer auf [Stangenberg et al., 2005]. Hier unterscheiden sich die Ergebnisse dieses Projekts etwas. Während der Anstieg der Messwerte hin zu Tag 7 noch vergleichbar ist, stellt dieser den Maximalwert gefolgt von einem leichten Abfall hin zu Tag 14 dar.

Auf Ebene der Genexpression zeigt sich ein ähnlicher Verlauf im Vergleich der von uns gemessenen Werte und der Literatur [Stangenberg et al., 2005]. Auch hier erfolgt eine Zunahme beginnend von Tag 0 zu Tag 7. Der Anstieg in der Aktivitätsmessung erscheint hier somit als Ergebnis der gesteigerten Genexpression.

Bezogen auf die AP als Differenzierungsmarker, lässt der Nachweis einer hier gezeigten höheren Enzymaktivität zusammen mit den erhöhten Expressionswerte auf eine verstärkte osteogene Differenzierung in der 3D Differenzierung gegenüber der verglichenen 2D Differenzierung schließen.

Ad-MSCs in 2D Differenzierung

Die Aktivitätsmessung der AP bei Ad-MSCs zeigt bei jungen und alten Spendern einen vergleichbaren Verlauf. Anders als im Bereich der primären Osteoblasten liegt das Maximum nicht bereits an Tag 7, sondern der Anstieg erfolgt über die gesamte Differenzierungsdauer. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten, die sowohl bei humanen wie auch bei porcinen Ad-MSCs ein Maximum der AP-Aktivität an Tag 14 oder später beschreiben [Ardeshirylajimi et al., 2014; Juhasova et al., 2011].

Die entsprechende Genexpressionsanalyse weist auch hier wieder einen ähnlichen Verlauf zwischen den beiden beobachteten Altersgruppen mit einem Peak an Tag 3 auf. Die früh zu beobachtende Hochregulation des Gens kann im weiteren Verlauf in einem Aktivitätsanstieg des Enzyms nachvollzogen werden.

Auffällig ist, sowohl bezüglich der Aktivitätsmessung als auch der Genexpression, ein erhöhtes Niveau in der Gruppe der alten Zellen verglichen mit den jungen Ad-MSCs. Vergleichbare Ergebnisse werden auch von Khan et al. beschrieben, die ebenfalls eine leicht erhöhte AP-Aktivität bei alten Ad-MSCs gegenüber jungen Ad-MSCs nach osteogener Differenzierung über 21 Tage gemessen haben [Khan et al., 2009].

Ad-MSCs in 3D Differenzierung

Die Verläufe der Aktivitätsmessung der AP in 3D Differenzierung weisen Unterschiede von Tag 7 hin zu Tag 14 auf. Der Verlauf der alten Spender in diesem Parameter mit einem Anstieg über den gesamten Differenzierungszeitraum ist vergleichbar mit dem der Ad-MSC Spender in 2D Differenzierung und ist so in der Literatur sowohl für humane als auch für Ad-MSCs von Ratten in 3D Differenzierung beschrieben [Shih et al., 2006; Todo et al., 2013].

Auch die Genexpression der alten Spender in 3D Differenzierung weist einen ähnlichen Verlauf zu der oben beschriebenen 2D Differenzierung auf.

Anders gestaltet sich die vergleichende Analyse der Genexpression und der Enzymaktivität der jungen Spender in 3D Differenzierung. Als einzige Gruppe innerhalb der Ad-MSC Spender zeigt sich hier ein Anstieg der Genexpression über den gesamten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen, verbunden mit einem Peak in der Aktivitätsmessung schon an Tag 7. Diese Kombination ist in den Messungen dieser Arbeit typisch für die Differenzierung von primären Osteoblasten.

Der längere Anstieg der AP-Aktivität bei den alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung im Vergleich zu den jungen Ad-MSCs könnte im Sinne eines langsamer ablaufenden Differenzierungsprozesses erklärt werden.

Auffällig ist zudem, dass sich gerade im Bereich der Aktivitätsbestimmung der AP, auch in der 3D Differenzierung das bereits in der 2D Differenzierung beobachtete, erhöhte Niveau der alten Ad-MSCs gegenüber der jungen Gruppe fortsetzt.

Dies erscheint auch im Kontext mit den Arbeiten von Khan et al. [Khan et al., 2009] und Gabbay et al. [Gabbay et al., 2006] schlüssig, die einerseits eine vergleichbare oder leicht erhöhte AP-Aktivität bei alten Zellen im Vergleich mit jungen Zellen nach osteogener Differenzierung und andererseits eine Verbesserung der osteogenen Differenzierung durch den Einsatz von 3D Strukturen beschreiben.

5.1.1.2 Alkalische Phosphatase - Färbung der Ad-MSCs in 2D und 3D Differenzierung

Zusätzlich zu der oben genannten Aktivitätsmessung und Genexpressionsanalyse, sollte eine Färbung zum visuellen Nachweis der AP durchgeführt werden. Bereits im Vorversuch zeigte sich bei direkter Färbung der Zellen eine erschwerte Darstellung der Ergebnisse in der 3D Kultur. Bedingt durch den Versuchsaufbau und die geringe Größe des Scaffolds erfolgte der Versuch, die bereits SRB gefärbten Zellen nach erneutem Waschen mit der Färbung auf AP nachzufärben. Dies brachte jedoch keine verwertbaren Ergebnisse ein, woraufhin dieser Nachweisparameter im weiteren Verlauf des Projektes entfiel.

5.1.2 Mineralisierung

5.1.2.1 Alizarin Rot

Mittels AR-Färbung kann die Mineralisierung der Zellmatrix, genauer gesagt die Kalzifizierung dieser, nachgewiesen werden [Lin et al., 2014]. Sie dient in unserem Projekt dazu, einen Überblick über den gesamten Mineralisierungsprozess zu bekommen, um anschließend die einzelnen osteogenen Marker mittels Expressionsanalyse oder Immunfluoreszenzfärbung gezielt analysieren zu können.

Primäre Osteoblasten

Die Färbung der primären Osteoblasten im 2D Bereich zeigt einen Peak bereits an Tag 7, während in der 3D Differenzierung ein konstanter Zuwachs der Mineralisierung über den beobachteten Zeitraum zu sehen ist. Somit entspricht der Verlauf der 3D Differenzierung dem erwarteten Ergebnis. Vergleichbare Ergebnisse werden in der Literatur unter anderem von Reich et al. beschrieben, die bei osteogener 2D Differenzierung primärer Osteoblasten einen Mineralisationsanstieg über 15 Tage beobachten konnten [Reich et al., 2015]. Eine Erklärung für den Unterschied zu den hier erhobenen Ergebnissen könnte in dem langen Differenzierungszeitraum liegen, der bei vielen Spendern zu einem Ablösen der Zellen von der Oberfläche des Zellträgers führte und daraus folgend ein standardisiertes Färben stark erschwerte. Ein anderer Erklärungsansatz könnte ein, durch den Einsatz von 3D Strukturen stattfindender, verlängerter Reifungsprozess der Zellen darstellen, welcher in 2D Differenzierung ausbleibt und somit zu einem Absinken der Mineralisierungsparameter führt.

Ad-MSCs

Bei der AR Färbung der Ad-MSCs zeigt sich bis auf die jungen Spender in 2D Differenzierung ein sehr homogener Verlauf. Beide Gruppen in 3D Differenzierung weisen einen konstanten Zuwachs der Zellmineralisierung über 14 Tage auf, was vom Verlauf her der Positivkontrolle mit primären Osteoblasten entspricht und auch so von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden ist [Lin et al., 2014]. Auch die alten Zellen in 2D Differenzierung weisen diesen angestrebten Verlauf auf.

Lediglich die oben genannte Gruppe der jungen Spender in 2D Differenzierung zeigt nach einem Maximum an Tag 7 einen Abfall hin zu Tag 14. Auch hier liegt das Ablösen der Zellen vom Plastikträger als wahrscheinlichste Ursache nahe.

Bezogen auf den Vergleich von jungen und alten Spendern präsentiert sich auch hier ein erhöhter Marker der osteogenen Differenzierung im Bereich der alten Zellen. Besonders im Bereich der 3D Differenzierung weisen die genannten Ad-MSCs bei gleichem Verlauf erhöhte Werte gegenüber den jungen Spendern auf.

In Hinblick auf die alte Spendergruppe führt auch hier der Einsatz einer 3D Struktur zu verbesserten Ergebnissen gegenüber der 2D Differenzierung, was in Bezug auf die AR-Färbung auch von Lin et al. beschrieben ist [Lin et al., 2014]. Diese Arbeitsgruppe zeigt eine signifikant erhöhte Mineralisierung der osteogen differenzierten Ad-MSCs an Tag 14 und 21 durch Einsatz einer 3D Kultur gegenüber einer 2D Kultur.

5.1.2.2 Osteogene Marker auf molekularer Ebene

5.1.2.2.1 Osteopontin

Osteopontin stellt neben Kollagen einen weiteren Vertreter der organischen Knochenmatrix dar. Strukturell besitzt es Kalziumbindestellen und weist Ähnlichkeit zu BSP (bone sialoprotein) auf [Aubin et al., 1995; Butler 1989]. *In vivo* wird das in vielen Geweben vorkommende Strukturprotein unter anderem durch Vitamin D₃ stimuliert. Bei der induzierten osteogenen Differenzierung wird eine verstärkte Expression dieses frühen Markers besonders durch AP, Dexamethason und β -Glycerolphosphat erreicht [Beck et al., 2000; Chen et al., 1996; Denhardt et al., 1998; Frank et al., 2002; Sodek et al., 2000].

Ad-MSCs

Bei den eingeschlossenen Ad-MSCs weisen fast alle Gruppen ihr Maximum bereits zu Beginn auf, gefolgt von einem Abfall hin zum Ende der Differenzierung. Dies entspricht dem beobachteten Verlauf der primären Osteoblasten in 2D Differenzierung.

Lediglich die Gruppe der alten Spender in 3D Differenzierung zeigt im Gegensatz dazu einen Anstieg hin zu Tag 7, was genau dem Verlauf der Osteoblasten in 3D Differenzierung entspricht.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen zum Expressions-Verlauf von Osteopontin im Rahmen der osteogenen Differenzierung. Beide hier beschriebenen

Verläufe für Ad-MSCs sind zu finden. So haben Valenti et al. und andere Arbeitsgruppen einen Anstieg während der gesamten Differenzierung beschrieben [Shin et al., 2004; Temenoff et al., 2004; Valenti et al., 2008], während andere Autoren auf einen starken Abfall der Expressionswerte im Rahmen der Differenzierung hinweisen [Potier et al., 2007; Romero-Prado et al., 2006].

Auch speziell im Bereich der 3D Differenzierung von primären Osteoblasten ist ein Anstieg zu Beginn der Differenzierung zumindest bis Tag 3 beschrieben, wobei der anschließende Abfall der Expressionswerte auf einen Reifungsprozess der differenzierten Zellen zurückgeführt wird [Stangenberg et al., 2005]. Somit kann für die hier gezeigten Ergebnisse gefolgert werden, dass die 3D Struktur bei Osteoblasten und alten Ad-MSCs Spendern einen längeren Differenzierungsprozess bewirkt und der, in den anderen Zellgruppen früher einsetzende Abfall, dadurch hinausgezögert werden kann.

Auch für die Expression von Osteopontin lässt sich bei der vergleichenden Betrachtung der jungen und alten Ad-MSCs erneut ein erhöhtes Expressionsniveau bei der alten Zellgruppe feststellen, unabhängig von ihrer Differenzierungsart. Dies bestätigt die Ergebnisse der bereits beschriebenen Nachweismethoden in diesem Projekt.

5.1.2.2.2 Kollagen I

Kollagen I ist ein im Binde- und Stützgewebe ubiquitär vorkommendes Strukturprotein, das von Fibroblasten und Osteoblasten gebildet wird und zur Familie der Glykoproteine gezählt wird. Nach Glykosylierung und Vitamin-C-abhängiger Hydroxylierung des Prokollagens lagern sich 3 Kollagen- α -Ketten über Disulfidbrücken zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammen. Anschließend erfolgt die Sekretion der Tripelhelix in den Extrazellulärraum und nach Bildung des Tropokollagenmoleküls erfolgt die Zusammenlagerung dieser zu Kollagenfibrillen. Dieses, im Aufbau komplex regulierte Protein, stellt knapp 90% der organischen extrazellulären Matrix des Knochens und einen häufig verwendeten osteogenen Marker dar [Ducy 2000; Hauser 2008].

Osteoblasten und Ad-MSCs

Ein Abfall der Kollagenexpression während der osteogenen Differenzierung, wie in dieser Studie im Bereich der alten Ad-MSCs in 3D Differenzierung gezeigt, wird sowohl von Pullisaar et al. als auch von Stangenberg et al. beschrieben [Pullisaar et al., 2013; Stangenberg et al., 2005]. Als Ursache wird einerseits die hemmende Wirkung von Glukokortikoiden [Delany et al., 1995], andererseits der Übergang der unreifen Zelle in eine differenzierte, reifere Zellform, wie z.B. vom primären Osteoblasten in einen reifen Osteoblasten [Stein et al., 1996] diskutiert.

Der Anstieg der Expressionswerte im Bereich der primären Osteoblasten und jungen Ad-MSCs in der 3D Differenzierung im Vergleich zu dem gezeigten, konstanten Verlauf der entsprechenden Gruppen in 2D Differenzierung, lässt sich am ehesten auf den Einsatz der 3D Strukturen zurückführen. So konnten auch Lin et al. [Lin et al., 2014] durch den Einsatz von 3D Strukturen erhöhte Expressionswerte bei Kollagen I im Vergleich zur 2D Differenzierung zeigen. Der trotz 3D Kultur stattgefundenen Rückgang bei alten Ad-MSCs könnte wie oben beschrieben im Zusammenhang mit einem bereits abgeschlossenen Reifungsprozess der Osteoblasten erklärt werden. Die Erhebung weiterer Daten zu weiteren Zeitpunkten würde eine bessere Interpretation des Verlaufes zulassen.

5.1.2.2.3 Osteoprotegerin und Osteocalcin

Die Expressionsdaten von Osteoprotegerin, das eine wichtige Rolle bei der Modulation von Knochenauf- und -abbau über seine hemmende Wirkung auf die Osteoklastenbildung [Veronesi et al., 2011] besitzt, zeigen zwei Besonderheiten. Bei den analysierten Osteoblasten führt der Einsatz der 3D Struktur zu einem starken Anstieg der Genexpression hin zu Tag 7. Zudem zeigt die 2D Differenzierung der Ad-MSCs ein erhöhtes Expressionsniveau der alten Spender gegenüber den jungen Spendern.

Vergleichbare Ergebnisse mit gleichen oder leicht erhöhten Expressionswerten der alten Spender gegenüber den jungen Spendern konnten Khan et al. [Khan et al., 2009] für einen anderen typischen osteogenen Marker, Osteocalcin zeigen.

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung stellt Osteocalcin einen späten Marker dar [Köllmer et al., 2013; Miron et al., 2012]. Die Ursache des gezeigten Abfalls der Osteocalcinexpression bei den alten Gruppen sowohl in der 2D als auch in der 3D Differenzierung hin zu Tag 7, kann in einer schneller abgeschlossenen osteogenen Differenzierung gesehen werden. Dahingehend passen auch die Expressionswerte der AP, als frühen osteogenen Marker, die sowohl in der 2D als auch in der 3D Differenzierung bei alten Ad-MSCs ihr Maximum bereits an Tag 3 aufweisen mit nachfolgendem Abfall hin zu Tag 7. Dies müsste durch einen längeren Beobachtungszeitraum oder engmaschigere Expressionsanalysen in weiteren Arbeiten überprüft werden.

5.1.3 Immunfluoreszenzfärbung der primären Osteoblasten in 2D und 3D Differenzierung

Vergleicht man die in Kapitel 4.4 beschriebenen Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung mit den entsprechenden Expressionsanalysen der osteogenen Marker, so zeigen sich leichte Unterschiede. Während die Bilder der Färbungen eher eine Zunahme der Signalstärke sowohl für Kollagen I als auch für Osteocalcin im Verlauf der Differenzierung aufweisen, weist die Expressionsanalyse eher einen konstanten Verlauf der Werte über eine Woche auf.

Beachtet man jedoch, dass es sich bei den Färbungen um eine Stichprobe handelt, bei der keine Normierung auf die Zellzahl durchgeführt wurde und die als Ziel eher eine Visualisierung der Zelldifferenzierung hat und für sich stehend nicht allein als Quantifizierung verwendet werden kann, stehen diese Ergebnisse nicht im Widerspruch zueinander.

Zudem wird auch in der Literatur von Shafiee et al. eine Diskrepanz zwischen einer zunehmenden Mineralisierung der Zellmatrix einerseits und einer nicht kongruent dazu verlaufenden Genexpression andererseits beschrieben [Shafiee et al., 2011]. Um diese molekularen Prozesse besser zu verstehen, bedarf es noch weiterer Arbeiten.

5.1.4 Zellmorphologie

Während der osteogenen Differenzierung von Ad-MSCs und primären Osteoblasten, stellt die Veränderung der Zellmorphologie einen weiteren, visuell überprüfbaren Nachweisparameter dar. In dieser Arbeit zeigt sich eine Entwicklung der zunächst spindelförmigen primären Osteoblasten, die meist parallel zueinander ausgerichtet sind, hin zu kuboidförmigen Zellen, die sich in unterschiedlich großen Zellformationen zusammenlagern. Auch Ad-MSCs verändern ihr initial sternförmiges Erscheinungsbild im Verlauf der Differenzierung hin zu großen, auch aus eher kuboidförmigen Zellen bestehenden Zellaggregaten. Ähnliche Veränderungsprozesse der Zellmorphologie im Verlauf der osteogenen Differenzierung sind in der Literatur sowohl für primäre Osteoblasten [Stangenberg et al., 2005], als auch für Ad-MSCs [Ding et al., 2013] und andere Zellarten, zum Beispiel den BMSCs, beschrieben [Donzelli et al., 2007; Jaiswal et al., 1997; Juhasova et al., 2011].

5.2 Scaffold

Der Scaffold wurde für die entsprechenden Differenzierungsnachweise geviertelt. Diese händisch durchgeführte Teilung erfolgte so genau wie möglich, exakt gleichgroße Viertel und somit eine exakt gleiche Zellzahl auf jedem Viertel konnten dabei aufgrund des Schneideverhaltens der 3D Struktur nicht garantiert werden.

Eine weitere Erklärung für eine Abweichung der Zellzahl in den unterschiedlichen Teilen der 3D Struktur liegt in der Methode der Zellbesiedelung. Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, wurden die Zellen in Suspension ausplattiert. Anders als bei der 2D Kultur konnten aufgrund des Scaffolds die Zellverteilung oder das Zellwachstum nicht visuell überprüft werden.

Auch bei der Durchführung von Färbungen zum Nachweis der Mineralisierung oder des Proteingehaltes wies die 3D Kultur Besonderheiten auf. So mussten die in

unserer Arbeitsgruppe standardisierten Färbeprotokolle verändert werden, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen. Gerade das Lösen der Farbstoffe aus dem Scaffold bzw. den darin befindlichen Zellen erwies sich als schwierig. So konnte trotz Verdopplung der Anzahl der Waschgänge häufig keine völlige Farbfreiheit in der Kultur, wie bei der SRB-Färbung erforderlich, erzielt werden. Dies machte eine Normierung der Extinktionswerte bei Ad-MSCs auf den durch die SRB-Färbung ermittelten Proteingehalt nicht möglich und war in Verbindung mit der ungenauen Zellzahl der Grund für eine Darstellung von normierten Werten.

Nicht zuletzt erforderte die 3D Kultivierung eine besonders große Zellzahl, was sowohl große Gewebemengen für die Isolation als auch lange Kultivierungszeiten der Zellen erforderte, um eine entsprechend große Zellzahl in frühen Passagestufen differenzieren zu können.

5.3 Spenderzahl

Zuletzt muss bei Auswertung und Interpretation der erzielten Daten die geringe Spenderzahl im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt werden. So muss in Zusammenschau mit weiteren Arbeiten und der dadurch generierten größeren Fallzahl überprüft werden, ob sich die hier erhobenen Daten bestätigen lassen.

6 Zusammenfassung

Die klinische Grundlage für diese Arbeit war das unfallchirurgisch immer bedeutendere, weil u.a. stark wachsende Gebiet der Alterstraumatologie. In Zusammenschau der klinischen Herausforderungen, wie den einerseits häufig komplexeren Frakturen und der altersassoziierten Morbidität des Patienten andererseits, erfordert dies optimale Behandlungsmethoden, insbesondere auch operativ, um dem betroffenen Patienten die Chance zu ermöglichen, ein eigenständiges Leben nach dem Trauma fortzuführen. Dazu müssen die aktuellen Therapieoptionen beständig weiterentwickelt und neu überdacht werden. Einen Bereich der Therapieerweiterung stellt dabei das Tissue Engineering dar, welches auch die Grundlage dieser Arbeit bildet. Zusammengefasst war das Ziel dieses Projektes Ad-MSCs als mögliche Spenderquelle osteogener Zellen zu kultivieren und ihre osteogene Differenzierbarkeit im Hinblick auf das unterschiedliche Alter zu quantifizieren. Darüber hinaus sollte die Optimierung der osteogenen Differenzierung durch Verwendung von 3D Strukturen insbesondere der alten Ad-MSCs, aber auch der anderen verwendeten Zellen, also primärer Osteoblasten und junger Ad-MSCs, untersucht werden.

Auf Grundlage der in diesem Projekt erhobenen Daten lässt sich hinsichtlich des osteogenen Differenzierungsverhaltens von Ad-MSCs die Schlussfolgerung ziehen, dass eine osteogene Differenzierung von alten Ad-MSCs nicht nur möglich ist, sondern sich diese, in dem überwiegenden Teil der gemessenen Parameter, dem Differenzierungsverhalten von jungen Ad-MSCs ebenbürtig oder teilweise als überlegen darstellt. Zunächst konnte durch visuelle Kontrolle die ablaufende osteogene Differenzierung aufgrund der veränderten Zellmorphologie von eher sternförmig hin zu kuboidförmig (Ad-MSCs) nachgewiesen werden. Hinsichtlich der AP-Aktivität und Genexpression wurden höhere Messwerte bei Ad-MSCs von alten Spendern detektiert. Auch die AR-Färbung bestätigte oben beschriebene Beobachtung. Im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf lässt der Verlauf der Genexpression von z.B. Kollagen I den Schluss zu, dass die Differenzierung bei alten Spendern, unabhängig der Differenzierungsart, tendenziell früher abläuft als bei jungen Spendern.

Auch der Einsatz von 3D Strukturen brachte bei einer Vielzahl der osteogenen Differenzierungsparameter verbesserte Ergebnisse gegenüber einer 2D Differenzierung bei Ad-MSCs und primären Osteoblasten hervor. Die verlängerte Expression von Osteopontin bei beiden Zellgruppen lässt auf einen längeren Reifungsprozess der Zellen schließen. Zudem wurde eine vermehrte AP-Aktivität, eine vermehrte Kollagenexpression und ein höherer AR-Anstieg bei Verwendung der 3D Struktur gemessen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann auf eine Verbesserung der osteogenen Zelldifferenzierung durch Einsatz von 3D Strukturen geschlossen werden. Zudem ergibt sich aus dem guten osteogenen Differenzierungspotential besonders alter Ad-MSCs ein interessanter Ansatz, um die unfallchirurgischen Therapiemöglichkeiten gerade im Bereich der Alterstraumatologie weiterentwickeln zu können.

7 Ausblick

Wie eingangs der Arbeit beschrieben, stellen die MSCs eine große inhomogene Zellpopulation dar, was nicht nur an der großen Anzahl der beschriebenen, typischen Oberflächenmarker, sondern auch an den unterschiedlichen Differenzierungskapazitäten in Abhängigkeit von der Herkunft der Zelle zu sehen ist. Besonders interessant für die zukünftige Weiterentwicklung der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse, ist einerseits das Zellaltern der MSCs. Dieses sorgt dafür, dass in vielen Studien MSCs die Voraussetzung als geeignete Zellgruppe für die regenerative Medizin abgesprochen wird. Des Weiteren stellen aber auch andere Parameter, wie z.B. die Verwendung von 3D Strukturen sowie nicht zuletzt der Patient selbst entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche Weiterentwicklung des Tissue Engineerings dar.

Zellaltern

Zellaltern wird grundsätzlich nach verschiedenen Kriterien bewertet, wie unter anderem Veronesi et al. zeigen [Veronesi et al., 2011]. So wird das Proliferationsverhalten [Stolzing et al., 2008; Zhou et al., 2008], die Differenzierungskapazität [Abdallah et al., 2006; Justesen et al., 2002; Stenderup et al., 2001] oder das Mineralisierungsverhalten [Stenderup et al., 2003] untersucht. Auch spezifische Marker wie β -Galactosidase [Stenderup et al., 2003; Zhou et al., 2008] oder die in Kapitel 1.6.1.3.6 angesprochene abnehmende Telomerlänge [Mareschi et al., 2006; Wagner et al., 2009] und das Genexpressionsverhalten [Leskela et al., 2003; Wagner et al., 2009] werden beobachtet, um Aussagen zum Seneszenzprozess der Zellen treffen zu können.

Wie oben erwähnt, gibt es eine Vielzahl Stellen in der Literatur, die auf abnehmendes Proliferationsverhalten und auch reduziertes Differenzierungspotential bei alten bzw. bei kultivierten MSCs in einer hohen Passage verweisen [Baxter et al., 2004; Kretlow et al., 2008; Mareschi et al., 2006; Mueller et al., 2001; Zhou et al., 2008].

Entscheidend ist dabei jedoch zu unterscheiden, welchen Ursprungs diese Zellen sind und welche Art der Differenzierung stattgefunden hat. Denn BMSCs weisen durchaus unterschiedliche Eigenschaften zu Ad-MSCs auf. So zeigt sich in der Literatur, dass die bei kultivierten BMSCs *in vitro* bekannte Abnahme sowohl der Proliferationskapazität als auch der Verdopplungszeit der Population, bei Ad-MSCs wesentlich geringer ausfällt [Izadpanah et al., 2006; Kern et al., 2006].

Neben der reinen Proliferation wird auch eine Abnahme des osteogenen Differenzierungspotentials der Ad-MSCs im Verhältnis zu BMSCs kontrovers diskutiert. So beschreiben Shi et al. eine deutlich kleinere Verringerung des osteogenen Differenzierungspotentials der Ad-MSCs im Alter [Shi et al., 2005]. Andere Arbeitsgruppen beobachteten gleichbleibende oder verbesserte Ergebnisse bei alten Ad-MSCs in osteogener Differenzierung [Chen et al., 2012; Ding et al., 2013; Khan et al., 2009; Pachon-Pena et al., 2011; Zhu et al., 2009].

In Bezug auf die angesprochene Art der Differenzierung zeigt der Großteil der veröffentlichten Arbeiten zwar eine Abnahme der osteogenen Differenzierungskapazität bei BMSCs mit dem Alter jedoch eine gesteigerte adipogene Differenzierungsfähigkeit bei BMSCs von Spendern mit Osteoporose [Dalle Carbonare et al., 2009; Rodriguez et al., 2008; Stringer et al., 2007].

Vor diesem Hintergrund, dass es bei oben genannten Studien zu keiner Abnahme der osteogenen Differenzierungskapazität mit zunehmendem Alter der Ad-MSCs kam, werden die guten Differenzierungsergebnisse der alten Spender in dieser Arbeit durchaus bestärkt und stellen eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Arbeiten dar.

Art der 3D Struktur und „Der Patient“

Neben dem spezifischen Verhalten der Zellen, wie dem oben beispielhaft beschriebenen Zellaltern, stellen die unterschiedlichen Eigenschaften der 3D Strukturen und auch die genaue Kenntnis des Frakturmilieus eine entscheidende Voraussetzung für einen zukünftigen Einsatz der MSCs als Therapieverbesserung *in vivo* dar.

Dabei spielt die Art des Scaffolds nicht nur im Hinblick auf die erforderliche Biokompatibilität eine wichtige Rolle. Auch das Risiko des Sauerstoff- und Mineralstoffmangels im Zentrum dieser Strukturen haben je nach Art einen erheblichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

Zudem wird es von großer Bedeutung sein, nicht nur das genaue Milieu im Gebiet der Fraktur, welches das Zielgebiet des Einsatzes von Stammzellen zur Therapieoptimierung sein soll, genauer zu verstehen, sondern auch die von Patient zu Patient individuellen Komorbiditäten und deren Wirkung und Einfluss auf die Stammzellen verstehen zu können, um am Ende eine für den einzelnen Patienten optimale Therapie gestalten zu können. Dies zu gewährleisten wird auch für die Zukunft der Antrieb nicht nur in der Unfallchirurgie, sondern in allen Gebieten der Medizin sein.

8 Literatur

1. Abdallah, B.M., Haack-Sorensen, M., Fink, T., Kassem, M. Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone* (Vol) 39 (2006) 181-188
2. Aggarwal, S., Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* (Vol) 105 (2005) 1815-1822
3. Alegre-Lopez, J., Cordero-Guevara, J., Alonso-Valdivielso, J.L., Fernandez-Melon, J. Factors associated with mortality and functional disability after hip fracture: an inception cohort study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* (Vol) 16 (2005) 729-736
4. Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., Wright, N.A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* (Vol) 406 (2000) 257
5. AQUA-Institut (2014) Bundesauswertung proximaler Femurfrakturen. (https://www.sgg.de/downloads/Bundesauswertungen/2014/bu_Gesamt_17N1-HUEFT-FRAK_2014.pdf) [17. Juli 2019]
6. Ardeshiryajimi, A., Soleimani, M., Hosseinkhani, S., Parivar, K., Yaghmaei, P. A comparative study of osteogenic differentiation human induced pluripotent stem cells and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell journal* (Vol) 16 (2014) 235-244
7. Aubin, J.E., Liu, F., Malaval, L., Gupta, A.K. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* (Vol) 17 (1995) 77S-83S
8. Avenell, A., Handoll, H.H. Nutritional supplementation for hip fracture aftercare in older people. *The Cochrane database of systematic reviews* (Vol) (2006) CD001880
9. Bartl, R., Bartl, C., Mutschler, W. Diagnosis and therapy of osteoporosis. Strategy for effective treatment after fragility fractures. *Der Unfallchirurg* (Vol) 106 (2003) 526-541
10. Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., Bellantuono, I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* (Vol) 22 (2004) 675-682
11. Beck, G.R., Jr., Zerler, B., Moran, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol) 97 (2000) 8352-8357
12. Bellows, C.G., Heersche, J.N., Aubin, J.E. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Developmental biology* (Vol) 140 (1990) 132-138
13. Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., Rachmilewitz, J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* (Vol) 105 (2005) 2214-2219
14. Bio-Rad Laboratories (2016) SYBR® Green for qPCR (<http://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>) [21. Juli 2016]

15. Bischoff-Ferrari, H.A., Dawson-Hughes, B., Staehelin, H.B., Orav, J.E., Stuck, A.E., Theiler, R., Wong, J.B., Egli, A., Kiel, D.P., Henschkowski, J. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical research ed.)* (Vol) 339 (2009) b3692
16. Bonetta, L. Prime time for real-time PCR. *Nat Meth* (Vol) 2 (2005) 305-312
17. Boonen, S., Autier, P., Barette, M., Vanderschueren, D., Lips, P., Haentjens, P. Functional outcome and quality of life following hip fracture in elderly women: a prospective controlled study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* (Vol) 15 (2004) 87-94
18. Boskey, A.L., Coleman, R. Aging and bone. *Journal of dental research* (Vol) 89 (2010) 1333-1348
19. Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 64 (1997) 278-294
20. Bundesärztekammer (2001) Verletzungen und deren Folgen – Prävention als ärztliche Aufgabe. In: Bundesärztekammer (ed), vol Texte und Materialien der Bundesärztekammer zur Fortbildung und Weiterbildung, (Vol) 23, pp 45–54
21. Butler, W.T. The nature and significance of osteopontin. *Connective tissue research* (Vol) 23 (1989) 123-136
22. Caplan, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology* (Vol) 217 (2009) 318-324
23. Chang, C.J., Yen, M.L., Chen, Y.C., Chien, C.C., Huang, H.I., Bai, C.H., Yen, B.L. Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells* (Vol) 24 (2006) 2466-2477
24. Chen, H.T., Lee, M.J., Chen, C.H., Chuang, S.C., Chang, L.F., Ho, M.L., Hung, S.H., Fu, Y.C., Wang, Y.H., Wang, H.I., Wang, G.J., Kang, L., Chang, J.K. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *Journal of cellular and molecular medicine* (Vol) 16 (2012) 582-593
25. Chen, J., Thomas, H.F., Sodek, J. Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA expression by dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat bone organ cultures. *Connective tissue research* (Vol) 34 (1996) 41-51
26. Chilov, M.N., Cameron, I.D., March, L.M. Evidence-based guidelines for fixing broken hips: an update. *The Medical journal of Australia* (Vol) 179 (2003) 489-493
27. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* (Vol) 15 (1993) 532-534, 536-537
28. Chun, Y.S., Chaudhari, P., Jang, Y.Y. Applications of patient-specific induced pluripotent stem cells; focused on disease modeling, drug screening and therapeutic potentials for liver disease. *International journal of biological sciences* (Vol) 6 (2010) 796-805

29. Clement, F.J. Longitudinal and cross-sectional assessments of age changes in physical strength as related to sex, social class, and mental ability. *Journal of gerontology* (Vol) 29 (1974) 423-429
30. Cooper, C. Epidemiology of osteoporosis. (2003) In: "Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism", Favus, M.J. (ed) American Society for Bone and Mineral Research (Vol) 5 pp 307-313
31. Cowan, C.M., Shi, Y.Y., Aalami, O.O., Chou, Y.F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C.H., Wu, B., Longaker, M.T. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature biotechnology* (Vol) 22 (2004) 560-567
32. Czerwinski, E., Badurski, J.E., Marcinowska-Suchowierska, E., Osieleniec, J. Current understanding of osteoporosis according to the position of the World Health Organization (WHO) and International Osteoporosis Foundation. *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja* (Vol) 9 (2007) 337-356
33. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* (Vol) 119 (2006) 2204-2213
34. Dachverband Osteologie, e.V. DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe und Therapie der Osteoporose;. (Vol) (2009)
35. Dalle Carbonare, L., Valenti, M.T., Zanatta, M., Donatelli, L., Lo Cascio, V. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. *Arthritis and rheumatism* (Vol) 60 (2009) 3356-3365
36. David, A., von der Heyde, D., Pommer, A. Therapeutic possibilities in trochanteric fractures. Safe--fast--stable. *Der Orthopade* (Vol) 29 (2000) 294-301
37. Dawn, B., Bolli, R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic research in cardiology* (Vol) 100 (2005) 494-503
38. Delany, A.M., Gabbitas, B.Y., Canalis, E. Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 57 (1995) 488-494
39. Denhardt, D.T., Noda, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* (Vol) 30-31 (1998) 92-102
40. Dennis, J.E., Carbillet, J.P., Caplan, A.I., Charbord, P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells, tissues, organs* (Vol) 170 (2002) 73-82
41. Dieckmann, P. Sturz-Syndrom. (2009) In: "Medizin des Alterns und des alten Menschen", von Renteln-Kruse, W. (ed) Steinkopff Verlag pp 98-109
42. Diederichs, S., Bohm, S., Peterbauer, A., Kasper, C., Scheper, T., van Griensven, M. Application of different strain regimes in two-dimensional and three-dimensional adipose tissue-derived stem cell cultures induces osteogenesis: implications for bone tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A* (Vol) 94 (2010) 927-936
43. Dietz, H.G. Oberschenkelhalsfrakturen (proximale Femurfrakturen). (2012) In: "Tscherne Unfallchirurgie - Hüfte und Oberschenkel", Haas, N.P., Krettek, C. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 171-177
44. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., Giannoudis, P.V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* (Vol) 9 (2011) 66

45. Ding, D.C., Chou, H.L., Hung, W.T., Liu, H.W., Chu, T.Y. Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities. *Journal of biomedical science* (Vol) 20 (2013) 59
46. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (Vol) 8 (2006) 315-317
47. Donzelli, E., Salvade, A., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M., Tredici, G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Archives of oral biology* (Vol) 52 (2007) 64-73
48. DUCY, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* (Vol) 219 (2000) 461-471
49. DUCY, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* (Vol) 89 (1997) 747-754
50. Ehnert, S., Häuser, J., Schmitt, A. Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe - Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen. *Zeitschrift für Regenerative Medizin* (Vol) 01/2011 (2011) 3-9
51. Ellenberger, M. Schenkelhalsbrüche. (2011) In: "Orthopädie und Unfallchirurgie", Grifka, J., Kuster, M. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 737-742
52. Erices, A.A., Allers, C.I., Conget, P.A., Rojas, C.V., Minguell, J.J. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell transplantation* (Vol) 12 (2003) 555-561
53. Fedde, K.N., Lane, C.C., Whyte, M.P. Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells. *Archives of biochemistry and biophysics* (Vol) 264 (1988) 400-409
54. Frank, O., Heim, M., Jakob, M., Barbero, A., Schafer, D., Bendik, I., Dick, W., Heberer, M., Martin, I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 85 (2002) 737-746
55. Frontera, W.R., Hughes, V.A., Lutz, K.J., Evans, W.J. A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 78-yr-old men and women. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) (Vol) 71 (1991) 644-650
56. Fujita, T., Izumo, N., Fukuyama, R., Meguro, T., Nakamuta, H., Kohno, T., Koida, M. Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochemical and biophysical research communications* (Vol) 280 (2001) 348-352
57. Gabbay, J.S., Heller, J.B., Mitchell, S.A., Zuk, P.A., Spoon, D.B., Wasson, K.L., Jarrahy, R., Benhaim, P., Bradley, J.P. Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. *Annals of plastic surgery* (Vol) 57 (2006) 89-93
58. Gallagher, J.A. Human Osteoblast Culture. (2003) In: "Bone Research Protocols", Helfrich, M.H., Ralston, S.H. (ed) Humana Press, (Vol) 80, pp 3-18

59. Gautier, E., Ganz, K., Krugel, N., Gill, T., Ganz, R. Anatomy of the medial femoral circumflex artery and its surgical implications. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* (Vol) 82 (2000) 679-683
60. Giordano, A., Galderisi, U., Marino, I.R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology* (Vol) 211 (2007) 27-35
61. Golub, E.E., Boesze-Battaglia, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop* (Vol) 18 (2007) 444-448
62. Götze, B., Bonnaire, F., Weise, K., Friedl, H.P. Belastbarkeit von Osteosynthesen bei instabilen per- und subtrochanteren Femurfrakturen: Experimentelle Untersuchungen mit PFN, Gamma-Nagel, DHS/Trochanterstabilisierungsplatte, 95°-Condylenplatte und UFN/Spiralklinge. *Akt. Traumatol.* 28, (Vol) (1998) 197 – 204
63. Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W., Gimble, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, 189: doi: 10.1002/jcp.1138 (Vol) (2001) 54–63
64. Gronthos, S., Zannettino, A.C., Graves, S.E., Ohta, S., Hay, S.J., Simmons, P.J. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* (Vol) 14 (1999) 47-56
65. Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Haussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., Linder, R. The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Deutsches Arzteblatt international* (Vol) 110 (2013) 52-57
66. Hauser, K. Extrazelluläre Matrix. (2008) In: "Biochemie", Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (ed) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 396-409
67. Häussler, B., Gothe, H., Göl, D., Glaeske, G., Pientka, L., Felsenberg, D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* (Vol) 18 (2007) 77-84
68. Hoffmann, R., Sudkamp, N.P., Muller, C.A., Schutz, M., Haas, N.P. Osteosynthesis of proximal femoral fractures with the modular interlocking system of unreamed AO femoral intramedullary nail. Initial clinical results. *Der Unfallchirurg* (Vol) 97 (1994) 568-574
69. Hohendorff, B., Meyer, P., Menezes, D., Meier, L., Elke, R. Treatment results and complications after PFN osteosynthesis. *Der Unfallchirurg* (Vol) 108 (2005) 938, 940, 941-936 passim
70. Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (Vol) 7 (2005) 393-395
71. Huang, G.T., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., Shi, S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and biroot engineering. *Journal of endodontics* (Vol) 34 (2008) 645-651
72. Hulmes, D.J.S. Collagen diversity, synthesis and assembly. (2008) In: "Collagen structure and mechanics", Fratzl, P. (ed) Springer-Verlag, New York, pp 15-48

73. Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J.M., Bunnell, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 99 (2006) 1285-1297
74. Jacofsky, D.J., Haidukewych, G.J. Management of pathologic fractures of the proximal femur: state of the art. *Journal of orthopaedic trauma* (Vol) 18 (2004) 459-469
75. Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 64 (1997) 295-312
76. Jerosch, J. Funktionelle Anatomie des Knochens. (2002) In: "Knochen - curasan Taschenatlas spezial", Jerosch, J., Bader, A., Uhr, G. (ed) Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 18-33
77. Jiang, H.X., Majumdar, S.R., Dick, D.A., Moreau, M., Raso, J., Otto, D.D., Johnston, D.W. Development and initial validation of a risk score for predicting in-hospital and 1-year mortality in patients with hip fractures. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* (Vol) 20 (2005) 494-500
78. Johnell, O., Kanis, J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* (Vol) 16 Suppl 2 (2005) 3-7
79. Juhasova, J., Juhas, S., Klima, J., Strnadel, J., Holubova, M., Motlik, J. Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* (Vol) 60 (2011) 559-571
80. Justesen, J., Stenderup, K., Eriksen, E.F., Kassem, M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcified tissue international* (Vol) 71 (2002) 36-44
81. Kanis, J.A., Johnell, O. The burden of osteoporosis. *Journal of endocrinological investigation* (Vol) 22 (1999) 583-588
82. Kannus, P., Parkkari, J., Niemi, S., Pasanen, M., Palvanen, M., Jarvinen, M., Vuori, I. Prevention of hip fracture in elderly people with use of a hip protector. *The New England journal of medicine* (Vol) 343 (2000) 1506-1513
83. Kastenber, Z.J., Odorico, J.S. Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* (Vol) 22 (2008) 215-222
84. Kaunitz, J.D., Yamaguchi, D.T. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 105 (2008) 655-662
85. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* (Vol) 24 (2006) 1294-1301
86. Khan, W.S., Adesida, A.B., Tew, S.R., Andrew, J.G., Hardingham, T.E. The epitope characterisation and the osteogenic differentiation potential of human fat pad-derived stem cells is maintained with ageing in later life. *Injury* (Vol) 40 (2009) 150-157
87. Köllmer, M., Buhrman, J.S., Zhang, Y., Gemeinhart, R.A. Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *Journal of developmental biology and tissue engineering* (Vol) 5 (2013) 18-25

88. Kretlow, J.D., Jin, Y.Q., Liu, W., Zhang, W.J., Hong, T.H., Zhou, G., Baggett, L.S., Mikos, A.G., Cao, Y. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC cell biology* (Vol) 9 (2008) 60
89. Kristek, D., Lovric, I., Kristek, J., Biljan, M., Kristek, G., Sakic, K. The proximal femoral nail antirotation (PFNA) in the treatment of proximal femoral fractures. *Collegium antropologicum* (Vol) 34 (2010) 937-940
90. Laflamme, M.A., Murry, C.E. Regenerating the heart. *Nature biotechnology* (Vol) 23 (2005) 845-856
91. Langsenlehner, U., Muchar, H., Schippinger, W. Somatische Veränderungen im Alter. (2013) In: "Geriatrische Notfallversorgung", Pinter, G., Likar, R, Schippinger, W., Janig, H., Kada, O., Cernic, K. (ed) Springer-Verlag, Wien, pp 39-56
92. Le Blanc, K., Pittenger, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* (Vol) 7 (2005) 36-45
93. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* (Vol) 31 (2003) 890-896
94. Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L., Chen, T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* (Vol) 103 (2004) 1669-1675
95. Lei, L., Liao, W., Sheng, P., Fu, M., He, A., Huang, G. Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences* (Vol) 50 (2007) 320-328
96. Les Laboratoires Servier (2006) Bone remodeling cycle. (www.servier.de/medical-art) [25.Juli 2016]
97. Les Laboratoires Servier (2006) Osteoporosis. (www.servier.de/medical-art) [25.Juli 2016]
98. Leskela, H.V., Risteli, J., Niskanen, S., Koivunen, J., Ivaska, K.K., Lehenkari, P. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochemical and biophysical research communications* (Vol) 311 (2003) 1008-1013
99. Lin, C.Y., Huang, C.H., Wu, Y.K., Cheng, N.C., Yu, J. Maintenance of human adipose derived stem cell (hASC) differentiation capabilities using a 3D culture. *Biotechnology letters* (Vol) 36 (2014) 1529-1537
100. Liu, F., Aubin, J.E., Malaval, L. Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone* (Vol) 31 (2002) 212-219
101. Liu, G., Zhao, L., Zhang, W., Cui, L., Liu, W., Cao, Y. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *Journal of materials science. Materials in medicine* (Vol) 19 (2008) 2367-2376
102. Liu, P., Oyajobi, B.O., Russell, R.G., Scutt, A. Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)(2) vitamin D(3) In vitro. *Calcified tissue international* (Vol) 65 (1999) 173-180
103. Lorenz, K.-U. Intertrochantere Femurfrakturen. (2011) In: "Orthopädie und Unfallchirurgie", Grifka, J., Kuster, M. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 742-745

104. Lorenz, K.-U. Subtrochantere Femurfrakturen. (2011) In: "Orthopädie und Unfallchirurgie", Grifka, J., Kuster, M. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 745-746
105. Lunt, M., Ismail, A.A., Felsenberg, D., Cooper, C., Kanis, J.A., Reeve, J., Silman, A.J., O'Neill, T.W. Defining incident vertebral deformities in population studies: a comparison of morphometric criteria. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* (Vol) 13 (2002) 809-815
106. Luu, H.H., Song, W.X., Luo, X., Manning, D., Luo, J., Deng, Z.L., Sharff, K.A., Montag, A.G., Haydon, R.C., He, T.C. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* (Vol) 25 (2007) 665-677
107. Makhlef, H.A., Mueller, S.M., Mizuno, S., Glowacki, J. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochemical and biophysical research communications* (Vol) 268 (2000) 669-672
108. Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., Fagioli, F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 97 (2006) 744-754
109. Marini, F., Hall, B., Dembinski, J., Studeny, M., Sasser, A.K., Andreeff, M. Mesenchymal stem cells as vehicles for genetic targeting of tumors. (2006) In: "Stem Cell Transplantation", Ho, A.D., Hoffman, R., Zanjani, E.D., (ed) Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp 157–175
110. McClung, M.R., Lewiecki, E.M., Cohen, S.B., Bolognese, M.A., Woodson, G.C., Moffett, A.H., Peacock, M., Miller, P.D., Lederman, S.N., Chesnut, C.H., Lain, D., Kivitz, A.J., Holloway, D.L., Zhang, C., Peterson, M.C., Bekker, P.J. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England journal of medicine* (Vol) 354 (2006) 821-831
111. Meyer, G., Köpke, S., Mühlhauser, I. Effizienz pflegerischer Einschätzung im Vergleich zu empfohlenen Testinstrumenten zur Vorhersage des Sturzrisikos in Alten- und Pflegeheimen. *PFLEGE & GESELLSCHAFT* (Vol) 10. JAHRGANG (2005) 41-44
112. Miltenyi Biotec (2014) FcR Blocking Reagent, human. (<http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-sample-preparation/sample-clearing/fcr-blocking-reagents/fcr-blocking-reagent-human.aspx>) [13. November 2014]
113. Miron, R.J., Zhang, Y.F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research* (Vol) 91 (2012) 736-744
114. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol) 100 (2003) 5807-5812
115. Morin, P.A., Smith, D.G. Nonradioactive detection of hypervariable simple sequence repeats in short polyacrylamide gels. *BioTechniques* (Vol) 19 (1995) 223-228

116. Mueller, S.M., Glowacki, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 82 (2001) 583-590
117. Nakagami, H., Morishita, R., Maeda, K., Kikuchi, Y., Ogihara, T., Kaneda, Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* (Vol) 13 (2006) 77-81
118. Nevitt, M.C., Ross, P.D., Palermo, L., Musliner, T., Genant, H.K., Thompson, D.E. Association of prevalent vertebral fractures, bone density, and alendronate treatment with incident vertebral fractures: effect of number and spinal location of fractures. The Fracture Intervention Trial Research Group. *Bone* (Vol) 25 (1999) 613-619
119. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol) 98 (2001) 10344-10349
120. Osnes, E.K., Lofthus, C.M., Meyer, H.E., Falch, J.A., Nordsletten, L., Cappelen, I., Kristiansen, I.S. Consequences of hip fracture on activities of daily life and residential needs. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* (Vol) 15 (2004) 567-574
121. Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., Stein, G.S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology* (Vol) 143 (1990) 420-430
122. Pachon-Pena, G., Yu, G., Tucker, A., Wu, X., Vendrell, J., Bunnell, B.A., Gimble, J.M. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *Journal of cellular physiology* (Vol) 226 (2011) 843-851
123. Palm, H., Lysen, C., Krasheninnikoff, M., Holck, K., Jacobsen, S., Gebuhr, P. Intramedullary nailing appears to be superior in pertrochanteric hip fractures with a detached greater trochanter: 311 consecutive patients followed for 1 year. *Acta orthopaedica* (Vol) 82 (2011) 166-170
124. Parker, A.M., Katz, A.J. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert opinion on biological therapy* (Vol) 6 (2006) 567-578
125. Pauwels, F. "Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte." Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1973
126. Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, N.Y.)* (Vol) 284 (1999) 1168-1170
127. Potier, E., Ferreira, E., Andriamanalijaona, R., Pujol, J.P., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* (Vol) 40 (2007) 1078-1087

128. Preston, S.L., Alison, M.R., Forbes, S.J., Direkze, N.C., Poulosom, R., Wright, N.A. The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular pathology* : MP (Vol) 56 (2003) 86-96
129. Pretto, M., Kressig, R.W., Frank, M., Bareiss, D., Spirig, R., Suhm, N. Interdisziplinäre und interprofessionelle Behandlung von geriatrischen Frakturpatienten im «Kompetenznetzwerk Altersfrakturen». Unveröffentlichte Daten aus laufender Datenerhebung i.R. des Programms (Vol) (2008.)
130. Priemel, M., Munch, C., Beil, F.T., Ritzel, H., Amling, M. Pathophysiology and pathomorphology of osteoporosis. *Der Radiologe* (Vol) 46 (2006) 831-838
131. Pullisaar, H., Tiainen, H., Landin, M.A., Lyngstadaas, S.P., Haugen, H.J., Reseland, J.E., Ostrup, E. Enhanced in vitro osteoblast differentiation on TiO₂ scaffold coated with alginate hydrogel containing simvastatin. *J Tissue Eng* (Vol) 4 (2013) 2041731413515670
132. Rasmusson, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* (Vol) 312 (2006) 2169-2179
133. Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B., Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* (Vol) 76 (2003) 1208-1213
134. Reich, A., Bae, A.S., Barnes, A.M., Cabral, W.A., Hinek, A., Stimec, J., Hill, S.C., Chitayat, D., Marini, J.C. Type V OI primary osteoblasts display increased mineralization despite decreased COL1A1 expression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (Vol) 100 (2015) E325-332
135. Reichert, J.C., Wullschleger, M.E., Cipitria, A., Lienau, J., Cheng, T.K., Schutz, M.A., Duda, G.N., Noth, U., Eulert, J., Hutmacher, D.W. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *International orthopaedics* (Vol) 35 (2011) 1229-1236
136. Reimertz, C., Pichl, J., Peine, R., Hoffmann, R. Per- und subtrochantere Femurfrakturen. (2012) In: "Tscherne Unfallchirurgie - Hüfte und Oberschenkel", Haas, N.P., Krettek, C. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 179-219
137. Reinnervate (2014) Alvetex Formats. (<http://reinnervate.com/why-alvetex/formats/>) [14. November 2014]
138. Reinnervate (2014) The science of Alvetex. (<http://reinnervate.com/why-alvetex/the-science/>) [17. November 2014]
139. Reinnervate (2012) Product Information Booklet. pp 1-24
140. Ricci, W. Femur Trauma (2005) In: "Orthopaedic Knowledge Update 8", Vaccaro, A. (ed) American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) pp 425-431
141. Riem, S. Frakturen im Alter. *Deutscher Ärzte-Verlag - OUP* (Vol) 2 (5) (2013) 221-224
142. Riggs, B.L., Melton, L.J., 3rd Involutional osteoporosis. *The New England journal of medicine* (Vol) 314 (1986) 1676-1686
143. Rodriguez, J.P., Astudillo, P., Rios, S., Pino, A.M. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Current stem cell research & therapy* (Vol) 3 (2008) 208-218
144. Romero-Prado, M., Blazquez, C., Rodriguez-Navas, C., Munoz, J., Guerrero, I., Delgado-Baeza, E., Garcia-Ruiz, J.P. Functional characterization of human mesenchymal stem cells that maintain osteochondral fates. *Journal of cellular biochemistry* (Vol) 98 (2006) 1457-1470

145. Rubenstein, L.Z. Falls in older people: epidemiology, risk factors and strategies for prevention. *Age and ageing* (Vol) 35 Suppl 2 (2006) 37-41
146. Sattin, R.W. Falls among older persons: a public health perspective. *Annual review of public health* (Vol) 13 (1992) 489-508
147. Schäffler, A., Büchler, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *STEM CELLS* (Vol) 25 (2007) 818–827
148. Schmidt, R. (1993) Verfahren zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase. (<http://www.patent-de.com/19930408/DE4117619C2.html>) [11. November 2014]
149. Schneider, S., Unger, M., van Griensven, M., Rosado balmayor, E. "Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine" 2017
150. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. (2014) PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp 410-418
151. Schütz, M., Bühler, M. Classification of proximal femoral fractures. *Helvetica chirurgica acta* (Vol) 59 (1993) 947-954
152. Seifert-Klauss, V., Link, T., Heumann, C., Luppä, P., Haseitl, M., Laakmann, J., Rattenhuber, J., Kiechle, M. Influence of pattern of menopausal transition on the amount of trabecular bone loss. Results from a 6-year prospective longitudinal study. *Maturitas* (Vol) 55 (2006) 317-324
153. Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P., Ghaemi, N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology letters* (Vol) 33 (2011) 1257-1264
154. Shi, S., Bartold, P.M., Miura, M., Seo, B.M., Robey, P.G., Gronthos, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & craniofacial research* (Vol) 8 (2005) 191-199
155. Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C.M., Robey, P.G., Wang, C.Y. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nature biotechnology* (Vol) 20 (2002) 587-591
156. Shi, Y.Y., Nacamuli, R.P., Salim, A., Longaker, M.T. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plastic and reconstructive surgery* (Vol) 116 (2005) 1686-1696
157. Shih, Y.R., Chen, C.N., Tsai, S.W., Wang, Y.J., Lee, O.K. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells* (Vol) 24 (2006) 2391-2397
158. Shim, W.S., Jiang, S., Wong, P., Tan, J., Chua, Y.L., Tan, Y.S., Sin, Y.K., Lim, C.H., Chua, T., Teh, M., Liu, T.C., Sim, E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and biophysical research communications* (Vol) 324 (2004) 481-488
159. Shin, H., Zygourakis, K., Farach-Carson, M.C., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. Modulation of differentiation and mineralization of marrow stromal cells cultured on biomimetic hydrogels modified with Arg-Gly-Asp containing peptides. *Journal of biomedical materials research. Part A* (Vol) 69 (2004) 535-543
160. Simonsen, J.L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S.I., Jensen, T.G., Kassem, M. Telomerase expression extends the

- proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature biotechnology* (Vol) 20 (2002) 592-596
161. Smektala, R., Ohmann, C., Paech, S., Neuhaus, E., Rieger, M., Schwabe, W., Debold, P., Deimling, A., Jonas, M., Hupe, K., Bucker-Nott, H.J., Giani, G., Szucs, T.D., Pientka, L. On the prognosis of hip fractures. Assessment of mortality after hip fractures by analyzing overlapping segments of longitudinal data. *Der Unfallchirurg* (Vol) 108 (2005) 927-928, 930-937
162. Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D. Osteopontin. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists (Vol) 11 (2000) 279-303
163. Stanford, C.M., Jacobson, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *The Journal of biological chemistry* (Vol) 270 (1995) 9420-9428
164. Stangenberg, L., Schaefer, D.J., Buettner, O., Ohnolz, J., Mobest, D., Horch, R.E., Stark, G.B., Kneser, U. Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue engineering* (Vol) 11 (2005) 855-864
165. Statistisches Bundesamt (2014) (<https://www.destatis.de/bevoelkerungspyramide/>) [22. Oktober 2014]
166. Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., Van Wijnen, A.J., Montecino, M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological reviews* (Vol) 76 (1996) 593-629
167. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* (Vol) 33 (2003) 919-926
168. Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E.F., Rattan, S.I., Kassem, M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* (Vol) 16 (2001) 1120-1129
169. Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., Scutt, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development* (Vol) 129 (2008) 163-173
170. Stringer, B., Waddington, R., Houghton, A., Stone, M., Russell, G., Foster, G. Serum from postmenopausal women directs differentiation of human clonal osteoprogenitor cells from an osteoblastic toward an adipocytic phenotype. *Calcified tissue international* (Vol) 80 (2007) 233-243
171. Suck, K., Roeker, S., Diederichs, S., Anton, F., Sanz-Herrera, J.A., Ochoa, I., Doblare, M., Scheper, T., van Griensven, M., Kasper, C. A rotating bed system bioreactor enables cultivation of primary osteoblasts on well-characterized Sponceram regarding structural and flow properties. *Biotechnology progress* (Vol) 26 (2010) 671-678
172. Suckel, A.A., Dietz, K., Wuelker, N., Helwig, P. Evaluation of complications of three different types of proximal extra-articular femur fractures: differences in complications, age, sex and surviving rates. *International orthopaedics* (Vol) 31 (2007) 689-695
173. Suhm, N., Pretto, M. Moderne Alterstraumatologie: Interdisziplinäre & Interprofessionelle Behandlung im "Kompetenznetzwerk Altersfrakturen". *The Medical Journal* (Vol) 3 (2009) 16-20

174. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell (Vol) 131 (2007) 861-872*
175. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell (Vol) 126 (2006) 663-676*
176. Takamizawa, S., Maehata, Y., Imai, K., Senoo, H., Sato, S., Hata, R. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell biology international (Vol) 28 (2004) 255-265*
177. Tavian, M., Zheng, B., Oberlin, E., Crisan, M., Sun, B., Huard, J., Peault, B. The vascular wall as a source of stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences (Vol) 1044 (2005) 41-50*
178. Temenoff, J.S., Park, H., Jabbari, E., Sheffield, T.L., LeBaron, R.G., Ambrose, C.G., Mikos, A.G. In vitro osteogenic differentiation of marrow stromal cells encapsulated in biodegradable hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A (Vol) 70 (2004) 235-244*
179. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.) (Vol) 282 (1998) 1145-1147*
180. Tinetti, M.E., Baker, D.I., Garrett, P.A., Gottschalk, M., Koch, M.L., Horwitz, R.I. Yale FICSIT: risk factor abatement strategy for fall prevention. *Journal of the American Geriatrics Society (Vol) 41 (1993) 315-320*
181. Tinetti, M.E., Speechley, M., Ginter, S.F. Risk factors for falls among elderly persons living in the community. *The New England journal of medicine (Vol) 319 (1988) 1701-1707*
182. Todo, M., Arahira, T. In vitro bone formation by mesenchymal stem cells with 3D collagen/beta-TCP composite scaffold. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference (Vol) 2013 (2013) 409-412*
183. Tuan, R.S., Boland, G., Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy (Vol) 5 (2003) 32-45*
184. U.S. Congress - Office of Technology Assessment (1994) *Hip Fracture Outcomes in People Age 50 and Over-Background Paper. OTA-BP-H- 120 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office*
185. Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European journal of immunology (Vol) 36 (2006) 2566-2573*
186. Valenti, M.T., Dalle Carbonare, L., Donatelli, L., Bertoldo, F., Zanatta, M., Lo Cascio, V. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone (Vol) 43 (2008) 1084-1092*
187. van Griensven, M., Diederichs, S., Roeker, S., Boehm, S., Peterbauer, A., Wolbank, S., Riechers, D., Stahl, F., Kasper, C. Mechanical strain using 2D and 3D bioreactors induces osteogenesis: implications for bone tissue engineering. *Advances in biochemical engineering/biotechnology (Vol) 112 (2009) 95-123*
188. Varma, M.J., Breuls, R.G., Schouten, T.E., Jurgens, W.J., Bontkes, H.J., Schuurhuis, G.J., van Ham, S.M., van Milligen, F.J. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem cells and development (Vol) 16 (2007) 91-104*

189. Veronesi, F., Torricelli, P., Borsari, V., Tschon, M., Rimondini, L., Fini, M. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* (Vol) 21 (2011) 363-377
190. Voigt, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in molecular medicine* (Vol) 110 (2005) 39-48
191. von Zglinicki, T. Alter und Altern. (2011) In: "Physiologie des Menschen - mit Pathophysiologie", Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 877-891
192. Wabitsch, M. The acquisition of obesity: insights from cellular and genetic research. *The Proceedings of the Nutrition Society* (Vol) 59 (2000) 325-330
193. Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.X., Eckstein, V., Boukamp, P., Ho, A.D. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PloS one* (Vol) 4 (2009) e5846
194. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., Ho, A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology* (Vol) 33 (2005) 1402-1416
195. Waldherr, P., Nötzli, H. Instabile per- /subtrochantere Femurfraktur. (2007) In: "Orthopädisch-traumatologische Knacknüsse", Meye, R.-P., Gächter, A., Hefti F., Kappeler, U. (ed) Springer-Verlag, Heidelberg, pp 243-254
196. Werner-Tutschku, W., Lajtai, G., Schmiedhuber, G., Lang, T., Pirkl, C., Orthner, E. Intra- and perioperative complications in the stabilization of per- and subtrochanteric femoral fractures by means of PFN. *Der Unfallchirurg* (Vol) 105 (2002) 881-885
197. Wiame, I., Remy, S., Swennen, R., Sagi, L. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *BioTechniques* (Vol) 29 (2000) 252-254, 256
198. Wildemann, B., Burkhardt, N., Luebberstedt, M., Vordemvenne, T., Schmidmaier, G. Proliferating and differentiating effects of three different growth factors on pluripotent mesenchymal cells and osteoblast like cells. *Journal of orthopaedic surgery and research* (Vol) 2 (2007) 27
199. Wolbank, S., Stadler, G., Peterbauer, A., Gillich, A., Karbiener, M., Streubel, B., Wieser, M., Katinger, H., van Griensven, M., Redl, H., Gabriel, C., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. *Tissue engineering. Part A* (Vol) 15 (2009) 1843-1854
200. Wu, S.M., Hochedlinger, K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature cell biology* (Vol) 13 (2011) 497-505
201. Wuchter, P., Wagner, W., Eckstein, V., Ho, A.D. Das Altern im Spiegelbild der Stammzellen - Irrwege und Auswege. (2010) In: "Altern gestalten", Häfner, H., Beyreuther, K., Schlicht, W. (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 69-80
202. Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H., Chen, Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) (Vol) 229 (2004) 623-631
203. Yamanaka, S. A fresh look at iPS cells. *Cell* (Vol) 137 (2009) 13-17

204. Yang, L., Tao, T., Wang, X., Du, N., Chen, W., Tao, S., Wang, Z., Wu, L. Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro. *Chinese medical journal* (Vol) 116 (2003) 1357-1360
205. Zeidan-Chulia, F., Noda, M. "Opening" the mesenchymal stem cell tool box. *European journal of dentistry* (Vol) 3 (2009) 240-249
206. Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., Leboff, M.S., Glowacki, J. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging cell* (Vol) 7 (2008) 335-343
207. Zhu, M., Kohan, E., Bradley, J., Hedrick, M., Benhaim, P., Zuk, P. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (Vol) 3 (2009) 290-301
208. Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., Cui, Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function* (Vol) 26 (2008) 664-675

9 Anhang

9.1 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen benutzt, als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien und Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der hier vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke der Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Murnau, 11.12.19

Ort, Datum

Sil

Unterschrift Doktorand

9.2 Veröffentlichungen

Vorträge:

„3D cultivation enhances osteogenic differentiation even in stem cells of elderly patients“

Vortrag im Rahmen der 17. Chirurgischen Forschungstage in Frankfurt (10/13)

„Osteogene Differenzierung unter Verwendung von 3D Kulturen – verbesserte Ergebnisse auch bei Zellen älterer Patienten“

Vortrag im Rahmen des IV. Münchner Symposium für experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskelettale Forschung (02/14)

Publikationen:

„Effect of donor age and 3D-cultivation on osteogenic differentiation capacity in adipose-derived mesenchymal stem cells“

Payr S, Schuseil T, Unger M, Seeliger C, Tiefenboeck T, Balmayor ER, van Griensven M, Sci Rep 10:10408, 2020

„Direct comparison of 3D and 2D cultivation reveals higher osteogenic capacity of elderly osteoblasts in 3D“

Payr S, Balmayor ER, Tiefenboeck T, Schuseil T, Unger M, Seeliger C, van Griensven M, J Orthop Surg Res 16:13, 2021

9.3 Bildgenehmigungen

9.3.1 Abbildungen des Scaffolds

Hello Tim,

I have spoke to our management team and they have confirmed this would be ok, as long as the appropriate acknowledgements and references are made.

Kind regards

Dan

Dan Mason

Trainee Operations Manager

REPROCELL Europe Ltd, NETPark Plexus, Thomas Wright Way, Sedgefield, Co. Durham, TS21 3FD, UNITED KINGDOM

Web: <https://www.reprocell.com>

Email: dan.mason@reprocell.com

Tel: +44 (0) 1740 625516

From: Tim Schuseil <tim.schuseil@arcor.de>

Sent: 21 February 2019 10:28

To: info-emea <info-emea@reprocell.com>

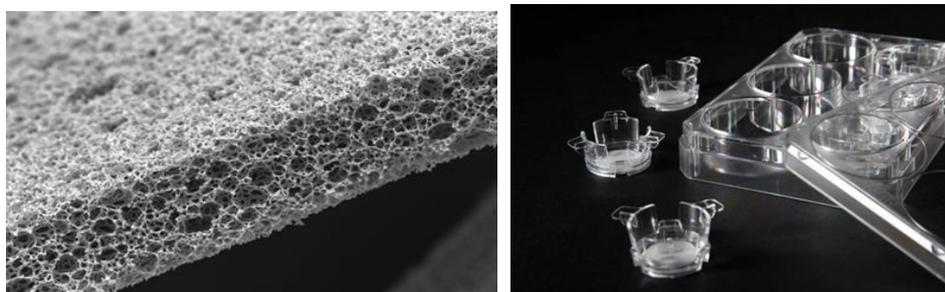
Subject: copyright

Dear Sir or Madam,

in 2014 I started my doctoral thesis and I used the alvatex scaffold to improve the osteogenic differentiation of primary osteoblasts.

I would like to use two pictures of the Alvatex scaffold to finish my doctoral thesis.

Am I allow to use these twoe pictures from your homepage in 2014?



Your permisson would be a big pleasure for me.

Kindly regards

T. Schuseil

9.3.2 Röntgenbilder

Von: Woltmann, Alexander
Gesendet: Montag, 24. Juni 2019 21:10
An: Schuseil, Tim
Betreff: AW: Röntgenbilder

Lieber Herr Schuseil,

ja, einverstanden! Viel Erfolg!

Mit freundlichen Grüßen

A. Woltmann

Von: Schuseil, Tim
Gesendet: Sonntag, 23. Juni 2019 15:02
An: Woltmann, Alexander
Betreff: Röntgenbilder

Sehr geehrter Herr Prof. Woltmann,

für die Fertigstellung meiner Dissertation benötige ich Röntgenbilder einer Schenkelhalsfraktur, einer pertrochantären und einer subtrochantären Femurfraktur.

Daher wollte ich Sie fragen ob es möglich ist entsprechende Röntgenbilder **anonym** und **ohne Datum** aus dem IMPAX der BGU Murnau zu verwenden.

Über eine kurze Rückmeldung Ihrerseits würde ich mich sehr freuen.

Vielen Dank schon im Voraus.

Mit freundlichen Grüßen

Tim Schuseil

BG Unfallklinik Murnau
Prof.-Küntscher-Str. 8
D-82418 Murnau am Staffelsee

Web: www.bgu-murnau.de

BG Klinikum Murnau gGmbH
Registergericht - Amtsgericht München
HRB221781, Sitz: München
Geschäftsführerin: Sarah Heinze

9.4 Danksagung

Beginnen möchte ich bei Herrn Prof. van Griensven, meinem Doktorvater. Die Möglichkeit eine experimentelle Arbeit durchführen zu dürfen, war sehr bereichernd und hat mir viele Erfahrungen und Eindrücke beschert, die ich sonst nie gemacht hätte und die mich geprägt haben. Besonders beeindruckend fand ich neben der großen fachlichen Expertise den menschlichen Umgang mit ihnen, bei dem mir stets der Eindruck vermittelt wurde, dass das Interesse über den aktuellen Stand der Dissertation weit hinausging. Vielen herzlichen Dank dafür!

Als nächstes möchte ich meinen beiden Betreuerinnen Lila und Claudine danken. Ihr habt mir während meiner Zeit im Labor und bei den ersten Schreibversuchen beratend zur Seite gestanden und ich freue mich rückblickend zwei Betreuerinnen gehabt zu haben.

Was ist ein Labor ohne eine biologisch-technische, inzwischen leitende biologisch-technische Assistentin? Die Frage beantwortet sich von selbst. Marina, du hast mir so viel beigebracht und wenn es ein Problem gab, dann warst du immer da. Auch als ich schweren Herzens deinen Regierungsbezirk, das neue Lab, verlassen musste, warst du weiterhin Ansprechpartnerin und immer helfend zur Stelle. Keiner hat meine schüchtern-fluoreszierenden Zellen besser in Szene gesetzt als du!

Und jetzt kommst du, Fritz! Du warst der erste mit dem ich vor langer Zeit Kontakt aufgenommen habe um eine Doktorarbeit zu schreiben, damals ohne Vorstellung was das bedeutet. Du warst immer erreichbar und hast dich um viele Dinge mit großem Engagement gekümmert, selbst wenn diese deinen eigentlichen Aufgabenbereich nicht betroffen haben! Nicht zuletzt vielen herzlichen Dank auch für das Redigieren meiner Arbeit, welches du einfach nebenbei erledigt hast!

Herzlichen Dank auch an Herrn LA Prof. Dr. Woltmann, stellvertretender ärztlicher Direktor der BGU Murnau, bezüglich der Erlaubnis zur Verwendung von Röntgenbildern. Sie haben mir dadurch sehr geholfen.

Zuletzt will ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und meiner Frau Amelie bedanken. Rückblickend war es doch eine lange Zeit und ihr habt mich unterstützt, oft einfach nur durchs Zuhören oder dadurch, dass ihr mich auf andere Gedanken gebracht hab. Ich bin dankbar euch zu haben.

Der letzte und entscheidende Dank geht nach oben!