

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. P. Biberthaler)**

**Alginatekontrollierte Differenzierung von
mesenchymalen Stammzellen (AdMSC und BMSC)
zu Osteoblasten**

Volker Josef Hofer

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Andreas Nüssler
2. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 24.08.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.05.2021 angenommen.

Für meinen Sohn Max
Ich hoffe dir immer ein guter Vater zu sein.

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung und Fragestellung	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Knochen.....	9
1.2.1 Arten, Gliederung und Funktion.....	9
1.2.2 Knochenbildung	12
1.2.3 Zellen im Knochen.....	14
1.2.4 Frakturheilung	16
1.2.5 Problematische Knochendefekte und Probleme bei der Defektheilung	18
1.2.6 Therapieoptionen problematischer Knochendefekte und deren Limitationen	23
1.3 Tissue Engineering	31
1.3.1 TE bei Knochen.....	33
1.4 Stammzellen	37
1.4.1 Allgemeiner Hintergrund.....	37
1.4.2 Embryonale Stammzellen.....	39
1.4.3 Adulte Stammzellen	39
1.4.4 Mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BMSC).....	41
1.4.5 Mesenchymale Fettgewebstammzellen (AdMSC).....	43
1.5 Alginat	46
1.6 Fragestellung	49
2 Material und Methoden	50
2.1 Allgemeine Anmerkungen.....	50
2.2 Zeitlicher Ablauf der Arbeit	50
2.3 Isolation primärer humaner Osteoblasten (OSÜ/OSS).....	52
2.4 Kultivierung primärer humaner Osteoblasten	54
2.4.1 Wachstumsmedium für OSÜ sowie OSS	54
2.4.2 Mediumwechsel bei Osteoblasten	56

2.4.3	Passagierung von Osteoblasten	57
2.5	Isolation primärer humaner Knochenmark Stammzellen (BMSC)	58
2.6	Kultivierung primärer humaner Knochenmarkstammzellen	60
2.6.1	Herstellung des Wachstumsmediums für BMSC	60
2.6.2	Mediumwechsel bei BMSC.....	61
2.6.3	Passagierung von BMSC	61
2.7	Isolation adipozytärer mesenchymaler Stammzellen (AdMSC).....	62
2.8	Kultivierung adipozytärer mesenchymaler Stammzellen.....	64
2.8.1	Wachstumsmedium für AdMSC	64
2.8.2	Mediumwechsel bei AdMSC.....	65
2.8.3	Passagierung von AdMSC.....	65
2.9	Einkapseln von Stammzellen	66
2.10	Kultivierung Alginatbeads.....	70
2.10.1	Allgemeine Anmerkungen zum Ablauf.....	70
2.10.2	Mediumwechsel Zellkultur in Alginatbeads	70
2.10.2.1	Herstellung des Differenzierungsmedium für OSÜ/OSS.....	70
2.10.2.2	Herstellung des Differenzierungsmediums für BMSC und AdMSC.....	73
2.10.3	Mediumwechsel Alginatbeads.....	75
2.11	Lichtmikroskopie (LM)	75
2.12	Live-Dead-Färbung	75
2.13	Alamar-Blau-Test	77
2.14	Alkalische Phosphatase–Aktivitätsmessung.....	78
2.14.1	Ablauf der AP-Aktivitätsmessung.....	79
2.14.2	Standardkurve AP-Aktivitätsmessung.....	81
2.15	Alizarin-Rot-Färbung (ARS).....	82
2.15.1	Methodik	82
2.15.2	Ablauf der ARS	82

2.15.3	Standardkurve ARS	84
2.16	Bildanalyse	86
2.17	Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation aus in Alginate-Beads enthaltenen Zellen	87
2.18	Statistische Auswertung	92
3	Ergebnisse.....	94
3.1	LM gestützte Bildanalyse	94
3.1.1	Osteoblasten	95
3.1.2	Knochenmarkstammzellen	96
3.1.3	Fettgewebstammzellen.....	97
3.1.4	Leere Beads in MSC-Differenzierungsmedium	98
3.2	Live-Dead-Färbung	99
3.2.1	OSÜ	99
3.2.2	BMSC.....	101
3.2.3	AdMSC.....	103
3.3	Alamar-Blau-Messung	104
3.4	Alkalische Phosphatase Aktivitätsmessung.....	106
3.5	Alizarin-Rot-Färbung	108
3.6	Bildanalyse mittels Messung der Integrated Density (IntDen)	110
3.7	RNA-Isolierung	111
4	Diskussion	112
5	Zusammenfassung.....	121
6	Quellenverzeichnis	125
7	Abbildungsverzeichnis	141
8	Danksagung	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alamar-Blau	AB
Mesenchymale Fettgewebstammzellen	AdMSC
Alkalische Phosphatase	AP
Alizarin-Rot-Färbung	ARS
Body-Mass-Index	BMI
Bone morphogenetic protein	BMP
primäre humane Knochenmark Stammzellen	BMSC
Konzentration	C
Endgültige Konzentration	C _{final}
Knochenmark	KM
Tag	d
Diethylpyrocarbonate	DEPC
Destilliertes Wasser	dH ₂ O
Dulbecco's MEM	DMEM
Desoxyribonukleinsäure	DNA
endotheliale Zelle	EC
Ethylendiamintetraacetat	EDTA
Emission	Em
Embryonale Stammzelle	ESC
Extinktion	Ext
extrazelluläre Matrix	EZM
Fötale Kalb-Serum	FCS
Fibroblasten Wachstumsfaktor	FGF
Hydroxyapatit	HA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES
Humane Osteoprogenitorzelle	HOP
humane Umbilikalvenenzelle	HUVEC
insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1	IGF-1
Integrated Density	IntDen
Lichtmikroskopie	LM
Ludwig-Maximilians-Universität	LMU
Minimum Essential Media	MEM
Megapascal	MPa
mesenchymale Stammzelle	MSC
Molare Masse	MW

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet	NTNU
optische Dichte	OD
Operation	OP
Aus Spongiosastückchen isolierte Osteoblasten	OSS
Durch Zentrifugierung isolierte Osteoblasten	OSÜ
periphere arterielle Verschlusskrankheit	pAVK
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	PBS
Polymerase Chain Reaction	PCR
Platelet-Derived Growth Factor	PDGF
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	4-pNp-Lösung
Ligand für den nukleären Faktor Kappa B-Rezeptor	RANKL
Ribonukleinsäure	RNA
Raumtemperatur	RT
Stammzellen	SC
Standard error of the mean	SEM
Tris-Borat-EDTA-Puffer	TBE-Puffer
Tissue Engineering	TE
Transformierender Wachstumsfaktor- β	TGF- β
Tumornekrosefaktor α	TNF α
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	TRIS
Ultraviolett	UV
vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	VEGF
World Health Organization	WHO

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1 EINLEITUNG

Im Rahmen des demografischen Wandels in Deutschland (Destatis 2019) kommt es zu einem Anstieg der Frakturgefahr in der Gesamtbevölkerung (Schieker, Jakob, *et al.* 2011). Die Therapien dieser Verletzungen werden zunehmend komplizierter (Schieker, Jakob, *et al.* 2011; Mahendra and Maclean 2007) und darüber hinaus steigt die Zahl an Endoprothesenrevisionen (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Dies liegt vor allem an vermehrt vorhandenen Risikofaktoren für Frakturen und Wundheilungsstörungen wie Diabetes (Esther and Wolfgang 2020), Osteoporose (Fuchs, Rabenberg, *et al.* 2013), Polypharmakotherapie oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) (Siebert and Beck 2005) sowie dem Versagen von bis zu 50 % aller skeletalen Prothesen innerhalb von zehn bis 25 Jahren (Hench and Thompson 2010). Dies stellt eine große Herausforderung an die behandelnden Chirurgen dar (Deutschland Statistisches Bundesamt 2019; Strom, Borgstrom, *et al.* 2011) und bedingt immense Kosten im Gesundheitssystem von derzeit zwei bis vier Milliarden Euro pro Jahr, die in Deutschland allein für osteoporotische Schenkelhalsfrakturen ausgegeben werden (Siebert and Beck 2005; Deutschland Statistisches Bundesamt 2019). Durch den Aufbau nationaler Traumaregister wird derzeit intensiv versucht die Versorgungsqualität in Deutschland, aber auch in ganz Europa weiter zu verbessern (Beirer, Kirchhoff, *et al.* 2017; Biberthaler 2018). Trotzdem ist die Suche nach neuen Therapieoptionen essentiell, da klassische Therapieoptionen wie die Verwendung von Knochen-Eigentransplantaten zur Anregung der Frakturheilung im Rahmen von schlecht heilenden Knochenbrüchen bereits jetzt an ihre Grenzen stoßen und der Bedarf in den nächsten Jahren weiter steigen wird (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008; Ehnert, J, *et al.* 2011; Hofmann, Gorbulev, *et al.* 2020).

1.2 KNOCHEN

1.2.1 Arten, Gliederung und Funktion

Es gibt flache sowie lange (Röhren-) Knochen. Lange Röhrenknochen gliedern sich in Epiphyse, Diaphyse und Metaphyse, wobei die Metaphyse während des Längenwachstums von Knochen die Wachstumsfuge bildet. Im Querschnitt gliedert sich der Knochen von außen nach innen in ihn umgebendes Periost, Kompakta aus kortikalem Knochen (liefert mechanische Stabilität), Spongiosa (vor allem metabolisch aktiv), Endost und Markraum mit Knochenmark (KM) und Blutgefäßen (Abbildung 1).

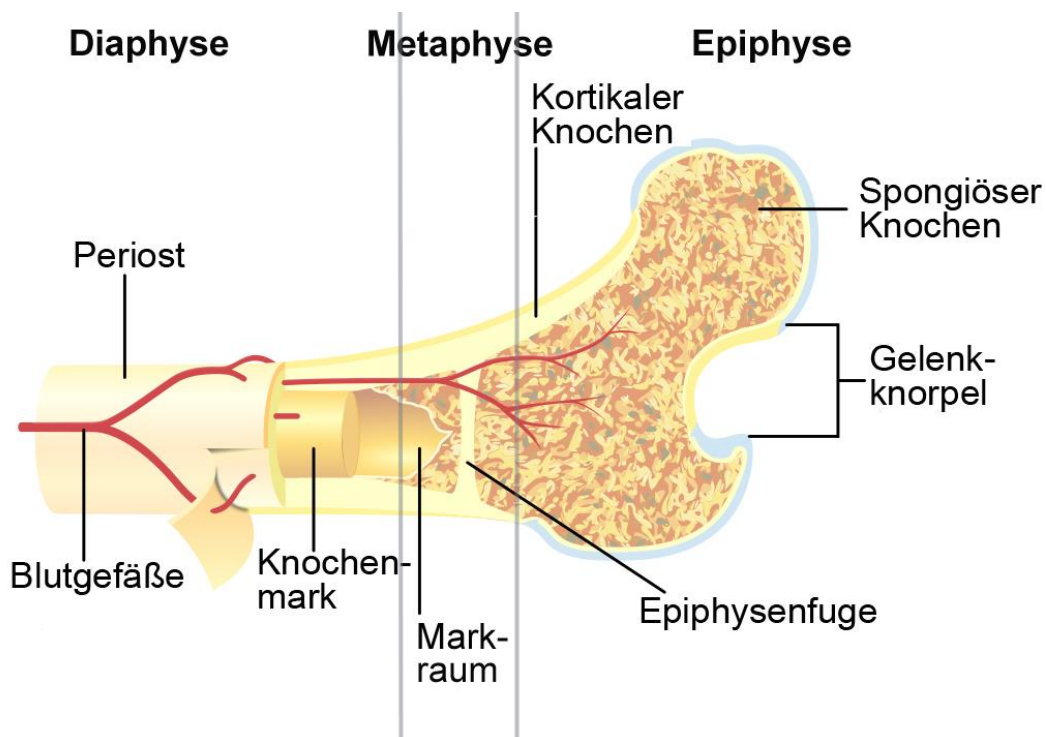


Abbildung 1: Gliederung des Röhrenknochens, modifiziert nach Wikimedia (wikimedia 2008)

Im Bereich des Periosts und Endosts sitzen osteogene Zellen (Sobotta and Welsch 2006).

Primäre Aufgaben des Knochengewebes sind Stütz- und Formgebungsfunktionen (Soldner and Herr 2001) sowie seine Eigenschaft als Ansatzpunkt für Muskeln (Moreira CA 2008) mit zentraler Rolle im Bewegungsapparat des Menschen. Darüber hinausgehend hat das Knochengewebe grundlegende Schutzfunktionen wie etwa im Bereich der Schädelknochen und eine zentrale metabolische Funktion im Hinblick auf seine Eigenschaft als unter

anderem Kalzium-, Magnesium-, Phosphor- und Natrium-speicher (Sobotta and Welsch 2006).

Um diesen Aufgaben gerecht werden zu können, handelt es sich bei Knochen um ein hochspezialisiertes Gewebe, welches sich ständig im Umbau befindet (Stevens and Lowe 2005). Da Knochen großen biomechanischen Belastungen bei möglichst geringem Gewicht stand halten muss ist er ein Verbundstoff (Soldner and Herr 2001), bei dem man sich die Matrix vereinfacht als organisiertes, mineralisiertes Gel vorstellen kann, dessen Gelphase aus Kollagen und dessen mineralisierte Phase aus Hydroxyapatit (HA) besteht (Olderoy, Xie, *et al.* 2012). Dieser Aufbau verleiht Knochen eine sehr gute Zug-, Druck-, Biege-, und Torsionsbelastbarkeit (Sobotta and Welsch 2006). Die Zugbelastbarkeit von spongiösem Knochen liegt beispielsweise bei ca. 3,5 MPa (Zhao, Weir, *et al.* 2010). Die genaue Belastbarkeit einzelner Knochenabschnitte hängt von strukturellen Eigenschaften ab (Cowin 2001). So sind Dicke, Anzahl, sowie Ausrichtung der Trabekel parallel zur jeweils größten mechanischen Belastung ausschlaggebend für Struktur, Geometrie und Stabilität von spongiösem Knochen (Sobotta and Welsch 2006).

Neben organischen Kollagenfasern vor allem des Typ I mit einigen molekularen Besonderheiten und organischen Mineralien, die allein 95 % der Trockenmasse von Knochen bilden, kommen auch andere nicht-Kollagen-Proteine in Knochen vor (Johnson, Charchanti, *et al.* 2008). Anorganischer Hauptbestandteil ist HA ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), welches ausgehend von den Kollagenfibrillen für die Mineralisierung des Knochens verantwortlich ist (Sobotta and Welsch 2006). Daneben kommen unter anderem Kalziumkarbonat sowie andere Kalziumphosphate vor (Rössler, Rütter, *et al.* 2005).

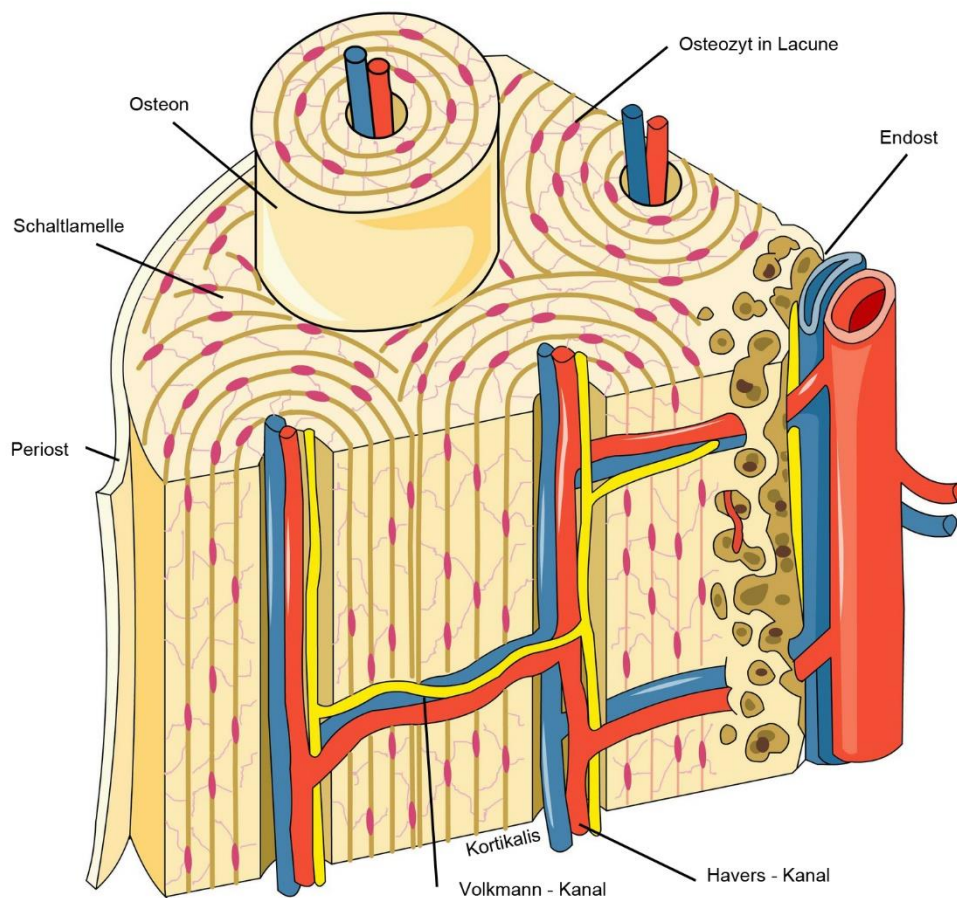


Abbildung 2: Aufbau des Knochens, modifiziert nach Servier Medical Art (Servier 2020)

Im lamellären, normalen Skelettknochen des Erwachsenen (Abbildung 2) stellen Osteone die Grundbaueinheit dar. Zentral in ihnen liegt der für die Versorgung zuständige Haverskanal; um diesen herum winden sich einzelne Lamellen. Osteone sind somit lange Zylinder, die, sich immer wieder aufgabelnd, der Längsachse des Knochens folgen. Als Verbindung der Haverskanäle untereinander sowie nach außen und in die Knochenmarkhöhle dienen Volkmann-Kanäle, die die Osteone schräg verlaufend perforieren (Junqueira, Carneiro, *et al.* 2005). Im Rahmen der fetalen Knochenbildung, Frakturheilung sowie bei Morbus Paget kommt auch noch eine zweite Knochenart, Geflechtknochen, vor. Aufgrund einer ungeordneten Anordnung der Kollagenfasern ist dieser nur wenig belastbar und wird im Rahmen des Knochenumbaus ersetzt (Stevens and Lowe 2005).

1.2.2 Knochenbildung

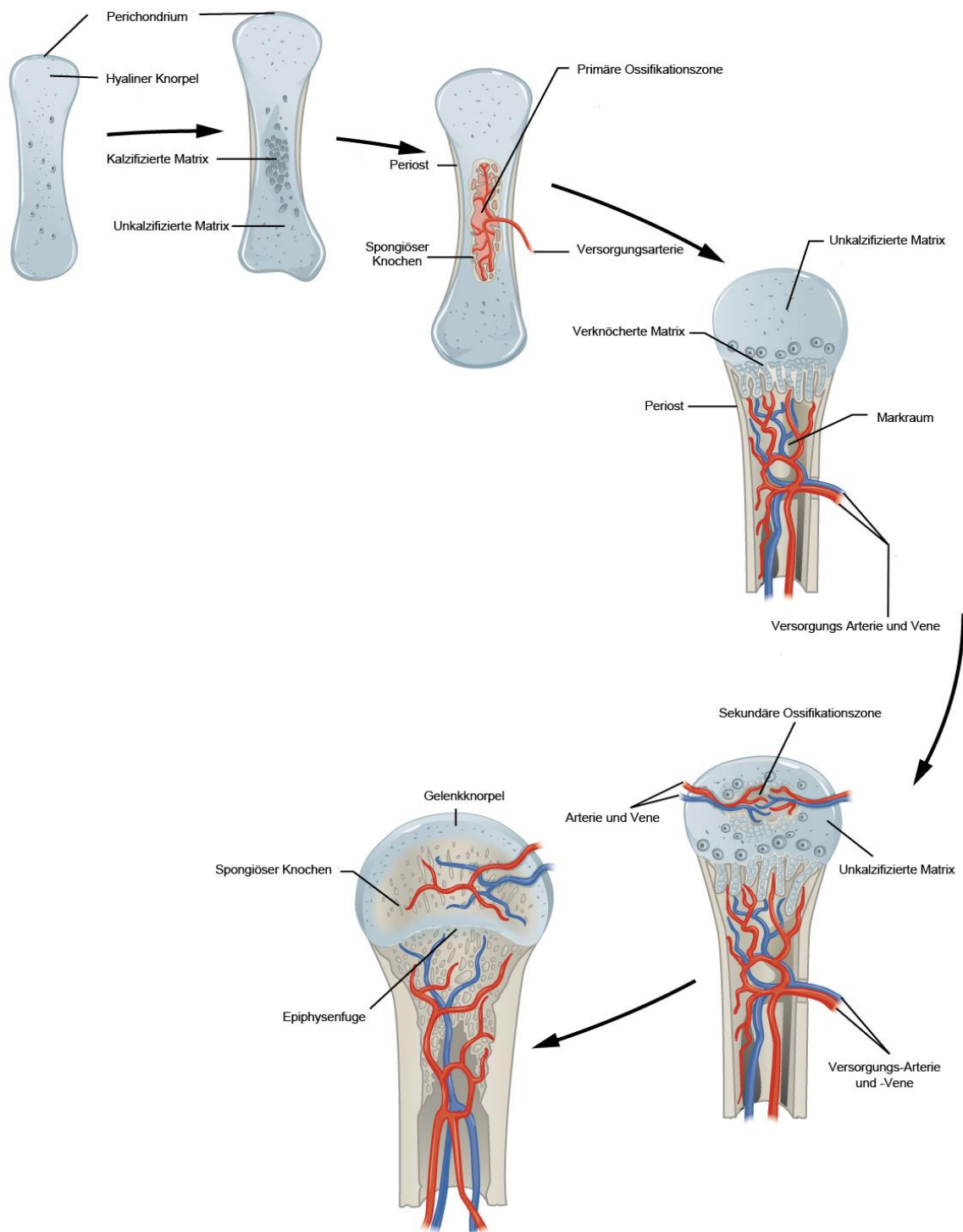


Abbildung 3: Einzelne Phasen der Knochenbildung im Bereich des Röhrenknochens, modifiziert nach Lindsay M. Biga et al. (Biga 2020)

Auf die Mechanismen der Knochenbildung (Abbildung 3) soll in diesem Rahmen nur insoweit eingegangen werden, wie diese für die Frakturheilung und somit auch die Therapieprinzipien von Knochendefekten beziehungsweise die Ansätze des Tissue Engineerings (TE) wichtig sind.

Im menschlichen Körper gibt es zwei Arten der Ossifikation, direkte und indirekte. Direkte beziehungsweise desmale Ossifikation ist selten (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008) und erfolgt durch die direkte Umwandlung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu Osteoblasten (Karsenty 2003). Enchondrale beziehungsweise indirekte Ossifikation erfolgt über den Zwischenschritt der Bildung eines knorpeligen Modells des Knochens (Abbildung 3). Dies wird angeregt und reguliert durch lokale Wachstumsfaktoren, von denen die Bone Morphogenetic Proteins (BMP) am besten bekannt und erforscht sind. Sie gehören zur Überfamilie des transformierenden Wachstumsfaktors- β (TGF- β) (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011; Frohlich, Grayson, *et al.* 2008; Karsenty 2003). Auf eine Hypertrophie der das Knochenmodell bildenden Chondrozyten erfolgt ein Einsprossen von Gefäßen, welches ein entscheidender Schritt der Osteogenese ist. Hierbei spielen lokale Wachstumsfaktoren, vor allem von den hypertrophen Chondrozyten ausgeschüttete, vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF), eine große Rolle (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008; Bianco, Riminucci, *et al.* 2001). Mit den Gefäßen wandern hämatopoetische Stammzellen, die das KM bilden (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008), MSC sowie Osteoblasten ein (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Ausgehend von einem zentralen primären und zwei peripheren sekundären Ossifikationszentren erfolgt anschließend die Knochenbildung. Am Übergang zwischen primärer und sekundärer Ossifikationszone bleibt die Wachstumsfuge für das Längenwachstum der Knochen bestehen. Das Dickenwachstum von Knochen erfolgt mittels appositionellem Wachstum (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008).

In Abhängigkeit von der jeweiligen Belastungssituation beziehungsweise von hormonellen Signalen erfolgt auch nach Abschluss der Knochenbildung ein fortwährender Umbau (Abbildung 4), wodurch eine optimale Anpassung an Veränderungen gewährleistet wird (Soldner and Herr 2001). Hierbei liegt ein Gleichgewicht aus Knochenaufbau durch

Osteoblasten und Knochenabbau durch Osteoklasten vor (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003).

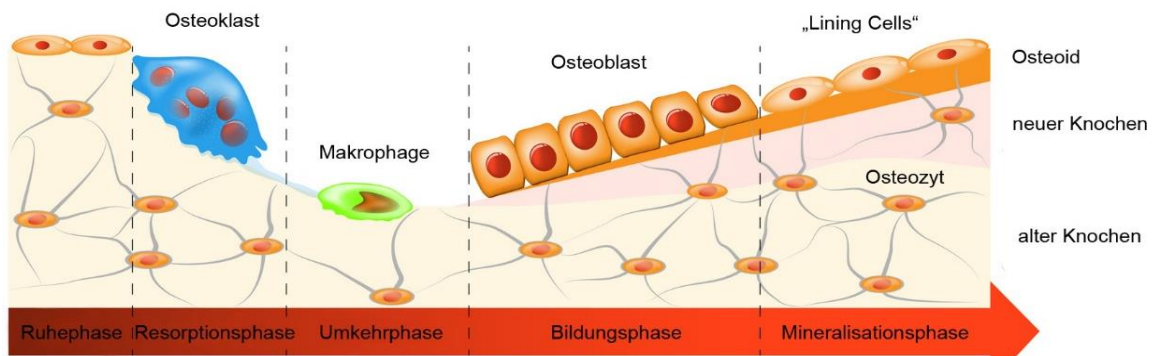


Abbildung 4: Phasen des Knochenumbaus, sowie Zellen im Knochen, modifiziert nach Lisowska *et al.* (Lisowska, Kosson, *et al.* 2018)

Dadurch beträgt die Umbaurate beim Erwachsenen noch jährlich 10 % der Knochenmasse, beim Kind ist sie noch um ein vielfaches höher (Junqueira, Carneiro, *et al.* 2005). Diese Anpassungsprozesse sind auch die Ursache für die Inaktivitätsatrophie von Knochen, zu der es beispielsweise bei langem Liegen, Lähmungen oder Gipsbehandlungen kommt. Prinzipiell ist bis zum dreißigsten Lebensjahr mit einer Zunahme der Knochenmasse zu rechnen. Ab dann überwiegt der Abbau, sodass gerade einmal noch 31-36 % der über Siebzigjährigen eine normale Knochenmasse haben (Rachmiel, Aizenbud, *et al.* 2005).

1.2.3 Zellen im Knochen

Osteoblasten synthetisieren die Knochenmatrix und leiten sich von in Endost und Periost befindlichen Osteoprogenitorzellen ab, die ihrerseits den Ursprung in MSC haben (Johnson, Charchanti, *et al.* 2008). Ein Vorhandensein von MSC im Knochen wurde schon lange Zeit vermutet. Aufgrund ihrer geringen Anzahl, einer unklaren Morphologie sowie einem unklaren Phänotyp, konnten sie aber lange Zeit nicht isoliert werden (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Reife Osteoblasten teilen sich nicht mehr (Moreira CA 2008). Ihre Aufgabe ist neben der Bildung von Kollagen auch die Kontrolle über die Mineralisierung des gebildeten Osteoids. Haben sie sich vollständig mit Osteoid eingemauert, werden sie zu ihrer terminal differenzierten Form, den Osteozyten. Osteoblasten treten nie allein auf, sondern fungieren immer in Zellverbänden, sind oft über Gap-Junctions miteinander verbunden und scheinen auch mit dem

im Knochen enthaltenen Netzwerk aus Osteozyten zu kommunizieren (Abbildung 5).

OSTEON

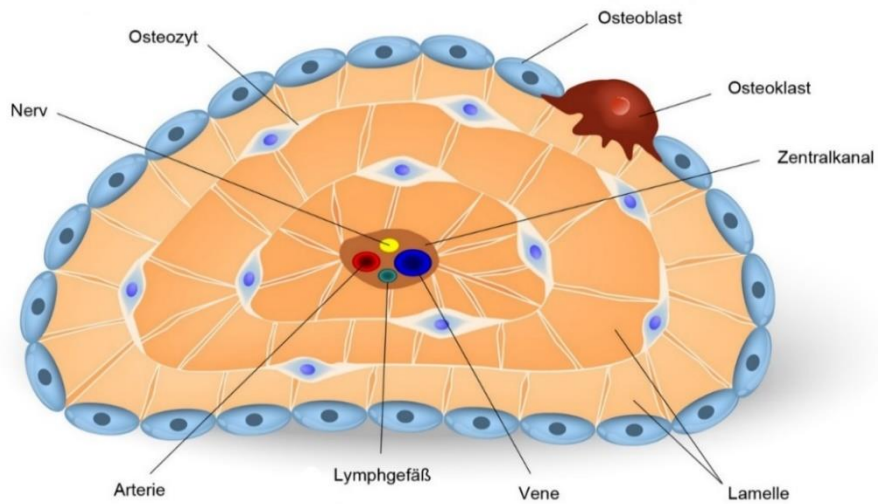


Abbildung 5: Anordnung der Zellen des Knochens innerhalb eines Osteons, modifiziert nach Designua (Designua 2020)

Neben Kollagen Typ I bilden Osteoblasten noch anderer Proteine sowie para- und autokrine Wachstumsfaktoren (Sobotta and Welsch 2006). Durch Bildung des Liganden für den nukleären Faktor Kappa B-Rezeptor (RANKL) aktivieren sie diesen in Osteoklastenvorläuferzellen und regulieren dadurch mit anderen von Osteoklasten sezernierten Faktoren deren Differenzierung und somit den Abbau von Knochen (Moreira CA 2008). Auf Osteoblasten sind unter anderem Rezeptoren für insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), Vitamin D₃, sowie Parathormon vorhanden. Vitamin D₃ reguliert die Expression von Osteokalzin, welches eine hohe Bindungskraft für HA hat und somit für die Mineralisation von Knochen mitverantwortlich ist. Besonders interessant ist hierbei, dass Osteoblasten die einzigen Knochenzellen sind, die Rezeptoren für Parathormon tragen, welches die Knochenresorption einleitet. Sie bauen an der Knochenoberfläche den unmineralisierten Osteoidsaum ab und ermöglichen es dadurch Osteoklasten, welche aus mit Vorläuferzellen der Monozyten und Makrophagen verwandten Zellen hervorgehen und somit eher mit hämatopoetischen als mit mesenchymalen Zellen verwandt sind, den Knochen abzubauen (Sobotta and Welsch 2006).

1.2.4 Frakturheilung

Knochen heilt ausgezeichnet (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003). Dies liegt daran, dass er als eines der wenigen Organe im menschlichen Körper während der gesamten Lebenszeit eines Menschen sein Regenerationspotential behält und dadurch eine komplette Restitutio ad Integrum ohne Narbenbildung oder qualitative Einbußen möglich ist (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007; Dimitriou, Jones, *et al.* 2011).

Analog zur Wundheilung bei Weichteilgewebe (Siewert and Brauer 2010) wird auch bei Knochen histologisch zwischen primärer und sekundärer Bruchheilung unterschieden. Direkte Bruchheilung ist dabei selten und nur bei absolutem Kontakt der Bruchflächen, kompletter Bruchstabilität und lediglich minimalen interfragmentären Belastungen möglich. Hierbei kommt es zur Einleitung der sofortigen Wiederherstellung der Knochen-Kontinuität durch kortikale Zellen (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007). Dies geschieht ohne Kallusbildung, weshalb auch von Kontaktheilung gesprochen wird (Niethard, Pfeil, *et al.* 2009).

Für die Frakturheilung ist Ruhigstellung der Fragmentenden, ausreichend Kontakt zwischen den jeweiligen Fragmentflächen (Rössler, Rüther, *et al.* 2005), axiale Ausrichtung (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008), ausreichend erhaltene Gefäßfunktion sowie

Vitalität und Regenerationspotential der Gewebe im Kontaktbereich essentiell (Rössler, Rüter, *et al.* 2005).

Allgemein lässt sich die normale, als Sekundär- beziehungsweise Spaltheilung bezeichnete Knochenheilung in vier Phasen gliedern (Abbildung 6).

- A. Initiale Verletzungsphase mit Frakturhämatom
 - B. Entzündungsphase mit Bildung eines bindegewebigen Kalluses (3-14 Tage)
 - C. Phase der Kallushärtung durch Umbau zu Geflechtknochen (Wochen bis Monate)
 - D. Remodelling-Phase mit Wiederherstellung des Prä-Frakturzustandes (1-2 Jahre)
- (Niethard, Pfeil, *et al.* 2009)



Abbildung 6: Abfolge der einzelnen Phasen der Frakturheilung; A: Initiale Verletzungsphase; B: Entzündungsphase; C: Phase der Kallushärtung; D: Remodelling-Phase (Niethard, Pfeil, *et al.* 2009)

Moderne chirurgische Techniken und Werkstoffe können somit selbst in ungünstigen Situationen noch eine Heilung erreichen (Woodruff, Lange, *et al.* 2012). Radiologische Heilung liegt bei idealen Bedingungen nach ca. 4 bis 13 Monaten vor. Die genaue Dauer ist jeweils abhängig von Frakturtyp, -stabilität und -lokalisation, Patientencompliance, -gesundheit, -ernährungszustand usw. (Axelrad, Kakar, *et al.* 2007). Durch eine verminderte Sauerstoffversorgung wegen Unterbrechung der Blutzufuhr und Frakturhämatombildung (Sen and Miclau 2007) sowie nekrotischen Knochenteilen im Frakturspalt kommt es primär zu einer Entzündungsreaktion (Giannoudis, Psarakis, *et al.* 2007). Durch lokale, systemische und sogar neuronale Signale erfolgt eine Ausschüttung von Entzündungs- und Wachstumsfaktoren wie Interleukine, Tumornekrosefaktor α (TNF α), BMPs, (Schroeder and Mosheiff 2011) Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), IGF, Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), VEGF und TGF β aus lokalen Zellen (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007). Hypoxie ist dabei der Haupttrigger für die Freisetzung von VEGF, welcher Gefäßeinsprossung bewirkt und somit den - analog zur Ossifikation - entscheidenden Schritt der Frakturheilung auslöst (Sen and

Miclau 2007). Mit den Blutgefäßen gelangen Nährstoffe und Zellen in den Frakturspalt (Schroeder and Mosheiff 2011). Die Mediatoren induzieren (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011) zusammen mit mechanischen Reizen (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011) die Rekrutierung von Osteoprogenitorzellen (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011) und die Bildung eines primären, knorpeligen, weichen Kallus (Sen and Miclau 2007). Dieser dient der primären Stabilisierung der Fraktur (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008) und als Gerüst für das Einwachsen von Zellen (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007). Nun kommt es im Bereich des Periosts zu einer sofortigen direkten Ossifikation (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011), welche dem harten Kallus entspricht (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008) und im Bereich des weichen Kallus zu einem schrittweisen Umbau des Knorpelgewebes (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011) zu Geflechtknochen. Der so entstandene harte Kallus wird zum Abschluss durch lamellären, dem umgebenden Knochen identischen Knochen ersetzt (Niethard, Pfeil, *et al.* 2009).

1.2.5 Problematische Knochendefekte und Probleme bei der Defektheilung

Es gibt verschiedene klinische Situationen, in denen die normale Knochenheilung oftmals zu keinem oder nur stark verzögertem Erfolg führt und die für die Chirurgie ein großes Problem darstellen (Ehnert, J, *et al.* 2011). Ursächlich für das Ausbleiben der Heilung ist dabei entweder die Größe des Knochendefektes, eine Verminderung des Regenerationspotentials, ein Mangel an Stabilität oder die Kombination aus mehreren dieser drei Faktoren (Tabelle 1)(Rittstieg, Wurm, *et al.* 2020).

Tabelle 1: Ursachen und klinische Situationen die zu einem Ausbleiben der Frakturheilung führen

Defektgröße	<ul style="list-style-type: none"> • Deformitäten Korrekturen mit Osteotomie und Arthrodesse (Frohlich, Grayson, <i>et al.</i> 2008) • große skeletale Defizite nach chirurgischer Tumorentfernung (Huo, Friedlaender, <i>et al.</i> 1992)
Vermindertes Regenerationspotential	<ul style="list-style-type: none"> • Nekrosen nach Bestrahlung oder Einwirkung chemischer Substanzen (Schroeder and Mosheiff 2011) • Osteomyelitis (Dawson, Kanczler, <i>et al.</i> 2011) • Infektion des Kallus sowie des umgebenden Gewebes (Janicki and Schmidmaier 2011; Ehnert, Aspera-Werz, <i>et al.</i> 2019) • Osteoarthritis beziehungsweise entzündliche Arthritis (Dawson, Kanczler, <i>et al.</i> 2011) • Alterationen in der Immunantwort (Vester, Huber-Lang, <i>et al.</i> 2014)
Mangelnde Stabilität	<ul style="list-style-type: none"> • insuffiziente chirurgische Technik in der Frakturversorgung (Woodruff, Lange, <i>et al.</i> 2012; Rittstieg, Wurm, <i>et al.</i> 2020)
Individuelle Patientenfaktoren	<ul style="list-style-type: none"> • Alkohol- und/oder Nikotinabusus (Niethard, Pfeil, <i>et al.</i> 2009; Ehnert, Aspera-Werz, <i>et al.</i> 2019; Aspera-Werz, Chen, <i>et al.</i> 2019) • pAVK (Niethard, Pfeil, <i>et al.</i> 2009) • systemische Erkrankungen (Janicki and Schmidmaier 2011) wie z.B. Osteoporose (Dimitriou, Jones, <i>et al.</i> 2011). • Medikamenteneinnahme (z.B. Steroide, Protonenpumpenhemmer) (Niethard, Pfeil, <i>et al.</i> 2009)
Kombinationen	<ul style="list-style-type: none"> • Trümmerfrakturen, (Frohlich, Grayson, <i>et al.</i> 2008), v.a. im Kontext von extensivem Weichteilschaden (Woodruff, Lange, <i>et al.</i> 2012; Rittstieg, Wurm, <i>et al.</i> 2020; Haug, Kanz, <i>et al.</i> 2017)

	<ul style="list-style-type: none"> • Endoprothesenlockerung (Frohlich, Grayson, <i>et al.</i> 2008) • Endoprothesenrevision (Huo, Friedlaender, <i>et al.</i> 1992) • periprothetische Frakturen (Giannoudis, Psarakis, <i>et al.</i> 2007)
--	--

In diesen klinischen Situationen kann es zu einer Diskrepanz zwischen der tatsächlichen Leistungsfähigkeit und Migrationsrate von Osteoprogenitorzellen im Patienten und der für die Heilung des Defekts benötigten Leistungsfähigkeit kommen (Schroeder and Mosheiff 2011). Das Problem ist also ein aus der klinischen Situation resultierendes Versagen der physiologischen Reaktion und-/oder die Größe des Defektes (Seebach, Schultheiss, *et al.* 2010). Ab einer Defektgröße von 2,5 mal dem Knochenradius (Schroeder and Mosheiff 2011) ist von einem Ausbleiben der Spontanheilung auszugehen (Bianco, Riminucci, *et al.* 2001). In Deutschland spricht man nach vier Monaten von einer verzögerten Knochenbruchheilung und nach sechsmonatigem Ausbleiben der Frakturheilung von Pseudarthrosenbildung (Dittel and Weise 2003). In den USA gibt es jedes Jahr 6 bis 7,9 Millionen Frakturen (Zhao, Weir, *et al.* 2010; Axelrad, Kakar, *et al.* 2007; Giannoudis, Psarakis, *et al.* 2007). Quellen gehen hierbei von Frakturheilungsstörungen bis hin zur Pseudarthrosenbildung mit einer Inzidenz von 5 % bis 13 % aus (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011; Axelrad, Kakar, *et al.* 2007; Giannoudis, Psarakis, *et al.* 2007; Pieske, Wittmann, *et al.* 2009; Calori, Mazza, *et al.* 2011).

Man kann verschiedene Arten von Pseudarthrosen unterscheiden (Abbildung 7), wobei vor allem die primäre Einteilung in aseptisch/infiziert und vital/avital von großer Bedeutung ist, da hiervon das therapeutische Vorgehen abhängig ist (Runkel and Rommens 2000).

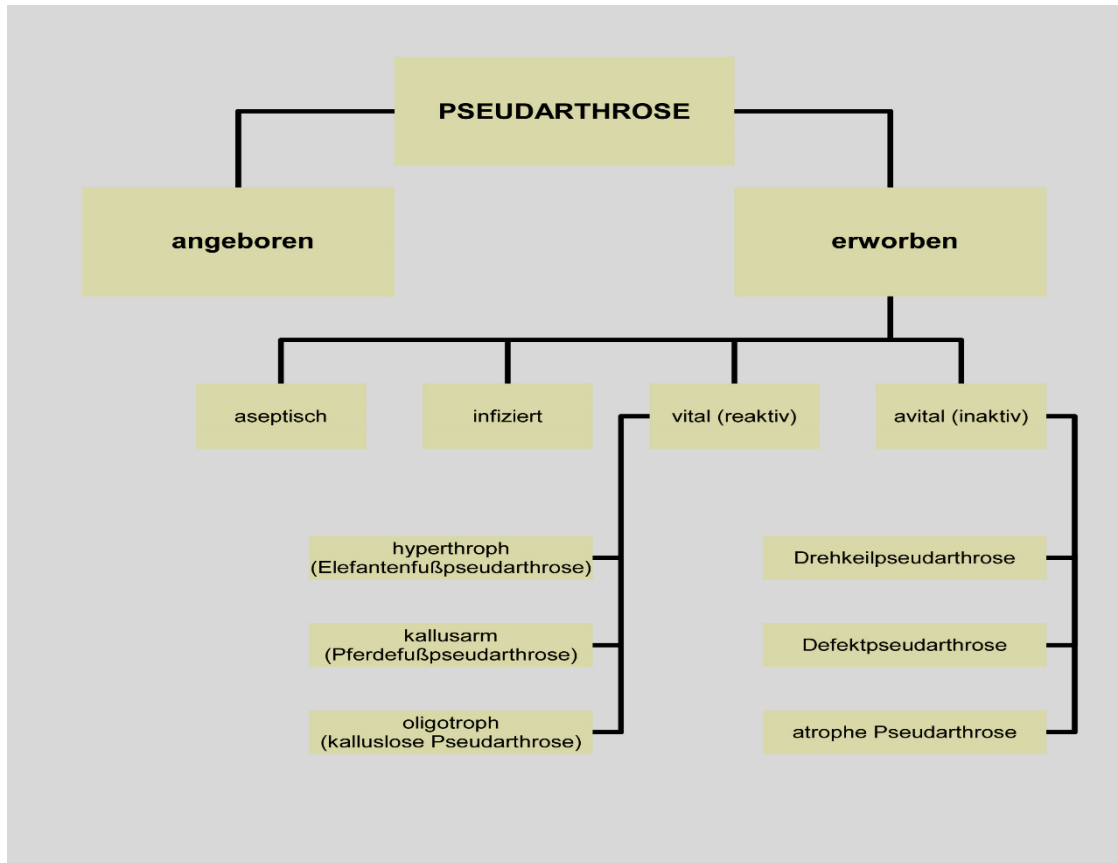


Abbildung 7: Übersicht der Klassifikation der Pseudarthrosen nach Runkel & Rommens (Runkel and Rommens 2000)

Atrophische beziehungsweise avitale Pseudarthrosen sind durch einen Mangel an biologischem Substrat, meist verursacht durch eine Schädigung des zur Fraktur hinführenden Gefäßes, (Regauer, Jurgens, *et al.* 2006) aber auch etwa durch Knochensequester-Bildung charakterisiert (Runkel and Rommens 2000). Hierdurch kommt es zu einer verminderten bis ganz ausbleibenden Kallusbildung, die häufig mit einer Resorption von Knochen einher geht (Schroeder and Mosheiff 2011). Die Therapie avitaler Pseudarthrosen umfasst unter anderem eine Stimulation der Knochenneubildung durch Anfrischen der Frakturende, Knochentransplantationen, die Kallusdistraction oder teilweise auch alternative Verfahren wie die Einbringung von BMPs (Runkel and Rommens 2000). Bei oligotrophen Pseudarthrosen mit adäquater Kallus-Bildung sowie hypertrophen Pseudarthrosen mit einer vermehrten Kallus-Bildung wird die Frakturheilung häufig durch eine mangelhafte Frakturstabilität oder (Schroeder and Mosheiff 2011) mangelnden Fragmentenden-Kontakt, wie etwa nach fehlerhaft durchgeführter Osteosynthese, verhindert. Diese Formen der Pseudarthrose sind am einfachsten zu therapieren, da häufig bereits eine suffiziente und stabile Osteosynthese ausreichend ist (Runkel and Rommens 2000). Defektpseudarthrosen mit Infekt sind hingegen am schwierigsten zu therapieren (Dittel and Weise 2003). Sie bedürfen einer Stufentherapie, die meist erst nach mehrfachen Eingriffen erfolgreich ist (Runkel and Rommens 2000).

1.2.6 Therapieoptionen problematischer Knochendefekte und deren Limitationen

Grundprinzipien der Therapie problematischer Knochendefekte sind die Beseitigung der Ursache (Dittel and Weise 2003) durch mechanische Stabilisierung und/oder biologisch unterstützende Maßnahmen (Mahendra and Maclean 2007). Dies erfordert in der Regel ein chirurgisches Eingreifen (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011). Wichtig ist, dass bei klinisch für Frakturheilungsstörungen besonders prädisponierten Verletzungen wie z.B. offenen Trümmerfrakturen im Unterschenkelbereich, jedoch spätestens, wenn sich Frakturheilungsstörungen abzeichnen, frühzeitig entgegenwirkende Maßnahmen ergriffen werden (Dittel and Weise 2003). Giannoudis postuliert zur Therapie problematischer Knochendefekte das sogenannte „Diamond Konzept“. Dieses beinhaltet neben den klassischen Bestandteilen der Frakturheilung – osteogene Zellen, Wachstumsfaktoren und osteokonduktives Scaffold – zusätzlich und gleichwertig das mechanische Umfeld (Abbildung 8).

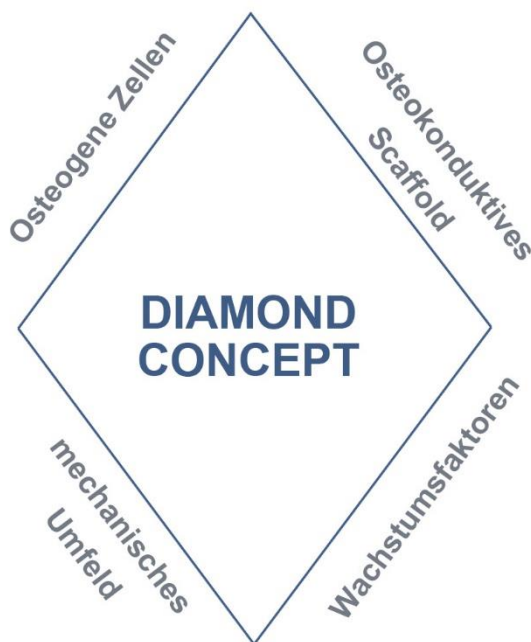


Abbildung 8: Das Diamond Concept der Frakturheilung (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007)

Dieses ist unter anderem deshalb wichtig, da es essentiell für die Bildung eines die Fraktur überbrückenden Kallus ist, der als Leitschiene und Ausgang für die weitere Knochenheilung dient (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007). Dieses erweiterte Konzept wurde von mehreren anderen Autoren aufgegriffen (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011; Janicki and Schmidmaier 2011; Seebach, Schultheiss, *et al.* 2010). Die Wahl des Materials zur mechanischen Stabilisierung erfolgt in Abhängigkeit von der Fraktur und umfasst alle

gängigen Maßnahmen der Osteosynthese (Dittel and Weise 2003) sowie der internen und externen Stabilisierung (Giannoudis, Einhorn, *et al.* 2007). Zusätzlich wird häufig ein Auffrischen der Frakturflächen vorgenommen (Dittel and Weise 2003) und die Heilung mittels Knochentransplantat angeregt (Calori, Mazza, *et al.* 2011). Als Füllmaterialien stehen einerseits autogene-, allogene-, oder auch xenogene Knochentransplantate, andererseits künstliche biologische oder synthetische Implantate (Hofmann, Gorbulev, *et al.* 2020; Rentsch, Rentsch, *et al.* 2012), sowie verschiedene Metalle zur Verfügung (Grellier, Granja, *et al.* 2009).

Die Begriffe allogene, autogene und xenogene Knochentransplantate wurden bereits 1867 durch den Franzosen Louis Ollier geprägt, der versuchte, schlecht heilende Brüche mit Knochentransplantaten zu therapieren (Ollier 1867). Heute werden ca. eine Million Knochentransplantationen jährlich weltweit in den Gebieten der Orthopädie, Neurochirurgie, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Zahnheilkunde durchgeführt. Goldstandard ist dabei weiterhin der autologe Knochen (Hofmann, Gorbulev, *et al.* 2020; Heinemann, Gelinsky, *et al.* 2011) Allein in Deutschland kam es in den Jahren 2004 bis 2010 zu einer Zunahme der Knochentransplantat-Eingriffe von 152 600 auf 206 100 (Jerosch and Bakhschai 2012). Die drei wichtigsten Eigenschaften eines Transplantates sind: Osteogenität, d.h. das Vorhandensein von Knochen bildenden Osteoprogenitorzellen; Osteoinduktivität, d.h. das Vorhandensein von Osteoblasten etc. stimulierenden Wachstumsfaktoren wie BMPs sowie Osteokonduktivität d.h. das Vorhandensein einer die Knochenbildung fördernden Matrix (Schieker, Heiss, *et al.* 2008). Osteogene und osteoinduktive Materialien wirken dabei aktiv, osteokonduktive Materialien lediglich passiv durch die Erleichterung der Migration von Osteoblasten oder die Begünstigung des Einsprossens von Gefäßen (Mahendra and Maclean 2007). Eine weitere oft erwünschte Eigenschaft ist die Osteointegration - das feste Verbinden mit der Empfängerstelle (Kao and Scott 2007).

Autologe Knochentransplantate sind als einzige osteogen, osteoinduktiv und osteokonduktiv (Cancedda, Giannoni, *et al.* 2007). Darüber hinaus lösen sie weder Immunreaktionen aus (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011), noch besteht die Gefahr einer Krankheitsübertragung vom Spender. Ein zusätzlicher Vorteil ist ihre leichte Verfügbarkeit. Es gibt spongiöse, kortikospongiöse und vaskularisierte Knochen-Eigentranplantate. Spongiöse Eigentranplantate sind hierbei der Goldstandard und werden am häufigsten aus dem Beckenkamm entnommen. Sie können jedoch auch aus

einer Vielzahl anderer Quellen gewonnen werden (Sen and Miclau 2007) oder in kleinen Mengen auch direkt aus dem an das Operations (OP)-Gebiet angrenzenden Knochen stammen. Ein Nachteil spongiöser Transplantate ist, dass sie keine mechanische Stabilität bieten. Wird mechanische Stabilisierung benötigt, bietet sich die Verwendung kortikospongiöser Blöcke an (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008). Aufgrund einer geringeren in ihnen enthaltenen Zellzahl regen sie die Heilung allerdings langsamer und weniger stark an als reine Spongiosa (Sen and Miclau 2007). Ein weiterer Unterschied zwischen kortikospongiösen Blöcken und Spongiosa ist die Abbaurate. Während Spongiosa bereits nach einem Zeitraum von sechs Monaten bis einem Jahr komplett durch neuen Knochen ersetzt wurde, sind nach einem Jahr noch 40 % nekrotisches kortikospongiöses Transplantat vorhanden (Cypher and Grossman 1996). Zu beachten ist zudem, dass untrennbar mit der Inkorporation eine Resorption und somit mechanische Schwächung des Transplantates einhergeht. Diese muss temporär durch andere Stabilisierungsmaßnahmen ausgeglichen werden. Eine Sonderstellung haben vaskularisierte Transplantate, die vor allem aus der Fibula stammen (Huo, Friedlaender, *et al.* 1992). Sie sind sehr aufwendig (Sen and Miclau 2007), erfordern einen mikrochirurgischen Gefäßanschluss (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008) und sind deshalb hauptsächlich spezialisierten Zentren (Drosse, Volkmer, *et al.* 2008) und besonderen Indikationen vorbehalten. Sie bieten Vorteile insbesondere bei sehr schlechtem Zustand des Gewebes an der Implantationsstelle (Huo, Friedlaender, *et al.* 1992).

Bei allen Transplantaten hängt das Gelingen der Transplantation entscheidend von der Durchblutungssituation an der Defektstelle ab (Johnson, Charchanti, *et al.* 2008). Wesentliche Nachteile autologer Transplantate sind neben der limitierten Verfügbarkeit, die mitunter beträchtliche zweite Stellen Morbidität (Hench and Thompson 2010; Sen and Miclau 2007; Huo, Friedlaender, *et al.* 1992; Moshaverinia, Chen, *et al.* 2012), zudem eine starke Variabilität der Transplantat-Qualität in Abhängigkeit vom Spender (Calori, Mazza, *et al.* 2011) sowie häufig unterschätzte und nicht unerhebliche direkte und indirekte Kosten (Sen and Miclau 2007). Weiterhin besteht auch hier die Gefahr des Transplantatversagens, unter anderem durch mangelnde Revaskularisation mit Sequesterbildung (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008), Infektion oder Fraktur; - Revisionseingriffe werden notwendig (Huo, Friedlaender, *et al.* 1992). Eine generelle Kontraindikation für Transplantate sind infizierte Defekte. Diese müssen saniert werden, bevor eine Transplantation möglich ist (Mahendra and Maclean 2007). Für die Zukunft ist anzumerken, dass momentan neue chirurgische

Techniken zur Transplantatentnahme mit geringerer Morbidität entwickelt werden (Brawley and Simpson 2006).

Weitere Ansätze mit autologen Materialien versuchen den häufig für die Heilungsstörung verantwortlichen lokalen Mangel an MSC und Osteoprogenitorzellen (vergleiche Problematische Knochendefekte und Probleme bei der Defektheilung) auszugleichen. Hierfür wird vor allem patienteneigenes Knochenmarksaspirat aus dem Beckenkamm verwendet. Die darin neben den gewünschten Zellen enthaltenen Wachstumsfaktoren sind ein bedeutender Vorteil patienteneigener Knochenmarksaspirate (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011). Das KM kann perkutan aspiriert werden, der MSC-Anteil in ihm durch Zentrifugation und Abscheidung unerwünschter Bestandteile erhöht und dann perkutan unter Durchleuchtung in die Fraktur injiziert werden (Mahendra and Maclean 2007). KM-Aspirate sind dabei osteogen und osteoinduktiv (Sen and Miclau 2007). Ihre genauen Eigenschaften variieren sehr stark in Abhängigkeit von der Menge und Qualität der MSC im KM-Aspirat. Diese hängt wiederum vom Spender selbst, vor allem von seinem Alter (geringere MSC-Zahl bei älteren Menschen), aber auch von weiteren Faktoren ab (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011). Nachdem diese Technik zur Anregung der Frakturheilung seit mehr als 20 Jahren im klinischen Gebrauch ist, wurden Methoden entwickelt, die Stammzellen (SC) aus den Aspiraten zu isolieren und dann nach weiterer Aufbereitung in die Defektstellen einzubringen (Schroeder and Mosheiff 2011). Endgültige Studien zur Effektivität dieser Techniken fehlen noch. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die lokale Applikation von MSC sicher ist. Dabei erscheinen vor allem auch Ansätze, die MSC mit osteoinduktiven Materialien kombinieren, vielversprechend (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009).

Allogene Knochentransplantate sind die Alternative zu autologen Knochentransplantaten. Allein in Deutschland werden derzeit im muskuloskelettalen Bereich ca. 35.000 allogene Transplantationen jährlich durchgeführt (Pruß 2012). Es gibt Knochenbanken, die auf die Entnahme, Untersuchung, Aufbereitung, Verarbeitung, Lagerung und Verteilung von allogenen Knochen spezialisiert sind (Bakhschai 2012). Die Transplantate stammen sowohl von Lebendspendern (Huo, Friedlaender, *et al.* 1992) als auch von Leichen (Maronna 2012; Pruß 2012) und können in einer Vielzahl klinischer Situationen genutzt werden (Penner 2012; Friesecke 2012; Oehme 2012; Wess 2012; Sikorski 2012; Katthagen 2012; Guder 2012). Besonders von Vorteil sind sie bei morbidem Patienten mit nicht ausreichend qualitativ geeignetem eigenem transplantierbarem Knochen (Pieske,

Wittmann, *et al.* 2009) oder Defekten, die so groß sind (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011), dass die Entnahme von Transplantaten hierfür eine zu große Morbidität an der Entnahmestelle bedeuten würde (Schroeder and Mosheiff 2011). Verwendet wird frischer, tiefgefroren gelagerter, gefriergetrockneter mineralisierter sowie demineralisierter allogener Knochen als Spongiosa, Spongiosa-Chips oder als ein individuell an die Bedürfnisse angepasstes Transplantat. Allogene Transplantate werden zur Vorbeugung der Übertragung von Infektionskrankheiten mittels Sterilisation devitalisiert (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011; Calori, Mazza, *et al.* 2011). Daher besitzen sie keine osteogenen Eigenschaften (Mahendra and Maclean 2007). Auf die verschiedenen Aufbereitungs- und Verarbeitungsmethoden kann aufgrund des begrenzten Rahmens dieser Arbeit nicht im Detail eingegangen werden. Es ist jedoch anzumerken, dass häufig mit einer Zunahme des Aufbereitungsgrades auch die Osteoinduktivität, Osteokonduktivität sowie die mechanische Belastbarkeit beeinflusst wird (Huo, Friedlaender, *et al.* 1992).

Die häufigste Form der allogenen Transplantate ist die demineralisierte Knochenmatrix. Die Demineralisierung erfolgt durch Säure. Kollagen, nicht-Kollagenproteine sowie Wachstumsfaktoren (z.B. BMPs) bleiben erhalten. Dank Freilegung der Wachstumsfaktoren durch die Demineralisierung sind diese Transplantate gut osteoinduktiv. Anzumerken ist, dass bei demineralisierter Knochenmatrix eine große Variabilität in der Konzentration der vorhandenen Wachstumsfaktoren und somit auch in der Effektivität besteht (Calori, Mazza, *et al.* 2011).

Hauptrisikofaktoren allogener Transplantate sind die Auslösung von Immunreaktionen (Janicki and Schmidmaier 2011) mit sofortigem Abbau des Transplantates (Cypher and Grossman 1996), inkonsistente Heilung (Seebach, Schultheiss, *et al.* 2010), die Übertragung von Krankheiten (Janicki and Schmidmaier 2011) sowie Spätfrakturen im Transplantatbereich (Schroeder and Mosheiff 2011; Cypher and Grossman 1996). Auch können ihre osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften gerade bei atrophen Pseudarthrosen oder großen Defekten nicht ausreichend sein.

Alternativ zu allogenen Transplantaten gibt es xenogene Transplantate. Diese stammen beispielsweise aus Rinderknochen oder Korallen und werden so aufbereitet, dass sie keine organischen Bestandteile mehr enthalten. Sie bestehen lediglich aus einer mineralischen Matrix. Dadurch sind sie rein osteokonduktiv (Kao and Scott 2007).

Der Vollständigkeit wegen seien an dieser Stelle synthetische Materialien erwähnt: Zu ihnen gehören beispielsweise Kalziumphosphat-Zemente, β -Trikalzium Phosphate, HA (Hofmann,

Gorbulev, *et al.* 2020) und Glas-Keramiken. Ausführlicher wird darauf im Abschnitt TE bei Knochen eingegangen. Verwendet werden sie vor allem zum Strecken von autologen Knochentransplantaten oder in Verbindung mit Wachstumsfaktoren beziehungsweise Zellen (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011). Nachteil von ihnen ist die Gefahr, dass es beim Ausbleiben von Osteoinduktion zur Implantatlockerung kommt (Ehnert, J, *et al.* 2011). Zudem sind sie oftmals durch eine mangelnde Resorbierbarkeit sowie einer eventuellen toxischen Wirkung der Materialien selbst oder ihrer Zerfallsprodukte charakterisiert (Kao and Scott 2007).

Ein weiteres Beispiel für nicht biologische Knochenersatzstoffe ist das Metall Tantalum, welches zur Herstellung von Implantaten z.B. für Hüftarthroplastik oder speziell angefertigte Tumorimplantate verwendet wird. Tantalum ist lediglich osteokonduktiv, was seine Einsatzmöglichkeiten limitiert (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011).

Einen ähnlichen Ansatz wie die bereits erwähnte Applikation von MSC verfolgt die lokale Verwendung von Wachstumsfaktoren. BMPs konnten aus der Kortikalis, dem Dentin sowie aus zahlreichen Knochentumoren extrahiert werden (Huo, Friedlaender, *et al.* 1992). Sie sind die bisher am besten untersuchten Wachstumsfaktoren, da sie potente Osteoinduktoren sind und MSCs und andere Osteoprogenitorzellen zur Differenzierung zu Osteoblasten induzieren können (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011). Darüber hinaus beeinflussen sie die Vaskularisation positiv (Mahendra and Maclean 2007). Es gibt rekombinante Versionen von BMP-2 und BMP-7 (rhBMP-2, rhBMP-7), die bereits seit längerem für den klinischen Einsatz im Rahmen spezieller Indikationen wie Spondylodese skelettal erwachsener Patienten mit degenerativen Bandscheibenerkrankungen im Lumbosakralbereich oder auch für die Behandlung akuter offener Tibiaschaftfrakturen zugelassen sind. In der Regel werden sie in Kombination mit Kollagenträgermatrizes eingesetzt (Rittstieg, Wurm, *et al.* 2020; Cancedda, Giannoni, *et al.* 2007). Die Wirksamkeit wird einer Dosierung der BMPs jenseits physiologischer Werte zugeschrieben (Sen and Miclau 2007): Die BESST-Studie mit 450 Patienten konnte für rhBMP-2 im Rahmen der Therapie offener Tibiaschaftfrakturen eine Beschleunigung der Heilung, eine Reduktion der Infektionsraten sowie eine Reduktion der Anzahl an nötigen invasiven Eingriffen zeigen - verglichen zu einem identischen operativen Vorgehen ohne gleichzeitige Verwendung von rhBMP-2 (Starr 2003). Friedlaender *et al.* konnten in einer Studie mit 124 Patienten mit Non-Unions für rhBMP-7 dieselbe Effektivität wie für autologe Transplantate nachweisen. Das bedeutet eine Verminderung der Notwendigkeit von Knochentransplantationen mit damit einhergehender Reduktion der Morbidität, der OP-Dauer, der postoperativen Schmerzen etc. (Friedlaender, Perry, *et al.*

2001). Hauptgefahrenpunkte sind hierbei die Bildung von Knochen an ektopter Stelle sowie die Induktion von allergischen Reaktionen durch das Trägermaterial; beides wurde aber noch nicht in klinisch-relevantem Ausmaß beobachtet (Axelrad, Kakar, *et al.* 2007). Denkbare Einsatzmöglichkeiten sind die Behandlung von Pseudarthrosen, offenen Frakturen, Arthrodesen, aseptischen Knochennekrosen und kritischen Knochendefekten (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011), wobei die klinische Anwendung in vielen Fällen „Off-Label“ erfolgt (Blokhuys, Calori, *et al.* 2013). Manche Studien gehen von einer Kostenersparnis (verglichen zu herkömmlichem Vorgehen) bei der Verwendung von rhBMPs aus (Wei, Cai, *et al.* 2012). Generell kann die Kosteneffektivität jedoch als nicht endgültig geklärt betrachtet werden (Blokhuys, Calori, *et al.* 2013). Der Vollständigkeit halber sei auch noch auf nichtinvasive Ansätze der biophysikalischen Stimulation (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011; Sen and Miclau 2007; Janicki and Schmidmaier 2011) sowie auf systemische Ansätze hingewiesen, die sich im Rahmen klinischer Studien befinden. Systemische Ansätze bedienen sich Wachstumshormonen, Nebenschilddrüsenhormonen sowie anderen aus der Osteoporosetherapie kommenden Medikamenten wie Bisphosphonaten oder Denosumab, einem humanen monoklonalen Antikörper der an RANKL bindet (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011; Axelrad, Kakar, *et al.* 2007).

Falls mit den oben genannten Techniken keine Heilung erreicht werden kann, besteht die Möglichkeit der Wiederherstellung der Kontinuität mit Hilfe der Kallusdistraction (Hansis 2000). Sie wird auch als Ilizarov-Methode oder Verlängerungsosteotomie bezeichnet und besteht aus einer Osteotomie, auf die eine Distraction der Knochenenden folgt (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003; Rittstieg, Wurm, *et al.* 2020).

Hauptanwendungsgebiete der Verlängerungsosteotomie sind derzeit segmentale Defekte bei komplexen nicht heilenden Knochenbrüchen. Ein besonderer Vorteil ist die Wirksamkeit der Methode in entzündetem Gewebe (Mahendra and Maclean 2007). Hierbei wird das dem Knochen eigene Regenerationspotential genutzt, sodass die Technik daher nur im regenerationsfähigen Knochen zur Anwendung kommen darf (Schroeder and Mosheiff 2011). Die Distraction kann mit verschiedenen, speziell dafür vorgesehenen externen Fixateuren (Rössler, Rütter, *et al.* 2005) oder auch speziellen Marknagelsystemen geschehen (Hansis 2000). Es kann eine Distraction von ca. einem Millimeter täglich erreicht werden (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Hiermit ist auf einer Länge von bis zu 15 Zentimetern eine Erzeugung von primär fibrösen, vor Ort regenerierten eigenen Knochens möglich. Nach Reifung des primären Knochens sind dadurch gute Ergebnisse erzielbar. Aufgrund der

Reifungsdauer muss mit einem Behandlungszeitraum von drei bis fünf Tagen pro erzielttem Millimeter gerechnet werden (Hansis 2000). Ein Nachteil der Methode ist somit vor allem der Zeitfaktor (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011) - die lange Zeitspanne mit vielen Unannehmlichkeiten und eingeschränkter Lebensqualität für den Patienten (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011) bedingen eine schlechte Toleranz der Behandlung seitens des Patienten. Darüber hinaus kommt es im Bereich der Pin-Austrittsstellen der Verankerung des externen Fixateurs etc. häufig zu Entzündungen und es besteht eine erhöhte Infektionsgefahr (Mahboubian, Seah, *et al.* 2012).

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit der Kombination verschiedener Ansätze sowie Materialien. Da bei der Kombination verschiedener Ansätze und Materialien die Komplexität der Therapie zunimmt, gibt es, um die Handhabbarkeit in der klinischen Praxis zu verbessern, fertige Kits. Diese enthalten beispielsweise zusätzlich zu MSC auch noch demineralisierten Knochen. Die Heilungsraten liegen damit bei 63-90 % (Sen and Miclau 2007). Die Osteokonduktivität allogener Transplantate kann durch verschiedene Maßnahmen, von denen hier exemplarisch die Mischung mit autologer Spongiosa erwähnt sei, gesteigert werden (Calori, Mazza, *et al.* 2011). Die Weiterentwicklung hiervon entspricht dann in vielen Teilen den Ansätzen des TE.

1.3 TISSUE ENGINEERING

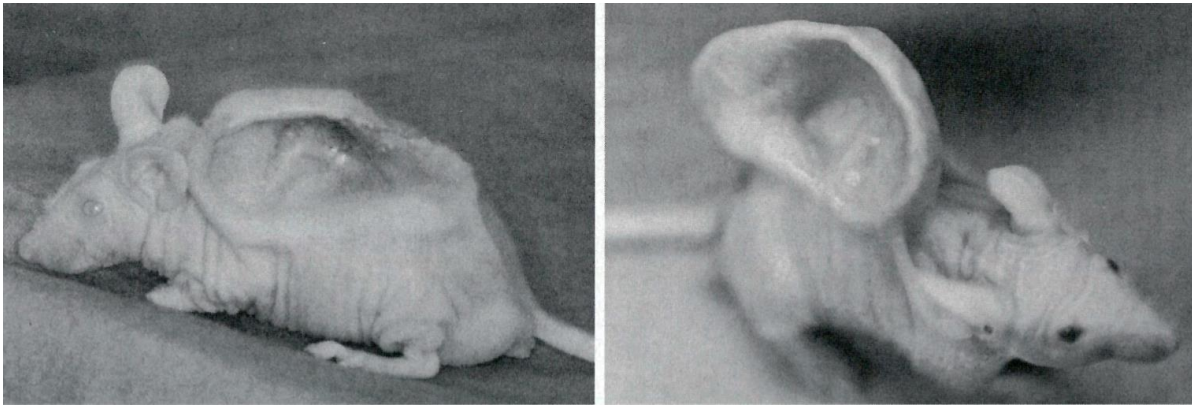


Abbildung 9: Ohrmaus (Cao, Vacanti, et al. 1997)

Beim TE handelt es sich um ein noch verhältnismäßig neues Feld der Forschung. Vorreiter sind Jay Vacanti und Bob Langer (Woodruff, Lange, et al. 2012; Meenen 2008), wobei vor allem Vacanti 1995 mit seiner „Ohr-Maus“ (Abbildung 9) die Aufmerksamkeit der weltweiten Öffentlichkeit erregte (Meenen 2008).

Kennzeichnend für das TE ist der interdisziplinäre Ansatz, bei dem Ingenieurs- und Naturwissenschaften eng zusammenarbeiten (Meenen 2008; Howard, Buttery, et al. 2008; Meurer, Brochhausen, et al. 2009; Tapp, Hanley, et al. 2009). Ziel des TE ist die Regeneration oder der Ersatz von erkranktem beziehungsweise defektem Gewebe durch künstlich erzeugtes Gewebe (Meenen 2008; Häupl, Ringe, et al. 2003) mit der Ermöglichung einer kompletten Defektheilung (Ehnert, J, et al. 2011). Hierfür gibt es zwei unterschiedliche Ansätze: Beim „In-Situ-Tissue-Engineering“ wird die Regeneration kaputten Gewebes lokal im Patienten stimuliert, wohingegen beim „In Vitro-Tissue-Engineering“ Zellen *in vitro* vermehrt und in Trägersubstanzen ausgesät werden, wo sie dann differenzieren und das natürliche Gewebe nachbilden. Als fertiges Konstrukt erfolgt die Implantation in den Defekt (Hench and Thompson 2010; Howard, Buttery, et al. 2008; Barrilleaux, Phinney, et al. 2006). Die dabei zu beachtenden Faktoren ähneln denen des Diamond Concepts in der Therapie von Frakturen und umfassen Wachstumsfaktoren, Zellen, Trägermaterialien und mechanische Faktoren (Giannoudis, Einhorn, et al. 2007).

Wachstumsfaktoren dienen hierbei der Verbesserung der Differenzierung (Häupl, Ringe, et al. 2003), Migration, Proliferation und Morphogenese von Zellen. Beispiele für verwendete Wachstumsfaktoren sind IGF, VEGF, Mitglieder der Familie der

Transformierenden Wachstumsfaktoren wie BMPs (Liedert 2011), oder auch FGF (Brochhausen, Lehmann, *et al.* 2009).

MSC werden in der Regel zur Bioaktivierung der Trägermaterialien verwendet (Ehnert, J, *et al.* 2011). Es kommen sowohl xenogene, allogene als auch autologe Zellen in Betracht (Tapp, Hanley, *et al.* 2009). Problematisch ist vor allem die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff in festem Gewebe (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009). Hierfür wäre eine funktionierende Vaskularisation essenziell. Diese ist jedoch noch nicht befriedigend gelöst (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009; Liedert 2011).

Die Versorgung der Zellen bedingt auch einige der Ansprüche an die als Matrixersatz verwendeten Materialien. So sollten sie eine ausreichende Porosität mit guter Porengröße und hoher Interkonnektivität aufweisen, um die Versorgung der Zellen und deren Aktivität zu gewährleisten (Li, Rodrigues, *et al.* 2012). Darüber hinaus sollten sie biokompatibel und mit einer kontrollierten Rate abbaubar sein, um das Einwachsen von Zellen, Gewebe und Blutgefäßen zu ermöglichen (Woodruff, Lange, *et al.* 2012). Wichtig ist hierbei, dass weder das Material selbst, noch seine Zerfallsprodukte toxisch sind (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009). Naheliegende Materialien sind somit natürliche Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) oder dezellularisierte EZM, wie beispielsweise Kollagen, Hyaluronsäure oder Fibrin. Ihr Nachteil ist die Gefahr der Auslösung von Immunreaktionen sowie das Risiko der Krankheitsübertragung. Andere natürliche Materialien sind beispielsweise Alginat, auf welches später noch detailliert eingegangen wird, sowie Chitosan oder auch textile Fasern wie Spinnenseide. Zusätzlich finden synthetische Polymere wie Poly-L-Milchsäure und Andere Verwendung. Sie können so designt werden, dass sie exakt die benötigten Eigenschaften für eine spezifische Applikation aufweisen. Durch einfache chemische Modifizierungen können die Materialien funktionalisiert werden. Hierbei können einzelne Bausteine oder ganze EZM-Moleküle, Peptide oder Glycanfragmente sowie Wachstumsfaktoren zum Einsatz kommen. Häufig erfolgt ein Einfügen von Zell-Adhäsions-Domänen wie zum Beispiel dem Peptidfragment RGD, bestehend aus Arginin-Glycin-Aspartat (Chan and Mooney 2008). Diese Funktionalisierung bedingt eine Verbesserung der Zelladhäsion, Migration, Differenzierung und des Zellwachstums (Li, Rodrigues, *et al.* 2012).

Die mechanischen Eigenschaften des Materials beeinflussen wiederum viele Bereiche der Zellfunktion wie Viabilität, Migration, Proliferation und Differenzierung (Liedert 2011; Li, Rodrigues, *et al.* 2012). Ein Möglicher Ansatz zur Darbietung mechanischer Reize, der

gleichzeitig die Versorgung der Zellen verbessert, ist die Arbeit mit Bioreaktoren (Meenen 2008; Liedert 2011). Hierfür stehen verschiedene Formen an Reaktoren zur Verfügung (Liedert 2011; Anton, Suck, *et al.* 2008).

In den letzten Jahren erfolgte ein Bedeutungszuwachs für das Einkapseln von Zellen in Mikrokapseln. Es kann einen lokalisierten Verbleib der Zellen, eine kontrollierte Freisetzung von Agentien in den Empfänger sowie eine Verlängerung der Aufrechterhaltung von Funktion und Viabilität der Zellen gewährleisten. Um all dies zu ermöglichen, müssen verschiedene Voraussetzungen wie etwa Biokompatibilität oder biologische Abbaubarkeit erfüllt sein. Neben diversen anderen Materialien wurde, aufgrund seiner günstigen Eigenschaften, in diesem Kontext auch bisher bereits häufig Alginate verwendet (Abbah, Lu, *et al.* 2008).

1.3.1 TE bei Knochen

Die Limitation derzeitig verfügbarer Therapieoptionen ist der Grund für die große Bedeutung des TE bei Knochengewebe (Ali and Saleh 2002). TE ist hierbei derzeit die erfolgversprechendste Option, um biologische Knochenersatzstoffe zu erzeugen (Moshaverinia, Chen, *et al.* 2012) und bietet neue therapeutische Strategien zur Verbesserung muskuloskelettaler Heilung (Grellier, Granja, *et al.* 2009). Eine Vorreiterrolle beim Knochen-TE spielte ebenfalls Vacanti, der mit seiner Arbeitsgruppe durch die Rekonstruktion des Endgliedes eines amputierten Daumens die erste klinische Anwendung lieferte, auch wenn Aufwand und schlechtes funktionelles klinisches Ergebnis in keinem Verhältnis zueinander standen (Isogai, Landis, *et al.* 1999; Hentz and Chang 2001; Schieker, Seitz, *et al.* 2004). TE bei Knochen erfolgt analog zur im vorausgegangenen Abschnitt beschriebenen allgemeinen Herangehensweise beim TE. Es verwendet viele bereits aus der Therapie von Knochendefekten bekannte Materialien, Ansätze und Methoden und versucht dabei neues, von Zellen gebildetes, funktionelles Gewebe zu erzeugen (Dimitriou, Jones, *et al.* 2011), wohingegen bisherige Biomaterialien beispielsweise nicht die im Knochen so wichtige Fähigkeit zur Anpassung an veränderte physiologische oder biochemische Stimuli hatten (Hench and Thompson 2010).

Einer der grundlegenden Ansätze ist dabei die Unterstützung des körpereigenen Regenerationspotentials (Drosse, Volkmer, *et al.* 2008), wobei ein polytherapeutischer Ansatz verfolgt wird, der die simultane Einbringung aller drei grundlegenden Komponenten der Knochenheilung - MSC, Wachstumsfaktoren und ein Scaffold – umfasst

(Calori, Mazza, *et al.* 2011). Die Verwendung dieser drei Komponenten der Knochenheilung zusammen wird im Rahmen des TE als Trianguläres-Konzept bezeichnet. Dieses wird von einigen Autoren - analog zum Diamond-Konzept der Frakturheilung (Vergleiche 1.2.6 Therapieoptionen problematischer Knochendefekte und deren Limitationen) - um die mechanische Stimulation ergänzt, sodass sich beim Knochen-TE alle Bestandteile des Diamond-Konzept wiederfinden (Schmidt-Rohlfing, Tzioupis, *et al.* 2009). Die Gewebeherstellung kann dabei sowohl biomechanisch als auch biologisch gesteuert werden (Wirth, Refior, *et al.* 2000). Die Gewebematrix stellt beim TE ein strukturelles und als Leitschiene dienendes 3D-Gerüst, welches im angloamerikanischen Raum als Scaffold bezeichnet wird. Dieses kann ohne vorherige Besiedelung mit Zellen implantiert werden, welches dem Prinzip der In-Situ-Regeneration entspricht oder *in vitro* zunächst mit ausgewählten Zellen vitalisiert und erst dann implantiert werden. Die verwendeten Materialien sollten dabei der natürlichen Knochenmatrix sowohl morphologisch als auch mechanisch weitgehend ähneln, (Schmidt-Rohlfing, Tzioupis, *et al.* 2009) da sie durch die Bildung des Umfeldes der Zellen und durch deren Beeinflussung entscheidenden Einfluss auf den Erfolg haben (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008). Damit ein Scaffold für das Knochen-TE geeignet ist, muss es einige wichtige und grundlegende Eigenschaften erfüllen:

- Biokompatibilität und Integration in das Empfängergewebe
- mechanische Stabilität
- Osteokonduktivität und gute Porosität
- Osteoinduktivität, beziehungsweise Möglichkeit der Einbringung osteoinduktiver Faktoren
- Osteogenität
- Abbauraten die auf die Ersatzraten durch Knochengewebe abgestimmt sind
- möglichst einfache Handhabbarkeit und Anwendbarkeit (Sterilisierbarkeit)
- geringe Kosten (Jones, Ehrenfried, *et al.* 2006; Bernstein, Bornhäuser, *et al.* 2009; Qi, Ye, *et al.* 2009)

Die Porengröße hat dabei Einfluss sowohl auf die Versorgung der Zellen und das Einwachsen von Zellen und Gefäßen als auch auf den Abbau des Scaffolds (Schmidt-Rohlfing, Tzioupis, *et al.* 2009). Die optimale Porengröße ist dabei strittig und liegt bei

Werten zwischen kleiner 100 µm bis zu 400 µm (Schroeder and Mosheiff 2011; Pineda, Busing, *et al.* 1996; Burg, Porter, *et al.* 2000). Damit entspricht die optimale Porengröße dem Durchmesser eines Osteons im Knochen. Die für die Versorgung des Knochens zuständigen Havers-Kanäle sind mit 30-40 µm deutlich kleiner (Sobotta and Welsch 2006). Durch den Einfluss der Porengröße auf die Stabilität besteht jedoch beim Knochen-TE immer ein Kompromiss aus Stabilität und biologischer Aktivität (Kneser, Schaefer, *et al.* 2002).

Die Kultivierung in Bioreaktoren ermöglicht einerseits eine Darbietung mechanischer Stimuli (Stevens, Marini, *et al.* 2005), andererseits zudem eine Verbesserung der Nutrition der Zellen (Bancroft, Sikavitsas, *et al.* 2003; Kitagawa, Yamaoka, *et al.* 2006; Hwang, Cho, *et al.* 2009). Zur Vitalisierung der Scaffolds wird die Verwendung autologer gegenüber allogener SC favorisiert, da so Probleme wie Immunreaktionen oder Krankheitsübertragung vermieden werden (Ehnert, J, *et al.* 2011). Die Differenzierung von SC zu osteogenen Zellen kann dabei durch die oben erwähnten Bestandteile des Diamond Konzept erreicht werden (Barrilleaux, Phinney, *et al.* 2006).

Das Potential von unterschiedlichen Stammzellarten wird hierbei in Studien mit primären Osteoblasten desselben Spenders verglichen (Ehnert, J, *et al.* 2011). Zur Bewertung der Effektivität von TE-Ansätzen wird der Goldstandard, autologe Spongiosa aus dem Beckenkamm, herangezogen (Bernstein, Bornhäuser, *et al.* 2009). Es kommen Materialien aus den Übergruppen Polymere, Keramiken und Verbundstoffe zum Einsatz (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008). Beispiele hierfür sind synthetische Materialien wie „polylactic acid“, „polyglycolic acid“, „polylactiglycolic acid“ und vernetztes „polyethylene glycol“ sowie auch natürliche Materialien beziehungsweise Kollagen, Hyaluronsäure, HA, Calciumcarbonat (Unger, Halstenberg, *et al.* 2009), Alginat (Weir and Xu 2010) und deren Verbundstoffe (Unger, Halstenberg, *et al.* 2009; Reichert, Epari, *et al.* 2012).

Vielversprechend sind vor allem Hydrogele, welche aus querverbundenen hydrophilen Polymeren bestehen und sich in ihren mechanischen Eigenschaften variieren lassen (Olderoy, Xie, *et al.* 2012). Beim Knochen-TE sind diese mechanischen Eigenschaften ein wesentlicher Faktor. Wie oben erwähnt ist im Knochen die Stabilität des HA mit der Elastizität des Kollagens kombiniert. Hierfür gibt es mehrere biomimetische Ansätze wie die Kalzium-Phosphat-Mineralisation von Alginat, Polyester, Kollagen und anderen Stoffen (Wu, Xie, *et al.* 2010). Das Potential der Materialien wird in Zellkulturstudien mit z.B. Osteoblasten (Unger, Halstenberg, *et al.* 2009) und Tierversuchen evaluiert (Drosse,

Volkmer, *et al.* 2008; Reichert, Epari, *et al.* 2012). Es wird außerdem zwischen minimalinvasiv injizierbaren Scaffolds und Scaffolds, die *in vitro* vorgeformt und dann implantiert werden, unterschieden (Zhao, Weir, *et al.* 2010).

Das Scaffold kann zudem Wachstumsfaktoren (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011) - wie sie auch schon aus der Therapie von Knochendefekten bekannt sind - enthalten. Diese können entweder in SC transduziert (Bianco, Riminucci, *et al.* 2001) oder kontrolliert in das Scaffold-Material zugegeben werden (Drosse, Volkmer, *et al.* 2008; Muller, Hildebrandt, *et al.* 2017) Verwendet werden hierbei BMPs, TGF- β , Wnt-Proteine und eine Vielzahl verschiedener weiterer lokaler Wachstumsfaktoren (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011).

Ein noch ungelöstes Problem ist die Vaskularisierung der Konstrukte. Es werden hierfür verschiedene Lösungsstrategien verfolgt. Diese umfassen *in vivo* sowie *in vitro* Prävascularisation sowie Anregung der Vaskularisation durch angiogene Wachstumsfaktoren (Frohlich, Grayson, *et al.* 2008; Drosse, Volkmer, *et al.* 2008). Dies ist von besonders großer Bedeutung bei der Erzeugung größerer dreidimensionaler Konstrukte, da die Versorgung von Zellen nur über sehr kurze Strecken durch Diffusion erfolgen kann (Drosse, Volkmer, *et al.* 2008).

1.4 STAMMZELLEN

1.4.1 Allgemeiner Hintergrund

SC bilden im menschlichen Körper ein Reservoir für die Bildung neuer Zellen (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009). Zu den Charakteristika von SC gehören dabei laut der International Society for Stem Cell Research sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, indem sie Kopien von sich selbst erstellen können sowie die Fähigkeit in verschiedene Zelllinien zu differenzieren als auch terminal differenzierte Zellen und somit die Organe des menschlichen Körpers bilden zu können (Blackburn, Clegg, *et al.* 2020). Sie kommen sowohl im Embryo, Fötus, als auch im adulten Menschen vor (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003). Dementsprechend gibt es embryonale (ESC) und adulte (somatische) SC (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009). Man unterscheidet bei SC zwischen Toti-, Pluri-, und Multipotenz (Abbildung 10).

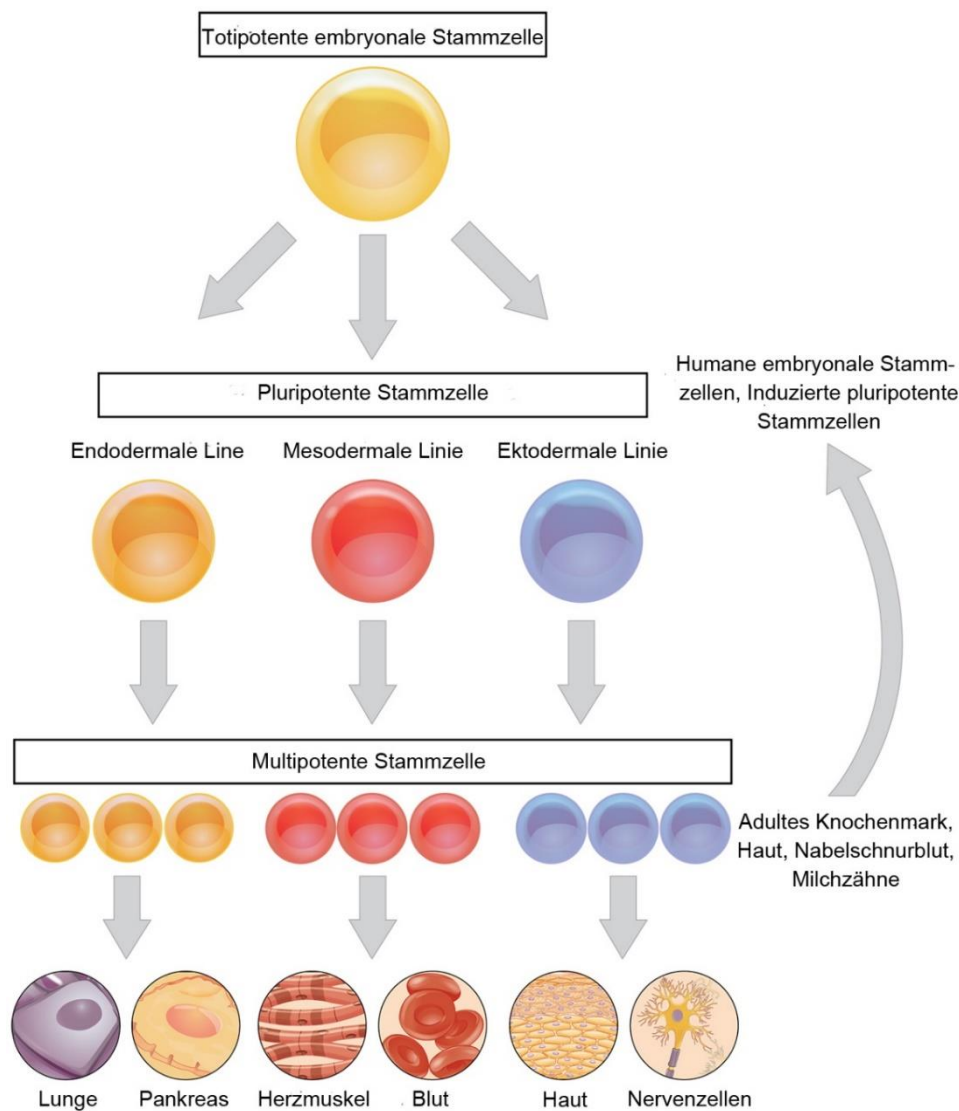


Abbildung 10: Differenzierungspotential von SC, modifiziert nach Betts *et al.* (Gordon J. Betts 2013)

Totipotente Zellen können einen kompletten neuen Organismus bilden, inklusive dem Trophoblasten. Ein Beispiel für Totipotenz bei Zellen ist die Zygote. Pluripotente Zellen können alle Zellen des Embryos bilden. Pluripotenz liegt beispielsweise bei ESC vor. Sie können Zellen aller drei Keimblätter, Ektoderm, Endoderm und Mesoderm sowie der Keimbahn bilden. Multipotente Zellen sind eingeschränkter und können unterschiedliche Zellen ihrer Keimblattschicht bilden (Hwang, Cho, *et al.* 2009; Speckmann, Hescheler, *et al.* 2009). Historisch wurden hierzu adulte SC gezählt. Neuere Studien konnten jedoch für KM-SC und hämatopoetischen SC einen als Transdifferenzierung beziehungsweise Plastizität bezeichneten Effekt zeigen, der pluripotentem Verhalten von ESC ähnelt (Bianco, Riminucci, *et al.* 2001; Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009; Tögel, Lange, *et al.* 2007).

Um für die regenerative Medizin verwendbar zu sein, müssen SC bestimmte Eigenschaften erfüllen. Hierzu zählen:

- Vorkommen in ausreichend großer Menge
- einfache, möglichst minimalinvasive Gewinnung
- reproduzierbare Differenzierung entlang unterschiedlicher Zelllinien
- sichere und effektive Transplantierbarkeit in autologe und/oder allogene Empfänger (Gimble, Katz, *et al.* 2007; Bunnell, Flaat, *et al.* 2008)

Zu beachten ist, dass ein bei Arbeiten zu Adulten SC häufig verwendetes Akronym, nämlich MSC, je nach Arbeit eine unterschiedliche Bedeutung hat. Es kann sowohl für „Mesenchymal Stem Cell“ als auch „Multipotent Mesenchymal Stromal (Bindegewebs) Cell“ stehen. Hierbei sind MSC eine Subpopulation der Mesenchymalen Bindegewebszellen. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein der klassischen Stammzeleigenschaften wie Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung zu Zellen multipler Gewebsarten aus. Multipotente Mesenchymale Stromazellen sind hingegen eine sehr heterogene Gruppe, mittels Plastikadhärenz und Zellkulturverfahren aus mesenchyalem Gewebe isolierter Zellen, die ein stark unterschiedlich ausgeprägtes Differenzierungsverhalten aufweisen. Typisch für sie ist jedoch ebenfalls sowohl die Multipotenz als auch die Fähigkeit zur Gewebsregeneration (Horwitz, Le Blanc, *et al.* 2005; Dominici, Le Blanc, *et al.* 2006).

1.4.2 Embryonale Stammzellen

Lediglich die Zellen, die direkt nach der Befruchtung während der ersten wenigen Teilungen, aus einer Eizelle entstehen sind totipotent, sprich können alleine einen lebensfähigen Organismus bilden (Blackburn, Clegg, *et al.* 2020).

ESC werden aus Embryonen vor der Implantation gewonnen (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003), sind pluripotent und können über einen langen Zeitraum hinweg, theoretisch sogar unbegrenzt lange, kultiviert werden. Dies ermöglicht zumindest theoretisch die Erzeugung großer Zellmengen, sowohl des Endo-, Meso-, als auch Ektoderms. Neben diesen Vorteilen hat das jedoch den Nachteil, dass die Differenzierung kontrolliert in eine Richtung gelenkt werden muss (Howard, Buttery, *et al.* 2008). Das aus der Pluripotenz resultierende teratogene Potential ist gemeinsam mit der Auslösung von Immunreaktionen und ethisch-moralischen Bedenken bei der Verwendung von durch *in vitro* Fertilisation allein für Forschungszwecke erzeugten humanen Embryonen ein Grund für die stark limitierte Verwendbarkeit von ESCs (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009).

1.4.3 Adulte Stammzellen

Zu den adulten SC zählen neben den in dieser Arbeit verwendeten und deshalb im Folgenden exemplarisch besprochenen MSC auch ektodermale und endodermale SC. Alle drei Typen können im Rahmen des TE Verwendung finden (Barrilleaux, Phinney, *et al.* 2006). MSC wurden erstmals bereits 1867 durch den deutschen Pathologen Cohnheim beschrieben, wobei die Namensgebung als Stroma- beziehungsweise mesenchymale Stammzelle erst über ein Jahrhundert später durch Owen und Caplan erfolgte (Chamberlain, Fox, *et al.* 2007). Sie kommen in vielen mesenchymalen Geweben wie Muskel, Fett, Knochen oder auch Nabelschnur-Blut vor (hier dienen sie der Zellerneuerung und Regeneration (Ehnert, J, *et al.* 2011; Tögel, Lange, *et al.* 2007) und können aus diesen isoliert werden. Klassisch ist die Isolation aus dem Knochen (Jorgensen, Gordeladze, *et al.* 2004). Hierbei wird die Plastik-Adhärenz der Zellen ausgenutzt, ein Verfahren, das bereits in den 1960er Jahren von Friedenstein entwickelt wurde (Friedenstein, Chailakhjan, *et al.* 1970; Xia and Bishop 2011). Die dabei isolierten Zellgruppen sind relativ inhomogen in ihrer Erscheinung, werden aber im Rahmen der Kultur und Passagierung homogener. Sie können zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten differenzieren (Chamberlain, Fox, *et al.* 2007). Als negativ ist anzusehen, dass es MSC an einheitlichen

und spezifischen Oberflächenmarkern fehlt, weshalb von der International Society for Cellular Therapy Minimal-Kriterien für die Zuordnung zu MSC festgesetzt wurden. Hierzu zählen: Plastik-Adhärenz, Differenzierung zu Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten sowie die Expression einiger bestimmter Oberflächenmoleküle (Tabelle 2) (Janicki and Schmidmaier 2011; Geiger 2012).

Tabelle 2: Kriterien für die Zuordnung zur Familie der Mesenchymalen Bindegewebszellen. Modifiziert nach (Dominici, Le Blanc, et al. 2006)

1	Plastik-Adhärenz unter Standard-Kulturbedingungen		
2	Phänotyp	Positiv ($\geq 95\%$ +)	Negativ ($\leq 2\%$ +)
		CD105	CD45
		CD73	CD34
		CD90	CD14 oder CD11b
			CD79 α oder CD19
		HLA-DR	
3	<i>In vitro</i> Differenzierung: Osteoblasten, Adipozyten, Chondroblasten (Nachweis mittels Färbung in der <i>in vitro</i> Zellkultur)		

Historisch werden MSC als multipotent klassifiziert. In den letzten Jahren konnten für sie jedoch einer eingeschränkten Pluripotenz entsprechende Eigenschaften gezeigt werden, ein Effekt der als Plastizität bezeichnet wird (Ehnert, Glanemann, et al. 2009; Tögel, Lange, et al. 2007; Bunnell, Flaate, et al. 2008). Zwischenzeitlich ist es bereits gelungen diesen Effekt künstlich nachzuvollziehen und dadurch als induzierte pluripotente SC bezeichnete Zellen zu erzeugen. Hierbei sind jedoch noch viele Fragen offen, nicht zuletzt zu ihrer Verwendbarkeit (Ehnert, Glanemann, et al. 2009).

Um ihrem Vorkommen in unterschiedlichen Geweben, der Heterogenität der durch Plastikadhärenz gewonnenen Zellen sowie den unterschiedlichen Differenzierungsverhalten und biologischen Eigenschaften Rechnung zu tragen, wurde von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie festgesetzt, dass die rein durch Plastikadhärenz isolierten Zellen, ohne Rücksicht auf ihr Ursprungsgewebe als multipotente mesenchymale Stromazellen bezeichnet werden sollen. Die Bezeichnung MSC wird hingegen nur für eine Subpopulation verwendet, die auch klar definierte Stammzellkriterien erfüllt (Xia and Bishop 2011; Geiger 2012). Der Einfachheit halber wird im Rahmen dieser Arbeit diese Unterscheidung nicht getroffen und kurz von MSC gesprochen.

Verwendet werden MSC in Klinik und Forschung vor allem im Hinblick auf ihre ursprüngliche Aufgabe im Körper: die Regeneration kaputten Gewebes, hauptsächlich im

Kontext von TE, Gentherapie oder auch mittels direkter Applikation in akut geschädigtes Gewebe (Chamberlain, Fox, *et al.* 2007; Xia and Bishop 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung von MSC von besonderem Interesse (Calori, Mazza, *et al.* 2011; Ratanavaraporn, Kanokpanont, *et al.* 2009), die klassischerweise *in vitro* mittels Inkubation in Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Dexamethason für zwei bis drei Wochen erreicht werden kann. Positiv sind auch die hohen erzielbaren Teilungsraten der MSC (Drosse, Volkmer, *et al.* 2008; Chamberlain, Fox, *et al.* 2007). Ein Vorteil adulter SC gegenüber ESC ist die Verwendbarkeit autologer Zellen mit allen Vorteilen autologer Transplantationen (Ehnert, Glanemann, *et al.* 2009). Nachteilig ist die Variabilität der Stammzellzahl in Abhängigkeit von Alter (Mauney, Kaplan, *et al.* 2004), Geschlecht sowie Umweltfaktoren (Schroeder and Mosheiff 2011) und die dadurch gegebenenfalls bedingte Notwendigkeit der ex vivo Vermehrung der SC. Diese geht wiederum mit einer Gefahr der genetischen Veränderung und somit Entartung der Zellen einher (Ehnert, J, *et al.* 2011), verursacht nicht unerhebliche Kosten und benötigt aufgrund des Zeitbedarfes ein zweizeitiges Vorgehen - einmal für Entnahme und ein weiteres Mal für die Implantation der Zellen (Lucarelli, Donati, *et al.* 2004). Eine Herausforderung ist zudem die Anregung einer gezielten Differenzierung (Hench and Thompson 2010; Li, Rodrigues, *et al.* 2012) bei gleichzeitiger Vermeidung karzinogenen Potentials (Hench and Thompson 2010).

1.4.4 Mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BMSC)

Die in den vorausgegangenen Abschnitten für SC und insbesondere adulte SC beschriebenen Sachverhalte treffen so auch bei BMSC zu (Zhao, Weir, *et al.* 2010; Kagami, Agata, *et al.* 2011). Sie können zu Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Myoblasten, Kardiomyozyten, Hepatozyten, Astrozyten, endothelialen Zellen (EC) und weiteren Zellarten differenzieren (Weir and Xu 2010). BMSC wurden für viele Jahre als die wichtigste Stammzellart für das TE gehalten (Tapp, Hanley, *et al.* 2009), besonders ihre Verwendung im Bereich des Knochen-TE befindet sich aufgrund einfacher Erreichbarkeit sowie vielversprechendem Potential bereits in Übergangsstadien zur klinischen Anwendung (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Aufgrund guter Transfizierbarkeit mit verschiedenen viralen Vektoren sind BMSC darüber hinaus auch für die Gentherapie von Interesse (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003; Balmayor and van Griensven 2015). Es wird davon ausgegangen, dass die BMSC im KM im perivaskulären Bereich der Sinusoide vorkommen (Dawson,

Kanczler, *et al.* 2011). Sie sind für die Aufrechterhaltung des Knochenumsatzes während des gesamten Lebens verantwortlich (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003). Trotz vermehrter Anstrengungen, in den letzten Jahren die genetischen Grundlagen der Multipotenz skeletaler MSC zu klären, sind diese noch nicht bekannt (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Die Differenzierung von BMSC zu osteogenen Zellen kann jedoch über den Nachweis von Osteokalzin in der Matrix, positive Alizarin-Rot-Färbung (ARS)- und von-Kossa-Färbung sowie dem Nachweis Alkalischer Phosphatase (AP)-Aktivität erfolgen (Srouji and Livne 2005). Typische Kulturmedien, welche die osteogene Differenzierung anregen, beinhalten fötales Kalb-Serum (FCS), Dexamethason, Ascorbinsäure-2-phosphat sowie anorganisches Phosphat (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011). Trotz einer Vielzahl an Studien zu BMSC im Bereich des Knochen-TE gibt es bis jetzt keine von einem breiten Konsens akzeptierten Kultur- beziehungsweise Induktions-Protokolle. Bei der *in vitro*-Kultur von BMSC ist zu beachten, dass es zu einem fortschreitenden Verlust der Proliferationskapazität sowie der Multipotenz kommt (Kagami, Agata, *et al.* 2011): Zunächst geht das adipogene und nach einer Gesamtzahl von 4 Passagen beziehungsweise 22 Populationsverdopplungen auch das chondrogene Potential verloren. Ab Passage 6 kann es darüber hinaus zu einem Verlust des osteogenen Potentials kommen. Als Ursache dafür wird eine abnehmende oder ganz zum Erliegen gekommene Telomeraseaktivität gesehen (Dawson, Kanczler, *et al.* 2011; Mauney, Kaplan, *et al.* 2004). Agata *et al.* konnten zeigen, dass die Gabe von Basic Fibroblast Growth Factor positive Effekte auf den Erhalt des osteogenen Potentials hat (Kagami, Agata, *et al.* 2011), wobei laut Cancedda *et al.* dieser Effekt über eine erhöhte Telomerlänge erklärbar ist (Pagano, Crooijmans, *et al.* 2003). Mauney *et al.* fanden ebenfalls positive Effekte für den Erhalt des Differenzierungspotentials, wenn die Kultivierung auf denaturierter Kollagenmatrix erfolgte. Als Grund hierfür wird das Vorhandensein von RGD-Peptiden vermutet (Mauney, Kaplan, *et al.* 2004). Unter optimierten Bedingungen können somit über 25 Passagen *in vitro* erzielt werden (Bianco, Riminucci, *et al.* 2001). Als Nachteil ist die geringe Anzahl an BMSC im KM zu sehen. Nach Schätzungen enthält ein ml KM ca. 32 Millionen kernhaltige Zellen. Dabei ist nur eine von 18.000 kernhaltigen Zellen eine BMSC. Da mittels KM-Aspiration daher nur sehr begrenzte Mengen an KM gewonnen werden können, sind auf diese Weise lediglich einige Tausend BMSC verfügbar (Lucarelli, Donati, *et al.* 2004); was eine Expansion der Zellen notwendig macht (Drosse, Volkmer, *et al.* 2008; Lucarelli, Donati, *et al.* 2004). Ein weiterer negativer Aspekt ist zudem die große Heterogenität der Zellen, sowohl was die jeweilige Aktivität von Enzymen wie AP als auch die Form der Zellkolonien etc. betrifft (Bianco, Riminucci, *et al.* 2001).

1.4.5 Mesenchymale Fettgewebstammzellen (AdMSC)

AdMSC sind eine mögliche Alternative zu BMSC (Zou, Wang, *et al.* 2011) und zeigen wie diese die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien, wie Osteoblasten, Myozyten, neuronale Zellen und andere (Abbildung 11) (Huang, Fu, *et al.* 2012).

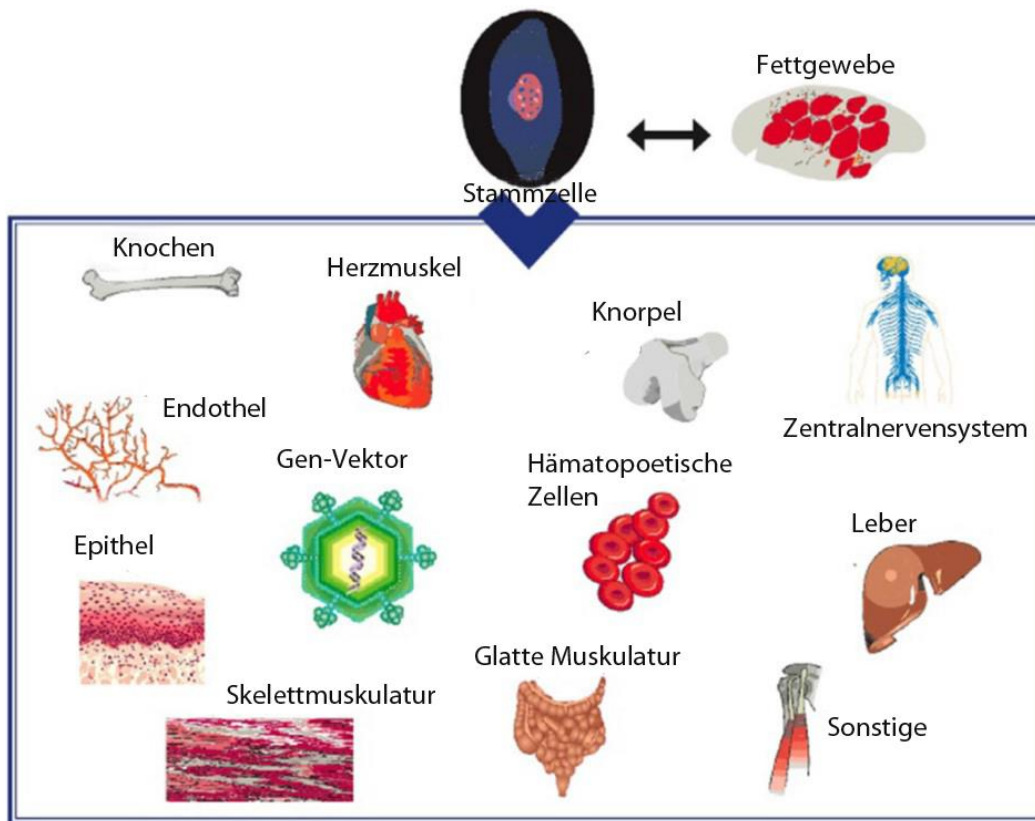


Abbildung 11: Differenzierungs- und Verwendungspotential von AdMSC modifiziert nach Bunnell, Flat *et al.* (Bunnell, Flaar, *et al.* 2008)

Auch bei ihnen herrscht Uneinigkeit über ihre Benennung. Die „International Fat Applied Technology Society“ hat beschlossen, durch Plastikadhärenz gewonnene, multipotente Zellen aus Fettgewebe als Adipose-derived stem cells zu bezeichnen (Gimble, Katz, *et al.* 2007). In dieser Arbeit wird jedoch die Bezeichnung Adipose Mesenchymal Stem cell (AdMSC) in Analogie zu den BMSC verwendet. Ihre Isolation und zytologische Charakterisierung erfolgte bereits anfangs der 1970er Jahre, später wurde ihr osteogenes Potential analysiert und 2001 beziehungsweise 2002 ihr multipotenter Charakter nachgewiesen, der auch in der *in vitro*-Kultur über viele Passagen erhalten bleibt (Geiger 2012). Bei *in vitro*-Kultur für einen Zeitraum von mehr als vier Monaten besteht jedoch die Gefahr der malignen Transformation (Gimble, Katz, *et al.* 2007).

AdMSC unterscheiden sich in einigen Punkten von BMSC. AdMSC können aus im Rahmen von Operationen in der plastischen Chirurgie anfallendem Fettgewebe in großen Mengen

gewonnen werden (Ratanavaraporn, Kanokpanont, *et al.* 2009). Dabei beträgt der Anteil an MSC an der Gesamtzellzahl im Fettgewebe bis zu 1 % (Tremolada, Colombo, *et al.* 2016); andere Quellen gehen sogar von 3 % aus (Geiger 2012). Dieser Wert wäre ca. um den Faktor 500 höher als der der BMSC im KM. Ihre Anzahl nimmt anders als bei BMSC nach derzeitigem Kenntnisstand auch nicht mit dem Alter ab (Zou, Wang, *et al.* 2011). Bei steigenden Zahlen für Fettleibigkeit (Abbildung 12), steigenden Zahlen für Fettabsaugungen und pro Fettabsaugung gewonnenen Mengen an Fettgewebe im Bereich von 100 Milliliter bis mehr als drei Liter scheinen AdMSC in großer Menge zur Verfügung zu stehen (Bunnell, Flaar, *et al.* 2008; Zou, Wang, *et al.* 2011).

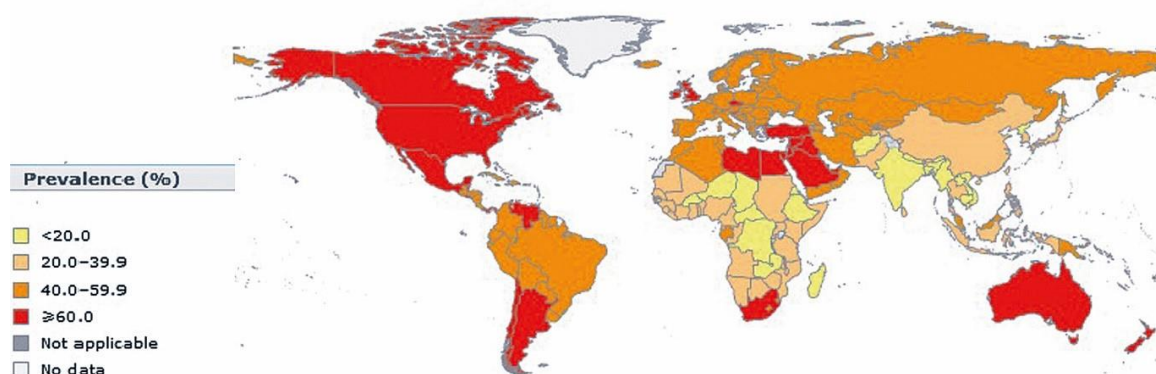


Abbildung 12: weltweite prozentuale Prävalenz von Übergewicht (BMI > 25) bei über 20 jährigen beider Geschlechter (World-Health-Organization 2008)

In Abhängigkeit von der gewonnenen Fettmenge kann die Zahl an zur Verfügung stehenden AdMSC so groß sein, dass eine *in vitro*-Expansion überflüssig wird (Ratanavaraporn, Kanokpanont, *et al.* 2009). In *in vitro*-Kultur zeigen AdMSC bei ähnlichem Differenzierungspotential wie BMSC eine höhere Proliferationsrate als BMSC (Im, Shin, *et al.* 2005), mit Verdopplungsraten von zwei bis vier Tagen (Gimble, Katz, *et al.* 2007). AdMSC können also günstiger und weniger invasiv als BMSC gewonnen werden. Jedoch scheinen BMSC besser in osteogene beziehungsweise chondrogene Richtung zu differenzieren, wohingegen AdMSC zu einer adipozytären Differenzierung tendieren (Ratanavaraporn, Kanokpanont, *et al.* 2009). Jedoch konnten auch für AdMSC die Fähigkeit zur Mineralisation der EZM, erhöhte Osteokalzin-Werte und gesteigerte AP-Aktivität nach osteogener Stimulation gezeigt werden (Zou, Wang, *et al.* 2011; Im, Shin, *et al.* 2005). Die Stimulation zur osteogenen Differenzierung erfolgt analog zu den BMSC (Bunnell, Flaar, *et al.* 2008) und dauert in etwa drei bis vier Wochen (Tapp, Hanley, *et al.* 2009). Die AdMSC sind dabei langsamer als BMSC, so ist bei ihnen die Bildung mineralisierter Matrix um etwa sieben Tage verzögert und sie brauchen auch länger um dieselbe Menge

an AP wie BMSC zu bilden. Die AdMSC können diesen Rückstand aber mit der Zeit wieder ausgleichen (Ehnert, J, *et al.* 2011). Ein Vorteil der Verwendung von AdMSC könnte auch in ihrem - verglichen zu BMSC - besseren Potential zur Bildung von Blutgefäßen liegen (Schroeder and Mosheiff 2011). Die Selektion der AdMSC kann ebenfalls über Plastikadhärenz erfolgen und schließt sich an eine Verdauung des Fettgewebes mittels Kollagenase an (Abbildung 13) (Bunnell, Flaat, *et al.* 2008).

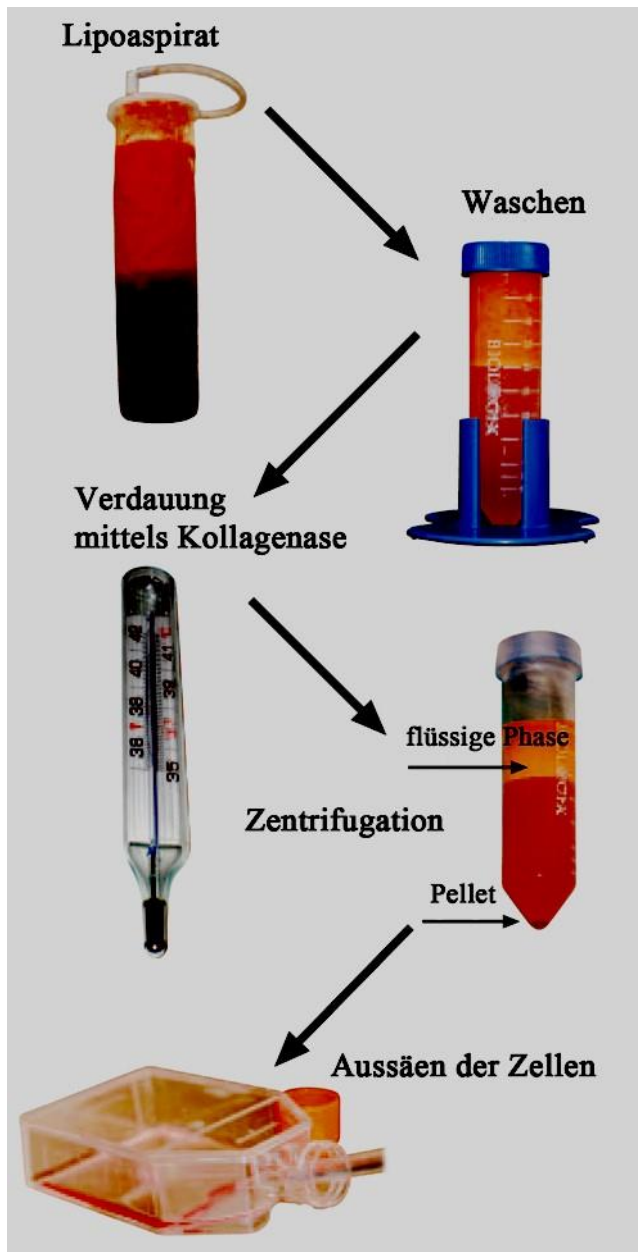


Abbildung 13: Schritte der Gewinnung von AdMSC aus Lipoaspirat (Gimble, Katz, *et al.* 2007)

AdMSC haben eine andere Expression von Adhäsionsmolekülen als BMSC. Sie zeigen beispielsweise eine geringere Expression von Vascular Cell adhesion molecule-1 und eine

verstärkte Expression von Alpha 4 Integrin. Dies lässt ein unterschiedliches Homing-Verhalten in weiter entfernten Geweben vermuten (Barrilleaux, Phinney, *et al.* 2006). Somit würden AdMSC aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit sowie den exzellenten Wachstumseigenschaften eine ideale Alternative zu BMSC darstellen. Es muss jedoch noch umfangreicher ihr osteogenes Potential, vor allem im Vergleich zu den BMSC, untersucht werden (Niemeyer, Fechner, *et al.* 2010).

1.5 ALGINAT

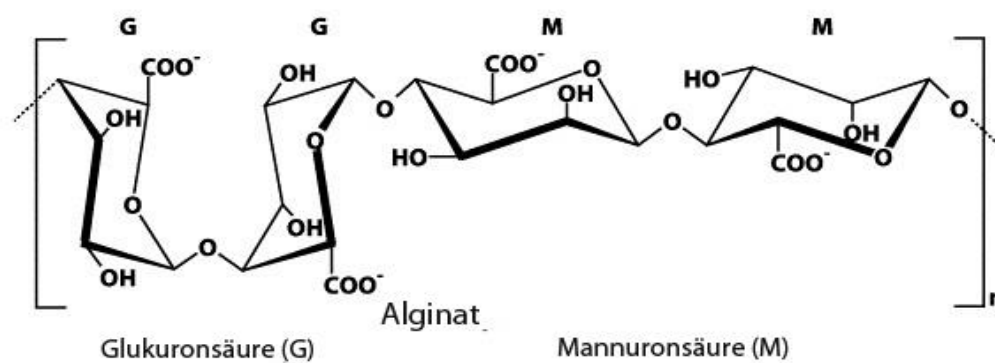


Abbildung 14: Chemischer Aufbau von Alginat (Steinbüchel 2003)

Schon seit geraumer Zeit finden Hydrogele im Rahmen der Medizin, Pharmazie und Forschung Verwendung (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999), unter anderem zur Stabilisierung beziehungsweise als Trägersubstanz für Medikamente oder zum Einkapseln von Zellen (Drury and Mooney 2003) und Wachstumsfaktoren (Rubert, Monjo, *et al.* 2012). Durch das Einkapseln von Zellen kann eine Immunprotektion für Transplantationen erzielt werden. Klinisch findet Alginat im Rahmen des Wundmanagements Anwendung (Olderoy, Xie, *et al.* 2012).

Bei Alginat handelt es sich um ein natürliches Polysaccharid aus der Alge, welches ohne das Risiko einer Kontamination mit allo- oder xenogenen Proteinen oder Viren gewonnen werden kann (Wu, Xie, *et al.* 2010). Es wird vor allem aus braunen Meeralgen (Moshaverinia, Chen, *et al.* 2012) wie *Lessonia Flavicans* oder *Desmarestia Ligulata* extrahiert (Grellier, Granja, *et al.* 2009). Alginat ist dabei biokompatibel, biologisch abbaubar und ermöglicht gut den Massentransport zur Versorgung der Zellen. Es kann als

Hydrogel direkt in die gewünschten Areale injiziert werden (Hwang, Cho, *et al.* 2009). Von Nachteil ist seine geringe mechanische Stabilität (Chan and Mooney 2008).

Strukturell setzt sich das hydrophile Alginat (Rubert, Monjo, *et al.* 2012) aus den zwei Uronsäuren α -L-Glukuronsäure (G) und β -D-Mannuronsäure (M) zusammen, welche 1,4-glykosidisch miteinander zu linearen Ketten verbunden sind (Abbildung 14) (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999). Das genaue Verhältnis in dem die beiden Uronsäuren vorkommen hängt dabei von der jeweiligen Alginatquelle (Unterart, Ursprung und Alter der jeweiligen Alge) ab (Drury and Mooney 2003). Entlang der Kette bilden sich homopolymere M- und G-Regionen aus, die als M- beziehungsweise G-Blöcke bezeichnet werden und von Abschnitten variabler Struktur, den MG-Blöcken, unterbrochen werden. Die Abfolge und das Verhältnis dieser Bausteine bedingt die physikochemischen Eigenschaften des Alginates, da die Gelation durch präferierte hoch kooperative Bindung divalenter Kationen wie beispielsweise Ca^{2+} an die G-Untereinheiten erfolgt (Wu, Xie, *et al.* 2010). Es kommt dabei zur ionischen Interaktion zwischen Kationen und den funktionellen Carboxylgruppen der G-Bausteine (Moshaverinia, Chen, *et al.* 2012). Durch Veränderung des Verhältnisses von M- zu G-Bausteinen sowie des Molekulargewichtes der Polymerketten lässt sich somit einfach die Querverbindungsichte verändern und dadurch entscheidend die mechanischen Eigenschaften oder auch die Porengröße beeinflussen. So können durch eine Erhöhung des G-zu M-Verhältnisses die mechanischen Kraft- und Druckmodulen gesteigert werden. Die Festigkeit des Gels lässt sich über eine Konzentrationserhöhung der Ionen oder Verwendung divalenter Ionen mit höherer Affinität mittels dadurch bedingter Steigerung der Querverbindungsichte erhöhen (Drury and Mooney 2003). Alternativ kann anionisches Alginat auch Komplexe mit Polykationen wie Chitosan oder Polylysin bilden – dieses bewirkt ebenfalls eine Verbesserung der Gel-Eigenschaften (Li, Rodrigues, *et al.* 2012). Die Dichte der Querverbindungen beeinflusst dabei auch die Diffusionsrate beziehungsweise die Länge der möglichen Diffusionsdistanz. Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner 1.300 Da und einem Stokes-Radius kleiner 1 nm, wie beispielsweise Glukose oder Sauerstoff, können frei diffundieren. Größere Moleküle wie Albumin, Myoglobin oder auch Fibrinogen sind in ihrer Diffusion eingeschränkt und nehmen bei erhöhter Alginatkonzentration, erhöhter Ca^{2+} -Konzentration sowie gesteigerter Gelation noch weiter in ihrer Diffusionsrate ab. Die Diffusion geladener Moleküle wird darüber hinaus zusätzlich durch Interaktion mit negativ geladenen Alginat-Seitenketten beeinflusst (Drury and Mooney 2003).

Generell erfolgt das Gelieren von Alginat unter verhältnismäßig milden und schonenden Bedingungen, wodurch sich zum Beispiel lebende Zellen gut darin einkapseln lassen. Dieses ist einer der Gründe für die Attraktivität von Alginat für das TE und die Forschung (Li, Rodrigues, *et al.* 2012). Besonders günstig für die Zellviabilität ist dabei das hoch hydratisierte, gewebeähnliche Umfeld (Grellier, Granja, *et al.* 2009), welches Alginat-Hydrogele als dreidimensionale, biologisch abbaubare Trägermatrix für SC prädestiniert (Moshaverinia, Chen, *et al.* 2012). Dieses ermöglicht in der Kombination mit der Fähigkeit zur *in situ* Gelation minimalinvasive Ansätze zur Zelltransplantation (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999) sowie innovative injizierbare Techniken im Rahmen der Regenerativen Medizin (Grellier, Granja, *et al.* 2009). Abbah *et al.* benutzten beispielsweise Alginatbeads zur Kultur und Differenzierung entlang der Osteoblastenlinie von BMSC und erzielten mit dieser 3D-Kultur bessere Ergebnisse als in einer 2D-Kultur (Abbah, Lu, *et al.* 2008).

In vitro kommt es jedoch vermutlich durch einen Auswärtsfluss von Ionen in das umgebende Medium zu einem Verlust der mechanischen Eigenschaften. Mittels bifunktionalen Quervernetzern können hier stabile kovalente Bindungen erreicht werden, die eine größere Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften bieten (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999). Alginathydrogele werden nicht spezifisch abgebaut sondern unterliegen auf diese Weise einer langsamen, unkontrollierten Auflösung, die vor allem auch vom ionischen Umfeld abhängig ist (Drury and Mooney 2003). Die Abbaurate kann jedoch durch eine teilweise Oxydation der Polymerketten verändert werden (Chan and Mooney 2008).

Bei der Arbeit mit Alginat muss bedacht werden, dass es zu keiner Interaktion zwischen Polysaccharid und menschlicher Zelle kommt. In Settings, in denen eine Zell-Adsorption benötigt wird, muss deshalb die Kultur in multizellulären Aggregaten erfolgen oder das Alginat mittels Zellanheftungsdomänen - wie etwa dem RGD-Peptid - modifiziert werden (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999).

Wesentliche Vorteile für das TE sind neben der geringen immun-modulierenden Wirkung von gereinigtem Alginat (Drury and Mooney 2003), der Sterilisierbarkeit des Alginates und seiner guten Lagerungsmöglichkeit, dass Alginat bestens charakterisiert ist und leicht chemisch modifiziert werden kann (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999).

Im Rahmen des Knochen-TE kann der Alginatlösung als Ausgangsstoff entweder Na_2CO_3 oder Na_2HPO_4 zugesetzt werden. Hierdurch erfolgt bei Kontakt mit einer CaCl_2 -Lösung in einem Schritt sowohl die Gelation als auch die Bildung von Kalziumkarbonat beziehungsweise Kalzium-Phosphat-Kristallen, sodass mineralisierte Alginatbeads entstehen. Der Mineralisationsgrad kann dabei durch Variation der Konzentrationen der beiden Ausgangsstoffe oder der Ca^{2+} -Konzentration im Gelierbad angepasst werden. Die HA-Kristalle in so gebildeten Beads ähneln in Struktur und Beschaffenheit denen im Knochen (Olderoy, Xie, *et al.* 2012). Der HA-Alginat-Verbundstoff weist dabei verbesserte mechanische Eigenschaften auf (Moshaverinia, Chen, *et al.* 2012).

1.6 FRAGESTELLUNG

Aus dem oben Beschriebenen wird ersichtlich, dass AdMSC eine wünschenswerte und hoffnungsvolle Alternative zu BMSC darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, inwieweit die Kultur von AdMSC in Alginat-Mikrobeads eine mögliche Alternative zur Verwendung von BMSC in Alginat-Mikrobeads im Rahmen des Knochen-Tissue-Engineerings darstellt und inwieweit sie sich hinsichtlich des osteogenen Potentials unterscheiden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ALLGEMEINE ANMERKUNGEN

Alle Arbeiten an und mit der Zellkultur sowie mit allen mit der Zellkultur in Berührung kommenden Substanzen und Materialien wurden unter der Reinbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Durchführung der Versuche erfolgte nach abteilungsintern etablierten standard operating procedures.

2.2 ZEITLICHER ABLAUF DER ARBEIT

Encapsulation of cells

Date of encapsulation: 15.2.11 Datum des Einkapselvorganges
 Cell type: BMSC Zellart
 Donor: 145 Spender Nummer
 Other info: $3,15 \cdot 10^6$ cells Einkapselte Zellzahl

Tag der Kultur in den Alginatebeads

Action	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Medium change		Diff																				
ARS																						
Alamar blue																						
AP activity																						
RNA isolation																						
Live/dead																						
Bright-field																						
Freeze sample																						

Durchgeführte Aktion

Abbildung 15: Dokumentationszettel der während der Kultur eingekapselter Zellen verwendet wurde und den Zeitlichen Ablauf widerspiegelt. Rot umrandet sind wichtige Informationen zur vorliegenden Zelllinie. Blau umrandet ist der jeweilige Tag der Zellkultur und Grün umrandet die durchgeführte Aktion. Ist das am jeweiligen Tag stehende Kästchen für die Aktion hell, wird die Aktion an diesem Tag vorgenommen. Vermerkt sind der Wechsel des Kulturmediums, die Alizarin-Rot-Färbung, die Alamar-Blau-Färbung, die Alkalische Phosphatase-Aktivitätsmessung, die Isolation von RNA aus den Zellen, die Live-Dead-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie, die Lichtmikroskopie mit Fotodokumentation und das Einfrieren einer Probe.

Zunächst wurden die jeweiligen Ausgangszellen anhand etablierter Protokolle aus ihrem jeweiligen Ursprungsgewebe gewonnen und so lange kultiviert und passagiert, bis zwischen 4 und 6×10^6 Zellen vorhanden waren. War die gewünschte Zellzahl erreicht, wurden die Zellen in die Alginatebeads eingekapselt. Von diesem Tag 0 an folgte die weitere Kultur und Arbeit mit den Zellen dem Dokumentationszettel für eingekapselte

Zellen (Abbildung 15) bis Tag 21. Das Kulturmedium wurde dabei an Tag 1,5,10,15 und 19 gewechselt. Sowohl die ARS als auch die Alamar-Blau (AB)-Färbung und die Messung der AP-Aktivität erfolgten, beginnend mit Tag eins, alle 5 Tage. Ribonukleinsäure (RNA) - Proben wurden an den Tagen 1,7,14, und 21 genommen. Die Live-Dead-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie und Fotodokumentation erfolgte an den Tagen 1,10 und 20. Lichtmikroskopie, ebenfalls verbunden mit Fotodokumentation, erfolgte an den Tagen 0,5,10,15 und 21. Zudem wurden die verbleibenden Beads am Tag 21 als Probe eingefroren.

2.3 ISOLATION PRIMÄRER HUMANER OSTEOBLASTEN (OSÜ/OSS)

Tabelle 3: Benötigte Materialien für die Isolation primärer humaner Osteoblasten

Material	Hersteller	
50 ml Reaktionsgefäße (Falcon Tubes)	SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea	
Sterile Luer-Zange	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland	
Sterile Handschuhe	Semperit, Wien, Österreich	
Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten, Unit 0,22 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	
Zellkulturflaschen 175 cm ²	PAA, Pasching, Österreich	
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich	
Kollagenase Typ II	Biochrome, Berlin, Deutschland	
Lösungen	Zutaten	Herstellung
Osteoblasten Wachstumsmedium	Siehe 2.4.1	Siehe 2.4.1
Kollagenase-Lösung (1 ml)	0,7 mg Kollagenase Typ II	Kollagenase wird in PBS gelöst und durch Filtration mittels Millex® GP Sterilfilter 0,22 µm sterilisiert
	1,0 ml PBS	

Als Quelle für primäre humane Osteoblasten wurden Hüftköpfe verwendet, die Patienten (in der Regel im Rahmen des Einbaus von Hüftkopprothesen) entfernt wurden. Zum Zeitpunkt der Entnahme lag sowohl eine Einverständniserklärung des Patienten zur

Probenentnahme als auch ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag vor (AZ 2033/08).

Bei allen Arbeiten wurde ein besonderes Augenmerk auf die Verringerung der Kontaminationsgefahr der Zellkultur gelegt. Aus diesem Grund wurde vor Beginn der Arbeiten die Reinbank gründlich mit 70 %igem Ethanol gereinigt und anschließend ein steriles Abdecktuch ausgebreitet. Dieses diente als Ablagefläche für alle verwendeten sterilen Gegenstände und Werkzeuge. Während der Isolation wurden sterile Handschuhe getragen. Für einen Überblick über die benötigten Materialien siehe Tabelle 3.

Frische humane Hüftköpfe wurden mittels Luer-Zange in möglichst kleine Knochenstückchen zerteilt. Diese wurden zu gleichen Teilen in zwei bereitgestellte und mit 20 ml PBS gefüllte 50 ml Reaktionsgefäße gegeben.

Anschließend wurden die Gefäße bis zur 50 ml Markierung mit PBS gefüllt und die Spongiosafragmente durch Schwenken der verschlossenen Reaktionsgefäße gewaschen. Dieser Vorgang wurde ca. fünfmal wiederholt bis ein Großteil der Erythrozyten entfernt worden war (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985).

Nun wurde die 0,7 prozentige Lösung aus Kollagenase II und PBS hinzugegeben und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, wodurch das Kollagen in der Probe abgebaut wurde. Es wurde so viel Kollagenase-Lösung hinzugegeben, dass alle Spongiosastückchen davon bedeckt waren (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985).

Nach einer Stunde mit mehrmaligem Schwenken wurde die Kollagenaseaktivität mittels 10 ml Kulturmedium gestoppt.

Der entstandene flüssige Überstand wurde abgenommen, in zwei weitere Reaktionsgefäße gegeben und bei 650 g für zehn Minuten zentrifugiert. Das dabei entstandene Zell-Pellet wurde nach dem Absaugen der flüssigen Phase in 25 ml Osteoblastenkulturmedium gelöst und in zwei Zellkulturflaschen ausgesät (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985). Die so gewonnenen Zellen wurden als OSÜ bezeichnet.

Die nach dem Kollagenabbau übriggebliebenen Knochenstückchen wurden ebenfalls auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt und dort in 25 ml Osteoblastenkulturmedium kultiviert. Sie wurden als OSS bezeichnet.

Die Kultur erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

Am Tag nach der Isolation erfolgte ein erster Mediumwechsel. Hierbei wurden mit dem Medium unerwünschte nicht adhärente Zellen entfernt.

2.4 KULTIVIERUNG PRIMÄRER HUMANER OSTEOLASTEN

2.4.1 Wachstumsmedium für OSÜ sowie OSS

Tabelle 4: Benötigte Materialien für die Herstellung von Wachstumsmedium für Osteoblasten

Material		Hersteller
Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten, Unit 0,22 µm		Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
500 ml Minimum Essential Media (MEM) with Earle's Salts, mit L-Glutamine		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
500 ml Ham's F12 mit L-Glutamine		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺		PAA, Pasching, Österreich
2 x 5 ml Stable Glutamine (200 mM)		PAA, Pasching, Österreich
FCS		PAA, Pasching, Österreich
Penicillin		PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin		PAA, Pasching, Österreich
L-Ascorbat-2-Phosphat		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Glycerolphosphat		AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Lösungen	Zutaten	Herstellung
2 x 50 ml FCS		Hitzeinaktivierung: 30 min bei 56 °C

2 x 5 ml Penicillin/Streptomycin		Penicillin: 10000 Einheiten/ml Streptomycin: 10 mg/ml
2x 0,5 ml L-Ascorbat-2- Phosphat-Stocklösung	L-Ascorbat-2- Phosphat	128 mg L-Ascorbat-2-Phosphat in 10 ml PBS gelöst
	PBS	Lösung durch Filtration mit Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten 0,22 µm sterilisiert Abfüllung von 20 Aliquots à 0,5 ml Lagerung bei -20 °C 1 Aliquot pro 500 ml Osteoblastenmedium
2 x 0,5 ml β- Glycerolphosphat- Stocklösung	β-Glycerolphosphat	108 mg β-Glycerolphosphat werden in 10 ml PBS gelöst
	PBS	Lösung wird durch Filtration mit Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten 0,22 µm sterilisiert Portionierung als 20 Aliquots à 0,5 ml 1 Aliquot pro 500 ml Osteoblastenmedium

Für die Grundsubstanz des Kulturmediums wurden 500 ml MEM-Medium und 500 ml Ham's F12-Medium gründlich miteinander vermischt und wieder zu gleichen Teilen in die zwei ursprünglichen Flaschen zurückgegeben.

Auf 500 ml Medium wurden dann 50 ml FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin, 5 ml Stable Glutamine, 0,5 ml L-Ascorbat-2-Phosphat-Stocklösung und 0,5 ml β-Glycerolphosphat-Stocklösung zugegeben (Tabelle 4). Durch Schwenken der Flaschen wurde alles gründlich gemischt. Es wurde von jeder Flasche eine Probe entnommen und zwecks Überprüfung auf Kontamination für drei Tage bei 37 °C im

Inkubator bebrütet. Erst dann wurde das neue Medium verwendet. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C (Ehnert, J, *et al.* 2011).

2.4.2 Mediumwechsel bei Osteoblasten

Alle drei bis fünf Tage wurde unter sterilen Bedingungen unter der Reinbank das alte Medium vorsichtig abgesaugt und durch neue 25 ml des Wachstumsmediums für OSÜ/OSS ersetzt, die zuvor im Wasserbad bei 37 °C erwärmt worden waren. Die weitere Kultur erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.3 Passagierung von Osteoblasten

Tabelle 5: Benötigte Materialien für die Passagierung von Osteoblasten

Material		Hersteller
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺		PAA, Pasching, Österreich
50 ml Falcon Tube		SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea
Zellkulturflaschen 175 cm ²		PAA, Pasching, Österreich
Trypsin		PAA, Pasching, Österreich
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)		PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Zutaten	Herstellung
Osteoblastenkulturmedium	Siehe 2.4.1	Siehe 2.4.1
Trypsin-EDTA (1x)	Trypsin 2,5 mg/ml	Trypsin und EDTA werden im Verhältnis 2,5 mg Trypsin pro ml EDTA gemischt.
	EDTA	

Regelmäßig wurde unter dem Lichtmikroskop beurteilt, wie viel Prozent des Flaschenbodens bereits mit Osteoblasten bewachsen waren. Ab einer Bewuchsfläche von mehr als 80 % wurden die Zellen passagiert, d.h. die Zellen einer Flasche auf drei Kulturflaschen aufgeteilt.

Hierfür wurde zu Beginn das Medium abgesaugt und die Zellen mit 25 ml PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und eine Inkubation von ca. 5 Minuten bei 37 °C im Inkubator wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Unterstützt wurde das Ablösen durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenseite.

Unter dem Lichtmikroskop wurde nun beurteilt, ob sich alle Zellen abgelöst haben und frei schwimmen. Im positiven Fall wurde die Trypsin-Reaktivität mit 5ml Osteoblastenkulturmedium gestoppt. Hatten sich die Zellen noch nicht abgelöst, musste länger inkubiert werden.

Die frei schwimmenden Zellen wurden mit ihrem Medium in ein Falcon Tube gegeben. Der Boden der alten Zellkulturflasche wurde nochmals gründlich mit Medium abgespült. Dieses wurde dann zusätzlich in das Tube gegeben. Das Falcon-Tube mit Medium und Zellen wurde für zehn Minuten bei 600 g zentrifugiert. Hierbei bildete sich am Boden des Tubes ein Zellpellet. Der Medium-Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 6 ml Osteoblastenkulturmedium resuspendiert und auf drei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Jede der drei Zellkulturflaschen wurde mit je 23 ml Osteoblastenkulturmedium aufgefüllt (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985) (Tabelle 5). Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Die Zellen wurden so lange passagiert bis ca. 4 bis 6 x 10⁶ Zellen vorhanden waren. In der Regel war dies bei Passage drei bis vier der Fall.

2.5 ISOLATION PRIMÄRER HUMANER KNOCHENMARK STAMMZELLEN (BMSC)

Tabelle 6: Benötigte Materialien für die Isolation primärer humaner BMSC

Material		Hersteller
50 ml Falcon Tube		SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea
Sterile Handschuhe		Semperit, Wien, Österreich
Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten, Unit 0,22 µm		Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen 175 cm ²		PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺		PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Zutaten	Herstellung
BMSC-Kulturmedium	Siehe 2.6.1	Siehe 2.6.1

Als Quelle für humane BMSC diente KM, das aus dem unfallchirurgischen Operationsbereich des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität-München

stammte. Die Proben wurden intraoperativ im Rahmen der Implantation von Hüftendoprothesen aus dem proximalen Femur-Markraum entnommen. Sie waren bis zur weiteren Verarbeitung, diese erfolgte spätestens vier Stunden nach Entnahme, bei 4 °C gelagert. Zum Zeitpunkt der Entnahme lag sowohl eine Einverständniserklärung des Patienten zur Probenentnahme als auch ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag vor (AZ 2033/08).

Zur Verringerung der Kontaminationsgefahr der Zellkultur wurde vor Beginn der Arbeiten die Reinbank gründlich mit 70 %igem Ethanol gereinigt und anschließend ein steriles Abdecktuch ausgebreitet. Dieses diente als Ablagefläche für alle verwendeten sterilen Gegenstände und Werkzeuge. Während der Isolation wurden sterile Handschuhe getragen.

Zuerst wurde das humane KM in einem 50 ml Reaktionsgefäß in PBS gelöst. Je nach Dickflüssigkeit der Probe wurden unterschiedliche Mengen an PBS benötigt. Es wurde immer so viel PBS hinzugefügt, dass sich das KM gut gelöst hatte und pipettierbar war. Wenn nötig wurden mehrere Reaktionsgefäße benutzt und die Probe auf sie aufgeteilt. Im Anschluss daran wurde die Probe bei 1000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Hierbei entstand eine Dreischichtung, entsprechend des Dichtegradienten der Bestandteile: oben Fett, in der Mitte ein Zellgemisch, in dem auch die SC vorhanden waren, und unten eine Schicht, die größtenteils aus Erythrozyten bestand. Die mittlere Schicht wurde im nächsten Schritt mittels Pipette abgenommen und erneut zentrifugiert, dieses Mal bei 650 g für zehn Minuten.

Bei diesem Zentrifugationsschritt entstand ein Pellet. Von diesem wurde vorsichtig die flüssige Phase abgegossen und das Zell-Pellet anschließend in 25 ml BMSC-Kulturmedium gelöst und in eine Kulturflasche ausgesät (Tabelle 6). Die Kultur erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂

Am folgenden Tag wurde, nachdem die BMSC am Flaschenboden adhärirt waren das Medium und mit ihm alle nicht adhärennten Zellen wie Erythrozyten abgenommen und durch neues Medium ersetzt (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985).

2.6 KULTIVIERUNG PRIMÄRER HUMANER KNOCHENMARKSTAMMZELLEN

2.6.1 Herstellung des Wachstumsmediums für BMSC

Tabelle 7: Benötigte Materialien für die Herstellung von Wachstumsmedium für BMSC

Material	Hersteller
2 x 500 ml Dulbecco's MEM (DMEM) with Earle's Salts	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Herstellung
2 x 50 ml FCS	Hitzeinaktivierung: 30 min bei 56 °C
2 x 5 ml Penicillin/Streptomycin	Penicillin: 10000 Einheiten/ml Streptomycin: 10 mg/ml

Für BMSC und AdMSC wurde dasselbe Wachstumsmedium verwendet. Es setzte sich zusammen aus je 500 ml DMEM, 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin. FCS, Penicillin und Streptomycin wurden auf für 500 ml DMEM passende Portionen aliquotiert und entsprechend der jeweiligen Bedürfnisse gelagert. Zur Herstellung der Medien musste dann lediglich je ein Aliquot der Zutaten zu 500 ml DMEM gegeben werden. Durch Schwenken der Flaschen wurde alles gemischt (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985) (Tabelle 7).

Es wurde von jeder Flasche eine Probe entnommen und zwecks Überprüfung auf Kontamination für drei Tage bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Erst danach wurde das neue Medium verwendet. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

2.6.2 Mediumwechsel bei BMSC

Alle drei bis fünf Tage wurde unter sterilen Bedingungen unter der Reinbank das alte Medium vorsichtig abgesaugt und durch frische 25 ml des Wachstumsmediums für BMSC ersetzt, welche zuvor im Wasserbad bei 37 °C erwärmt worden waren. Die weitere Kultur erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.6.3 Passagierung von BMSC

Tabelle 8: Benötigte Materialien für die Passagierung von BMSC

Material		Hersteller
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺		PAA, Pasching, Österreich
50 ml Falcon Tube		SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea
Zellkulturflaschen 175 cm ²		PAA, Pasching, Österreich
Trypsin		PAA, Pasching, Österreich
EDTA		PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Zutaten	Herstellung
BMSC-Kulturmedium	Siehe 2.6.1	Siehe 2.6.1
Trypsin-EDTA (1x)	Trypsin 2,5 mg/ml	Trypsin und EDTA werden im Verhältnis 2,5 mg Trypsin pro ml EDTA gemischt.
	EDTA	

Die Passagierung der BMSC erfolgte analog zu der Passagierung der Osteoblasten. Für den detaillierten Ablauf siehe deshalb im entsprechenden Abschnitt. Der einzige Unterschied war, dass anstelle des Osteoblasten - Kulturmediums das BMSC - Kulturmedium verwendet wurde (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985) (Tabelle 8).

Die Zellen wurden so lange passagiert bis ca. 4 bis 6 x 10⁶ Zellen vorhanden waren. In der Regel war dies bei Passage drei oder vier der Fall.

2.7 ISOLATION ADIPOZYTÄRER MESENCHYMALER STAMMZELLEN (AdMSC)

Tabelle 9: Benötigte Materialien für die Isolation der AdMSC

Material		Hersteller
50 ml Falcon Tube		SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea
Sterile Petrischale		neoLab, Heidelberg, Germany
Sterile Pinzette		Medico Care, Numansdorp, Netherlands
Steriles Skalpell		Feather, Osaka, Japan
Sterile Handschuhe		Semperit, Wien, Österreich
Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten, Unit 0,22 µm		Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen 175 cm ²		PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺		PAA, Pasching, Österreich
Kollagenase Typ II		Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS		PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Zutaten	Herstellung
Adipozytenkulturmedium (entspricht dem BMSC-Kulturmedium)	Siehe 2.6.1	Siehe 2.6.1

Kollagenase-Lösung (ca. 1 ml)	0,7 mg Kollagenase Typ II	zur Herstellung wird die Kollagenase in PBS gelöst und durch Filtration sterilisiert
	1,0 ml PBS	

Als Quelle für humane AdMSC diente Fettgewebe, das aus dem Operationsbereich der Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München stammte. Zum Zeitpunkt der Entnahme lag sowohl eine Einverständniserklärung des Patienten zur Probenentnahme als auch ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag vor (AZ 2033/08).

Vor Beginn der Arbeiten wurde die Reinbank gründlich mit 70 %igem Ethanol gereinigt und anschließend ein steriles Abdecktuch ausgebreitet. Dieses diente als Ablagefläche für alle verwendeten sterilen Gegenstände und Werkzeuge. Während der Isolation wurden sterile Handschuhe getragen.

Frisches humanes Fettgewebe aus dem OP wurde mittels Skalpell und Pinzette in einer Petrischale unter der Reinbank in möglichst kleine Stückchen geschnitten und daraufhin in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsröhrchen wurde mit PBS aufgefüllt, verschlossen und leicht geschüttelt. Anschließend wurde das PBS steril abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde so häufig wiederholt bis das PBS klar blieb.

Zu den gewaschenen Gewebestückchen wurde eine Mischung aus 0,7 mg/ml Kollagenase und PBS gegeben, bis das Fettgewebe ganz bedeckt war. Danach wurde die Mischung für 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, wobei das Röhrchen mehrfach während der Inkubation geschüttelt wurde.

Die Kollagenase wurde dann mit 10-20 ml Adipozytenkulturmedium gestoppt. Durch zehn - minütige Zentrifugation bei 650 g wurden die Zellen von der flüssigen Phase getrennt, wodurch sich zwei sichtbare Phasen bildeten. Die obere Phase wurde möglichst vollständig abgenommen und verworfen (Tabelle 9).

Das zurückgebliebene Zellpellet wurde nun in einigen Millilitern AdMSC - Kulturmedium suspendiert und in eine Kulturflasche übertragen, welche bis 25 ml mit AdMSC - Kulturmedium aufgefüllt wurde (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine

1985; Haussling, Deninger, *et al.* 2019). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.8 KULTIVIERUNG ADIPOZYTÄRER MESENCHYMALER STAMMZELLEN

2.8.1 Wachstumsmedium für AdMSC

Tabelle 10: Benötigte Materialien für die Herstellung von Wachstumsmedium für AdMSC

Material	Hersteller
2 x 500 ml DMEM with Earle's Salts	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Herstellung
2 x 50 ml FCS	Hitzeinaktivierung: 30 min bei 56 °C
2 x 5 ml Penicillin/Streptomycin	Penicillin: 10.000 Einheiten/ml Streptomycin: 10 mg/ml

Für BMSC und AdMSC wurde dasselbe Wachstumsmedium verwendet. Es setzte sich zusammen aus je 500 ml DMEM, 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 g/ml Streptomycin. FCS, Penicillin und Streptomycin wurden auf für 500 ml DMEM passende Portionen aliquotiert und entsprechend der jeweiligen Bedürfnisse gelagert. Zur Herstellung der Medien musste dann lediglich je ein Aliquot der Zutaten zu 500 ml DMEM gegeben werden. Durch Schwenken der Flaschen wurde alles gemischt (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985) (Tabelle 10).

Es wurde von jeder Flasche eine Probe entnommen und zwecks Überprüfung auf Kontamination für drei Tage bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Erst dann wurde das neue Medium verwendet. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

2.8.2 Mediumwechsel bei AdMSC

Alle drei bis fünf Tage wurde unter sterilen Bedingungen unter der Reinbank das alte Medium vorsichtig abgesaugt und durch frische 25 ml AdMSC-Kulturmedium ersetzt, welche zuvor bei 37 °C im Wasserbad erwärmt worden waren. Die weitere Kultur erfolgte dann wiederum im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.8.3 Passagierung von AdMSC

Tabelle 11: Benötigte Materialien für die Passagierung von AdMSC

Material		Hersteller
50 ml Falcon Tube		SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea
Zellkulturflaschen 175 cm ³		PAA, Pasching, Österreich
Trypsin		PAA, Pasching, Österreich
EDTA		PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺		PAA, Pasching, Österreich
Lösungen	Zutaten	Herstellung
AdMSC-Kulturmedium	Siehe 2.8.1	Siehe 2.8.1
Trypsin-EDTA (1x)	Trypsin 2,5 mg/ml	Trypsin und EDTA werden im Verhältnis 2,5 mg Trypsin pro ml EDTA gemischt.
	EDTA	

Die Passagierung der AdMSC erfolgte analog zu der Passagierung der Osteoblasten. Der einzige Unterschied war, dass anstelle des Osteoblasten-Mediums das AdMSC-Kulturmedium verwendet wurde (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985). Für den Detaillierten Ablauf siehe im Abschnitt Passagierung von Osteoblasten sowie Tabelle 11. Die Zellen wurden so lange passagiert bis ca. 4 bis 6 x 10⁶ Zellen vorhanden waren. In der Regel war dies bei Passage drei oder vier der Fall.

2.9 EINKAPSELN VON STAMMZELLEN

Mit einem eigens dafür angefertigten elektrostatischen Bead-Generator wurden einerseits leere Alginat-Beads zur Kontrolle, andererseits Beads mit Zellen erzeugt. Hierbei tropft ein Gel des Biopolymers Alginat in eine Calcium-Chlorid-Phosphat-Lösung. Der Aufbau wird in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen unter der Reinbank beziehungsweise alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vorab autoklaviert.

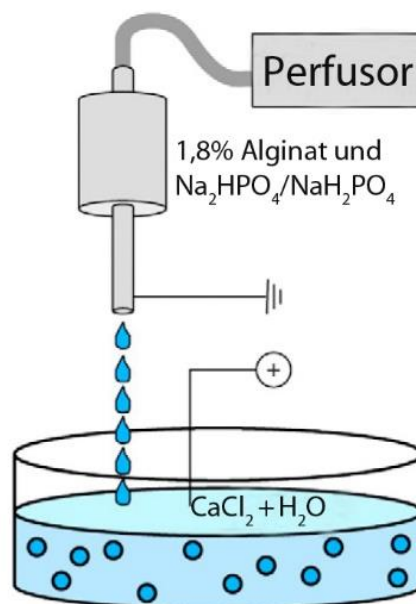


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Bead-Generators und Einkapselvorganges nach Xie *et al.* (Xie, Olderooy, *et al.* 2010)

Tabelle 12: Benötigte Materialien für das Einkapseln von SC

Material	Hersteller
Bead-Generator	Sonderanfertigung der Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU)-Trondheim
10 ml Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenpumpe	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Glasschale	neoLab, Heidelberg, Germany
Magnetrührer mit sterilen Rührfischen	Heidolph Instruments, Schwabach, Germany
Dulbecco's PBS einfach konzentriert	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich
Alginat	Zur Verfügung gestellt durch NTNU-Trondheim
Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O	Klinikum rechts der Isar
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland

Lösungen	Zutaten	Herstellung
Alginate Lösung (2 %ig):	50 ml Alginate C _{final} 2 %	Die Zutaten werden gründlich vermischt, anschließend Titrierung des pH-Wertes mittels HCl auf pH 7,2-7,4
	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ C _{final} 100 mM	
	HCl	
NaCl-Lösung C _{final} 0,9 %	NaCl 9 g	9g NaCl werden zu 1 l H ₂ O gegeben und gründlich vermischt
	1 l H ₂ O	
CaCl ₂ Lösung	1 Liter CaCl ₂ C _{final} 300 mM	Die Zutaten werden gründlich vermischt, anschließen Titrierung des pH-Wertes mittels HCl auf pH 7,2-7,4
	Tris C _{final} 50 mM	
	HCl	
Bei der Herstellung der Lösung muss bedacht werden, dass ca. 40 ml HCl zur Titrierung des pH-Wertes benötigt werden.		

Aus Alginate und destilliertem Wasser wurde eine 2 % Lösung hergestellt, zu der bis zu einer Konzentration von 110 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ hinzugeben wurde. Der pH-Wert wurde auf einen Wert von 7,2 bis 7,4 titriert. Abschließend wurde die Alginate Lösung mittels Filtrierung sterilisiert. Da die Anfertigung der Alginate Lösung und die Filtration relativ viel Zeit in Anspruch nehmen, wurde die Lösung auf Vorrat hergestellt und portioniert (Xie, Oldero, *et al.* 2010).

CaCl₂ wurde in 950 ml destilliertem Wasser in einer Konzentration von 300 mM gelöst. Hierzu wurde bis zu einer Konzentration von 50 mM Tris gegeben und dann der pH-Wert mittels 1 M HCl auf einen Wert von 7,2-7,4 titriert. Abschließend wurde die Lösung bis zu einem Endvolumen von 1 Liter mit Wasser aufgefüllt und durch Filtration sterilisiert. Auch die CaCl₂-Lösung wurde im Voraus hergestellt und portioniert.

Zunächst wurden die Zellen, wie auch im Rahmen der Zellkultur unter Passagierung beschrieben, trypsiniert (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985). Anschließend wurden sie in 15 ml PBS gelöst.

Unter dem Lichtmikroskop wurde nun die vorhandene Menge an Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt. Dann wurde eine so große Menge PBS mit darin gelösten Zellen entnommen, dass ein Verhältnis von 2×10^6 Zellen auf einen Milliliter Alginate erreicht wurde. Im Schnitt wurden auf diese Art und Weise vier bis 6×10^6 Zellen pro Einkapselvorgang verwendet.

Das PBS mit den darin gelösten Zellen wurde dann bei 650 g für zehn Minuten zentrifugiert und danach das PBS abgenommen. Das zurückbleibende Zellpellet wurde anschließend in PBS gelöst, wobei die dabei verwendete Menge an PBS 10 % des endgültigen Volumens entsprach. Das Gesamtvolumen betrug ca. 4 ml, um eine ausreichende Anzahl an Beads für alle Versuche zu erhalten. Somit kamen auf 3,6 ml Alginate-Lösung 0,4 ml Zell/PBS-Suspension. Alginate und Suspension wurden in einer 10 ml Spritze durch mehrmaliges vor- und zurück- Bewegen des Stempels gründlich vermischt. Abschließend wurden ca. 2 ml Luft in der Spritze belassen, diese in einen Perfusor geklemmt und über einen kleinen Schlauch mit dem Beadgenerator verbunden.

Ca. 200 ml der CaCl_2 -Lösung wurden in einen flachen, weiten Becher gegeben und so unter den Nadeln des Kopfes des Beadgenerators positioniert, dass ein Abstand von ca. zwei Zentimeter zwischen Nadelspitzen und CaCl_2 -Lösung bestand. Die Lösung wurde mittels Magnetrührer und Rührfisch in Bewegung versetzt. Nun wurde der Beadgenerator eingesteckt, eine Schutzhaube geschlossen und Hochspannung von 7kV eingeschaltet. Der Perfusor wurde auf eine Rate von 5 ml/Stunde pro Nadel des Beadgenerators eingestellt. Da anfangs sechs Nadelspitzen verwendet wurden betrug die Perfusionsrate folglich 30 ml/Stunde. Am Ende wurde wegen technischer Probleme nur noch eine Nadelspitze verwendet und die Laufrate entsprechend angepasst.

Kurz bevor die Spritze leer war, wurde der Perfusor gestoppt und mit der Spritze das verbleibende Alginate aus dem System gesaugt, um die Bildung unförmiger, zu großer Beads am Ende zu verhindern. Die Beads blieben für 30 Minuten in der CaCl_2 -Lösung. Dann wurde diese größtenteils abgesaugt und die Beads zweimal mit der 0,9 prozentigen NaCl-Lösung gewaschen. (Tabelle 12)

Die eingekapselten Zellen wurden dann in dem für sie passenden Medium kultiviert. Hierbei kamen 25 ml Medium auf $3-4 \times 10^6$ Zellen (Xie, Olderoy, *et al.* 2010; Westhrin, Xie, *et al.* 2015).

Als letztes wurde der Kopf des Beadgenerators in seine Einzelteile zerlegt, gründlich gereinigt und sterilisiert.

2.10 KULTIVIERUNG ALGINATBEADS

2.10.1 Allgemeine Anmerkungen zum Ablauf

Je nach eingekapselter Zellart werden 25 ml des für diese Zellart spezifischen Differenzierungsmediums benötigt. Von den Beads ohne Zellen werden einige nur mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium kultiviert und andere nur mit AdMSC/BMSC-Differenzierungsmedium.

2.10.2 Mediumwechsel Zellkultur in Alginatbeads

2.10.2.1 Herstellung des Differenzierungsmedium für OSÜ/OSS

Tabelle 13: Benötigte Materialien für die Herstellung von Differenzierungsmedium für OSÜ/OSS

Material	Hersteller
500 ml MEM with Earle's Salts	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
500 ml Ham's F12	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
2 x 5 ml Stable Glutamine (200 mM)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
L-Ascorbat-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Glycerolphosphatdisodium	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)		PAA, Pasching, Österreich
Kalziumchlorid		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dexamethason		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten Unit 0,22 µm		Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Lösungen	Zutaten	Herstellung
2 x 25 ml FCS		Hitzeinaktivierung: 30 min bei 56 °C
2 x 5 ml Penicillin/Streptomycin		Penicillin: 10000 Einheiten/ml Streptomycin: 10 mg/ml
2x 10 ml L-Ascorbat-2-Phosphat-Stocklösung	L-Ascorbat-2-Phosphat	je 27,56 mg L-Ascorbat-2-Phosphat werden in je 10 ml MEM/Ham's F12 gelöst die Lösung wird durch Filtration sterilisiert
	MEM with Earle's Salts	
	Ham's F12	
2 x 10 ml β-Glycerolphosphat-Stocklösung	β-Glycerolphosphatdisodium	je 1144,8 mg β-Glycerolphosphatdisodium werden in je 10 ml MEM/Ham's F12 gelöst die Lösungen werden durch Filtration sterilisiert
	MEM with Earle's Salts	
	Ham's F12	
2 x 10 ml HEPES-Stocklösung	HEPES	Je 3157 mg HEPES werden in je 10 ml MEM/Ham's F12 gelöst
	MEM with Earle's Salts	

	Ham's F12	
2 x 10 ml Kalziumchlorid-Stocklösung	Kalziumchlorid	je 121,9 mg Kalziumchlorid werden in je 10 ml MEM/Ham's F12 gelöst
	MEM with Earle's Salts	
	Ham's F12	
2 x Dexamethason-Stocklösung	Dexamethason	3 mg Dexamethason werden in 50 ml PBS gelöst
	PBS	Abfüllung von 94 Aliquots à 530 µl Lagerung bei -20 °C 1 Aliquot pro 500 ml Medium

Als Grundlage für das Differenzierungsmedium sowie für die Stocklösungen diente eine äquivalente Mischung aus 500 ml MEM-Medium und 500 ml HAM F12-Medium, die gründlich miteinander vermischt und wieder zu gleichen Teilen in die zwei Flaschen aufgeteilt wurden.

Für die Herstellung des Differenzierungsmediums wurde zu jeder 500 ml-Flasche mit dem Gemisch der beiden Medien eine Portion der β -Glycerolphosphat-, L-Ascorbat-2-Phosphat-, HEPES- und Kalziumchlorid-Stocklösungen gegeben.

Als weitere Bestandteile wurden pro Flasche 25 ml FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin, 5 ml Stable Glutamine und ein Aliquot Dexamethason zugegeben (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985). (Tabelle 13)

Durch Schwenken der Flaschen wurde alles gut durchmischt. Um Kontaminationen des fertig gemischten Mediums auszuschließen, wurde von jeder Flasche eine Probe entnommen und diese für 3 Tage bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Zeigte sich hierbei kein unerwünschter Befall des Mediums mit Bakterien oder Ähnlichem wurde das neue Medium verwendet.

Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

2.10.2.2 Herstellung des Differenzierungsmediums für BMSC und AdMSC

Tabelle 14: Benötigte Materialien für die Herstellung von Differenzierungsmedium für BMSC und AdMSC

Material	Hersteller	
2 x 500 ml DMEM with Earle's Salts	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich	
2 x 5 ml Stable Glutamine (200 mM)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Millex® GP Sterilfilter für Flüssigkeiten Unit 0,22 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	
HEPES	PAA, Pasching, Österreich	
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Cholecalciferol	Fluka - Sigma-Aldrich, München, Deutschland	
Lösungen	Zutaten	Herstellung
2 x 25 ml FCS		Hitzeinaktivierung: 30 min bei 56 °C
2 x 5 ml Penicillin/Streptomycin		Penicillin: 10.000 Einheiten/ml Streptomycin: 10 mg/ml
2x 10 ml L-Ascorbat-2-Phosphat-Stocklösung	L-Ascorbat-2-Phosphat	je 27,56 mg L-Ascorbat-2-Phosphat werden in je 10 ml DMEM gelöst Lösung wird durch Filtration sterilisiert
	DMEM	

2 x 10 ml β -Glycerolphosphat-Stocklösung	β -Glycerolphosphat	je 1144,8 mg β -Glycerolphosphat werden in je 10 ml DMEM gelöst die Lösungen werden durch Filtration sterilisiert
	DMEM	
2 x 10 ml HEPES-Stocklösung	HEPES	Je 3157 mg HEPES werden in je 10 ml DMEM gelöst
	DMEM	
2 x 10 ml Kalziumchlorid-Stocklösung	Kalziumchlorid	je 121,9 mg Kalziumchlorid werden in je 10 ml DMEM gelöst
	DMEM	
2 x 5 M Cholecalciferol-Stocklösung	Cholecalciferol	

Für BMSC und AdMSC wurde dasselbe Differenzierungsmedium verwendet.

Ebenso wie bei dem Differenzierungsmedium für die OSÜ beziehungsweise OSS wurde das Ausgangs-Medium, in diesem Fall DMEM-Medium, zunächst für die Herstellung der benötigten Stocklösungen - β -Glycerolphosphat-, L-Ascorbat-2-Phosphat-, HEPES- und Kalziumchlorid-Stocklösung- verwendet.

Nach der Herstellung der Stocklösungen wurde das eigentliche Medium gemischt. Hierfür wurde zu jeder 500 ml-Flasche des DMEM-Mediums eine Portion der Stocklösungen gegeben.

Als nächstes wurden pro Flasche 25 ml FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 5 ml Stable Glutamine sowie ein Aliquot Cholecalciferol zugegeben.

(Tabelle 14)

Durch Schwenken der Flaschen wurden alle Bestandteile gründlich miteinander vermischt (El-Amin, Botchwey, *et al.* 2006; Robey and Termine 1985).

Um das fertige Nährmedium auf eine eventuelle Kontamination zu testen, wurde von jeder Flasche eine Probe entnommen und für 3 Tage bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Erst wenn sich bei den Proben keine Kontamination gezeigt hatte wurde das neue Medium verwendet. Die Lagerung des Mediums erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

2.10.3 Mediumwechsel Alginatbeads

Die Kulturflaschen mit den Beads wurden so gehalten, dass sich alle Beads in einer Ecke abgesetzt haben. Sodann wurde das alte Medium vorsichtig so abgesaugt, dass alle Beads in der Kulturflasche geblieben sind. Nun wurden 25 ml von dem jeweiligen bei 37 °C im Wasserbad vorgewärmtem Differenzierungsmedium dazugegeben und die Beads wieder im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.11 LICHTMIKROSKOPIE (LM)

LM wurde aufgrund der Einfachheit für verschiedene Zwecke verwendet und erfolgte in der Regel ohne vorherige Aufbereitung der Zellen beziehungsweise erfolgte direkt in den jeweiligen Kulturgefäßen. Verwendet wurde hierfür das Mikroskop Zeiss Axiovert 40 CFL mit Vergrößerungen im Bereich von 5- bis 40-fach.

Zum einen wurde die Lichtmikroskopie nach der Isolation der Zellen aus dem Gewebe für verschiedene Zwecke im Rahmen der Zellkultur benutzt sowie im Rahmen verschiedener Färbe-Charakterisierungsmethoden (für genauere Informationen, siehe entsprechenden Abschnitt), zum anderen war die LM fester Bestandteil der Charakterisierung der Beads. Im Rahmen der Charakterisierung der Beads wurde die LM an den Kulturtagen 0 - direkt nach dem Einkapseln - 5, 10, 15 und 21 angewandt. Hierbei wurde vor allem auf eine gleichmäßige Form, Größe und Oberfläche der Beads geachtet. Als ein weiteres elementares Charakteristikum der Beads wurde deren Farbe mit einem Spektrum von hellglasi-transparent bis dunkelbraun-schwarz herangezogen (Xie, Olderoy, *et al.* 2010). Die Dokumentation erfolgte mittels Fotografie an dem Mikroskop-Kamera-Software-System Nikon eclipse TE 2000 S.

2.12 LIVE-DEAD-FÄRBUNG

Die Live-Dead-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie wurde im Rahmen der Charakterisierung der Beads zur Beurteilung der Viabilität der eingekapselten Zellen herangezogen. Der Färbeprozess erfolgte hierbei modifiziert zu den Herstellerangaben.

Es erfolgte an den Tagen 1, 10 und 20 (Xie, Olderoy, *et al.* 2010). Hierbei wurde eine Fotodokumentation durchgeführt.

Tabelle 15: Benötigte Materialien für das Live-Dead-Färbung

Material	Hersteller
24-Well-Plate	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
H ₂ O	Klinikum rechts der Isar
400 µl Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
0,5 µl Calcein (Extinktion (Ext.) ~494 nm; Emission (Em.) ~517 nm)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
1,5 µl Ethidiumbromid (Ext. ~495 nm; Em. ~635 nm)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Für die Live-Dead-Färbung wurden zunächst mittels Pipette aus der Zellkulturflasche einige Beads mit Nährmedium in ein Well eines 24 Well-Plates transferiert und anschließend mit der Pipette das Nährmedium von den Beads abgenommen.

In einem zweiten Schritt wurden die Beads in ihrem Well mittels Leitungswasser gründlich gewaschen und in einem separaten Well 400 µl PBS sowie 0,5 µl Calcein und 1,5 µl Ethidiumbromid gemischt (Tabelle 15).

Für die Färbung der Beads wurde das Waschwasser von den Beads abgenommen und durch die PBS-Calcein-Ethidiumbromid-Mischung ersetzt.

Ab diesem Zeitpunkt wurde permanent darauf geachtet die Beads so wenig Licht wie möglich auszusetzen. Deshalb erfolgte die 20-minütige Inkubation an einem dunklen Ort.

Nach dem Abnehmen der Farbe-Lösung mussten die Beads zweimal mit Leitungswasser gewaschen werden. Am Schluss wurde so viel Wasser im Well belassen, dass die Beads knapp von Wasser bedeckt waren und frei schwammen (Haussling, Deninger, *et al.* 2019; Westhrin, Xie, *et al.* 2015; Kohli, Wright, *et al.* 2015).

Nun erfolgte sowohl eine Lichtmikroskopie mit Fotodokumentation als auch Fluoreszenzmikroskopie mit Fotodokumentation. Diese erfolgte mit dem Mikroskop-Kamera-Software-System Nikon eclipse TE 2000 S. Als Lichtquelle für die

Fluoreszenzmikroskopie diente Nikon Intensilight C-HGFI. Die Vergrößerung betrug hierbei 4- beziehungsweise 10-fach.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie liegen die Extinktionswerte für Calcein-Färbung der vitalen Zellen bei ca. 494 nm und die Emissionswerte bei ca. 517 nm. Ethidiumbromid kann in tote Zellen eindringen und dort in die DNA interkalieren. Seine Extinktionswerte liegen mit ca. 495 nm sehr nah bei denen von Calcein. Die Emissionswerte unterscheiden sich mit ca. 635 nm jedoch deutlich von denen des Calcein.

Bei der Durchführung der Fotodokumentation wurde darauf geachtet, dass die Beads zwischen den einzelnen Aufnahmen nicht bewegt wurden um eine direkte Vergleichbarkeit und Zuordenbarkeit zu erreichen, hierfür wurden die zusammengehörigen Bilder von Live und Dead nachträglich am Computer überlagert.

2.13 ALAMAR-BLAU-TEST

Der AB-Test diente der Messung der Zellviabilität und wurde an den Tagen 1,6,11,16 und 21 vorgenommen. Anhand eines voreingestellten Messalgorithmus wurde mittels Platten-Leser das Fluoreszenz Signal aufgezeichnet. Grundlage des AB-Testes ist der Resazurin-Umsatz im Rahmen einer Redox-Reaktion, so dass der Farbumschlag abhängig von der Aktivität des Zellmetabolismus in der Probe ist. Der Ablauf des Testverfahrens erfolgte analog zu den jeweiligen Herstellerangaben.

Tabelle 16: Benötigte Materialien für den AB-Test

Material	Hersteller
Alamar blue Reagenz	Biozol, Eching, Deutschland
96 Well-Platte	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Platten Leser FLUOstar Omega (Ω) mit Software OMEGA-Data-Analyses Version 3.0 und Mars Data-Analyses Version 4.0	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland

Für die Durchführung des AB-Testes wurden zunächst mittels Pipette ein bis zwei Milliliter Bead-Kulturmedium-Mischung aus der Kulturflasche entnommen und mit ca. einem weiteren Milliliter reinem Medium aus der Kulturflasche verdünnt. Aufgrund der höheren Konzentration der Beads in den Kulturflaschen reichte zu Beginn ein Milliliter aus, um genügend Beads zu entnehmen. Wenn im Verlauf der Beadkultur ein zunehmender Teil der Beads für Versuche verbraucht worden war und deshalb ihre Konzentration geringer, wurden zwei Milliliter entnommen. Dieser erste Schritt dient lediglich dazu die Konzentration der Beads in der Probe zu verringern, um sie im Versuchsverlauf zählen zu können und jeweils ähnliche Mengen an Beads für den AB-Test zu verwenden.

Von dieser Suspension wurden jeweils 180 µl in drei Wells einer 96 Well-Platte gegeben und drei weitere Wells mit Medium, ohne Beads, dienten als Kontrollen.

Nach der Zugabe von 18 µl AB-Reagenz wurde für sechs Stunden inkubiert und anschließend die Anzahl der Beads in den jeweiligen Wells unter dem LM gezählt, um später auf Werte pro Bead zurückrechnen zu können (Haussling, Deninger, *et al.* 2019; Westhrin, Xie, *et al.* 2015).

Als Letztes erfolgte die Absorptionsmessung: Hierfür wurde der Platten-Leser FLUOstar Omega der Firma BMG LABTECH GmbH verwendet. Als Messprogramm diente OMEGA Version 3.0, als Messprotokoll diente ALAMAR Blue Kinetic mit den Werten: Extinktionsfilter 544 nm, Emissionsfilter 590 nm und Gain 800. Die Ausgabe der Messwerte erfolgte mittels Omega-Data Analysis BMG LABTECH Microplate Data Analyse Software sowie der MARS Data Analysis Software Version 4.0.; die Messdaten wurden in einem Excel-Tabellen-Dokument gespeichert (Tabelle 16).

Um später das Überleben der einzelnen Zelltypen im Verlauf vergleichen zu können, wurde der Messwert von Tag 1 direkt nach dem Einkapseln der Zellen als 100 % gesetzt.

2.14 ALKALISCHE PHOSPHATASE–AKTIVITÄTSMESSUNG

Die AP-Aktivität wurde gemessen, da es sich bei der AP um ein von MSC während der Osteogenese exprimiertes und für ihre Differenzierung sehr gut charakterisiertes Enzym handelt (Zhao, Weir, *et al.* 2010) , so dass die Aktivität der AP als ein Marker für die Zelldifferenzierung benutzt wurde (Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Die Messung des Absorptionsgrades erfolgte an den Tagen 1,6,11,16 und 21 mittels voreingestelltem Messverfahren am Platerader und analog zu den Herstellerangaben.

2.14.1 Ablauf der AP-Aktivitätsmessung

Tabelle 17: Benötigte Materialien für die AP-Aktivitätsmessung

Material		Hersteller
96 Well Platte		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (4-pNp-Lösung)		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycine		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris-Base		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MgCl ₂		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Destilliertes Wasser (dH ₂ O)		Klinikum rechts der Isar
NaOH		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lösung	Zutaten	Herstellung
AP-Substrat	4-pNp-Lösung	Für 1 l 0,1 M AP-Puffer mit pH von 10,5 werden <ul style="list-style-type: none"> • 3.75 g Glycine (MW 75,07 g/mol) C_{final} 50 mM • 12.11 g Tris-Base (MW 121,1 g/mol) C_{final} 100 mM • 203 mg MgCl₂ (MW 203,3 g/mol) C_{final} 1 mM mit dH ₂ O bis auf ein Volumen von 900 ml aufgefüllt. Dann wird der pH mittels NaOH auf einen Wert von 10,5 titriert und zum Abschluss mit dH ₂ O auf 1 l aufgefüllt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.
	Glycine	
	Tris-Base	
	MgCl ₂	
	dH ₂ O	
	NaOH	1,3 mg 4-pNp-Lösung werden im AP-Puffer gelöst.

Platten-Leser FLUOstar Ω mit Software OMEGA-Data-Analyses Version 3.0 und Mars Data-Analyses Version 4.0	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland
---	--

Mit der Pipette wurden 1-2 ml der Bead-Medium-Suspension in ein Well einer 96-Well-Platte transferiert und mit weiteren 1-2 ml reinem Medium aus der Kulturflasche verdünnt: Aufgrund der höheren Konzentration der Beads in den Kulturflaschen reichte zu Beginn ein Milliliter aus, um genügend Beads zu entnehmen. Als im Verlauf der Beadkultur ein Teil der Beads für Versuche verbraucht worden war und deshalb die Konzentration abgenommen hatte, wurden zwei Milliliter Medium entnommen. Dieser erste Schritt diente lediglich dazu, die Konzentration der Beads in der Probe zu verringern, um sie im Versuchsverlauf zählen zu können und jeweils ähnliche Mengen an Beads für die AP-Aktivitätsmessung zu verwenden.

Nach diesem Arbeitsschritt wurden je 200 μ l der verdünnten Suspension in drei weitere Wells gegeben und das Medium so abpipettiert, dass die Beads in den Wells verblieben sind. Anschließend wurden die Beads in jedem Well mit Leitungswasser gewaschen und unter dem LM gezählt.

Das Hinzugeben von 100 μ l AP-Substrat startete die Reaktion. Parallel wurden in ein viertes Well 100 μ l AP-Substrat ohne Beads als Blindwertmessung gegeben. Die Inkubationszeit erstreckte sich über einen Zeitraum von 30 Minuten bis hin zu zwei Stunden, abhängig davon, wie schnell ein Farbumschlag sichtbar wurde. Die benötigte Zeit wurde gemessen und dokumentiert (Robey and Termine 1985; Haussling, Deninger, *et al.* 2019; Westhrin, Xie, *et al.* 2015; Skehan, Storeng, *et al.* 1990).

Als nächster Schritt wurde die verfärbte Lösung so in drei neue Wells um-pipettiert, dass die Beads in den alten Wells verblieben. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des Substratumsatzes anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem Platerader FLUOstar Ω der Firma BMG LABTECH GmbH. Die Ausgabe der Messwerte erfolgte mittels OMEGA-Data Analysis BMG LABTECH Microplate Data Analyse Software sowie der MARS Data Analysis Software Version 4.0.; die Daten wurden in einem Excel-Tabellen-Dokument gespeichert. (Tabelle 17)

Mit Hilfe des Blindwertes, der Inkubationszeit und der Anzahl an Beads erfolgte die Umrechnung in pro Bead und Minute.

2.14.2 Standardkurve AP-Aktivitätsmessung

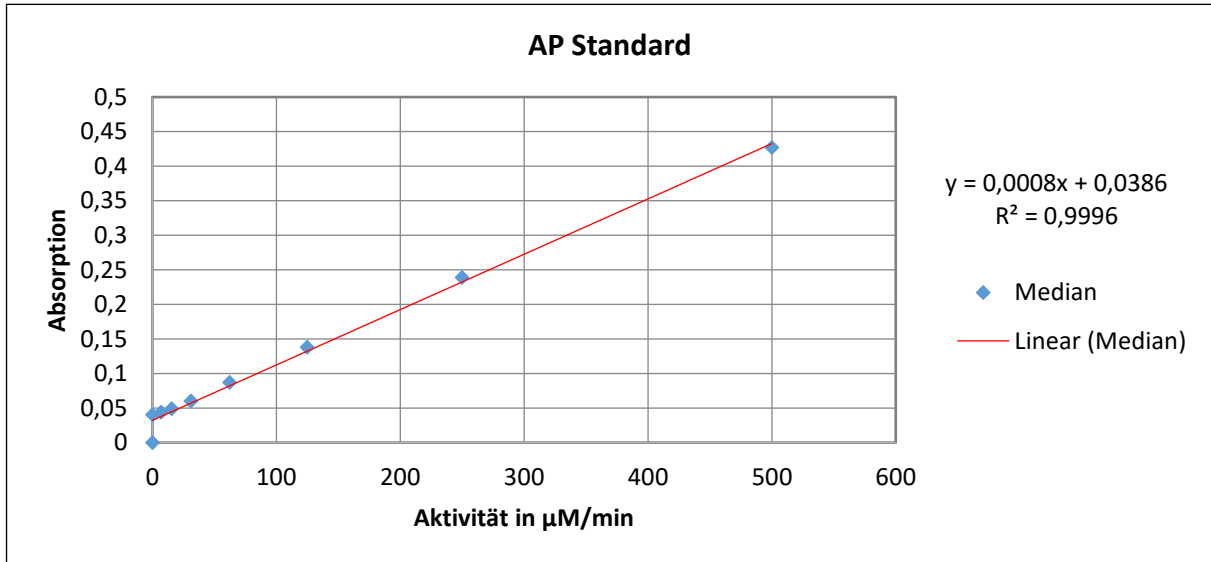


Abbildung 17: Standardkurve der AP-Messung. Auf der y-Achse ist die Absorption und auf der x-Achse die Aktivität in $\mu\text{M}/\text{min}$ aufgetragen.

Tabelle 18: Pipettierschema für die AP-Standardkurve

Standard	Substratkonzentration (μM)	AP-Reaktionspuffer (μl)	4-pNp-Lösung (μl)
1	500	450	50 μl
2	250	250	250 μl von Standard 1
3	125	250	250 μl von Standard 2
4	62,5	250	250 μl von Standard 3
5	31,25	250	250 μl von Standard 4
6	15,625	250	250 μl von Standard 5
7	7,813	250	250 μl von Standard 6
8	0	500	0

Für die Standardkurve wurde eine 1:2 serielle Verdünnung, ausgehend von einer maximalen Konzentration von 500 μM angefertigt (Tabelle 18). Aus den so gewonnenen Messwerten wurde dann ein Diagramm erstellt (Abbildung 17). Die Werte der Absorption wurden hierbei

auf der y-Achse und die Werte der Aktivität in $\mu\text{M}/\text{min}$ auf der x-Achse aufgetragen. Anhand der Ausgleichsgeraden von diesem Diagramm konnte nun mittels der Geradengleichung ($y=mx+n$) jedem Messwert auch ein Wert für die Substratkonzentration zugeordnet werden.

Standard 8 war hierbei der Blindwert.

2.15 ALIZARIN-ROT-FÄRBUNG (ARS)

2.15.1 Methodik

Die ARS dient dem Nachweis des Mineralisierungsgrades der Beads. Hierbei wurde angenommen, dass mit zunehmender Differenzierung der Zellen in Richtung der osteogenen Linie die Mineralisierung der Beads zunimmt. Um diese Annahme zu kontrollieren, wurden auch Kontrollen mit Beads ohne Zellen durchgeführt. Die ARS wurde an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21 angefertigt und erfolgte analog zu den Herstellerangaben (Xie, Olderoy, *et al.* 2010; Stanford, Jacobson, *et al.* 1995; McGee-Russell 1958).

2.15.2 Ablauf der ARS

Tabelle 19: Benötigte Materialien für die ARS

Material		Hersteller
Alizarin Red S		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
dH ₂ O		Klinikum rechts der Isar
Cetylpyridiniumchlorid		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol 99,9 %		Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Lösung	Zutaten	Herstellung
Alizarin-Rot-Färbelösung C _{final} 0,5 %, pH 4,0	200 mg Alizarin Red S 40 ml dH ₂ O	200 mg Alizarin Red S werden in 40 ml dH ₂ O gelöst

Cetylpyridiniumchlorid-Lösung mit EDTA 10 %	10 g Cetylpyridiniumchlorid 10 ml 0,5 M EDTA-Lösung 50 mM 90 ml H ₂ O	Cetylpyridiniumchlorid, wird in EDTA und dH ₂ O gelöst.
Platten-Leser FLUOstar Ω mit Software OMEGA-Data-Analyses Version 3.0 und Mars Data-Analyses Version 4.0	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland	

Zu Anfang wurden 1-2 ml Bead-Medium-Suspension unter sterilen Bedingungen aus der Kulturflasche entnommen. Zu Beginn reichte aufgrund der höheren Konzentration der Beads in den Kulturflaschen ein Milliliter aus, um genügend Beads zu entnehmen. Als im Verlauf der Beadkultur ein Teil der Beads für Versuche verbraucht worden war und deshalb die Konzentration der Beads im Medium abgenommen hatte, wurden zwei Milliliter Medium entnommen um ausreichend hohe Zahlen an Beads für die Versuche zu erhalten.

Im nächsten Schritt wurden diese in je drei Wells einer 96-Well-Platte aufgeteilt und das Medium von den Beads entfernt. Entsprechend der Menge der vorhandenen Beads wurde auch hierbei die Pipettiermenge im Bereich von 100-200 μ l variiert. Nachdem die Beads einmal mit Leitungswasser gewaschen wurden, mussten sie für eine Stunde mit 99,9 % Ethanol inkubiert werden.

Nach dem Abnehmen des Ethanols wurden die Beads zwei weitere Male mit Leitungswasser gewaschen und dann pro Well mit 200 μ l der Alizarin-Rot-Lösung gefärbt. Hierfür wurde bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken für 30 Minuten inkubiert.

Danach wurden die Beads so lange mit Leitungswasser gewaschen, bis das Waschwasser keine Farbpartikel mehr enthielt. Dies wurde unter dem LM kontrolliert. Hierbei wurde auch die Anzahl der Beads pro Well gezählt. Darüber hinaus konnte hierbei auch eine erste optische Beurteilung des Mineralisierungsgrades und der Mineralisierungsverteilung in der Bead-Population erfolgen.

Um die Mineralisierung quantifizieren zu können, wurde das Wasser durch je 100 μ l im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmtes 10 % Cetylpyridiniumchlorid mit EDTA ersetzt und auf dem Wackeltisch so lange inkubiert, bis die Beads unter dem Mikroskop total entfärbt waren. Im Folgenden wurde die Lösung von den Beads ab und in neue Wells umpipettiert

(Xie, Olderoy, *et al.* 2010; Stanford, Jacobson, *et al.* 1995; McGee-Russell 1958). Nun konnte mit dem Platerreader FLUOstar Ω der Firma BMG LABTECH GmbH die Absorption bei 562 nm gemessen werden. Die Ausgabe der Messwerte erfolgte mittels OMEGA-Data Analysis BMG LABTECH Microplate Data Analyse Software sowie der MARS Data Analysis Software Version 4.0. Die Speicherung erfolgte in einem Excel-Tabellen-Dokument. (Tabelle 19)

2.15.3 Standardkurve ARS

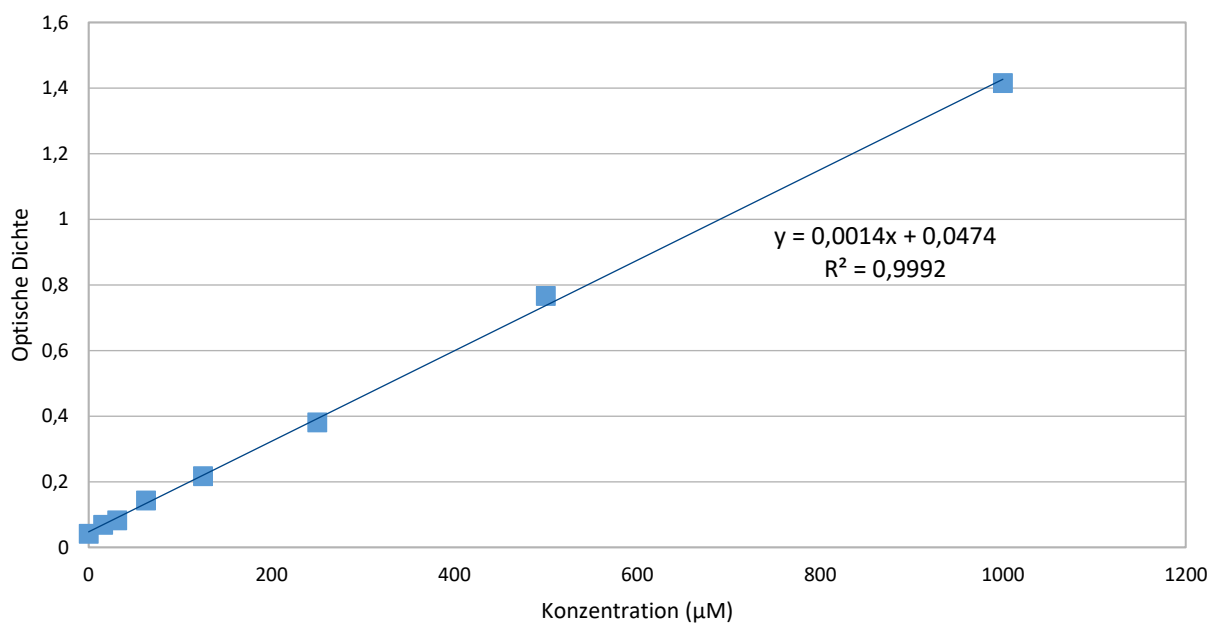


Abbildung 18: Alizarin-Rot-Standardkurve. Auf der y-Achse ist die optische Dichte (OD) und auf der x-Achse die Konzentration (C) in μM aufgetragen

Tabelle 20 Pipettierschema für die ARS-Standardkurve, C_{final} ist hierbei die endgültige Konzentration und ARS-Stock die ARS-Stock-Lösung.

Standard	C_{final} (μM)	ARS-Stock (μl)	10 % Cetylpyridiniumchlorid (μl)
1	1000	68,4	931,6
2	500	500 von Standard 1	500
3	250	500 von Standard 2	500
4	125	500 von Standard 3	500
5	62,5	500 von Standard 4	500
6	31,25	500 von Standard 5	500

7	15,63	500 von Standard 6	500
8	0	0	1000

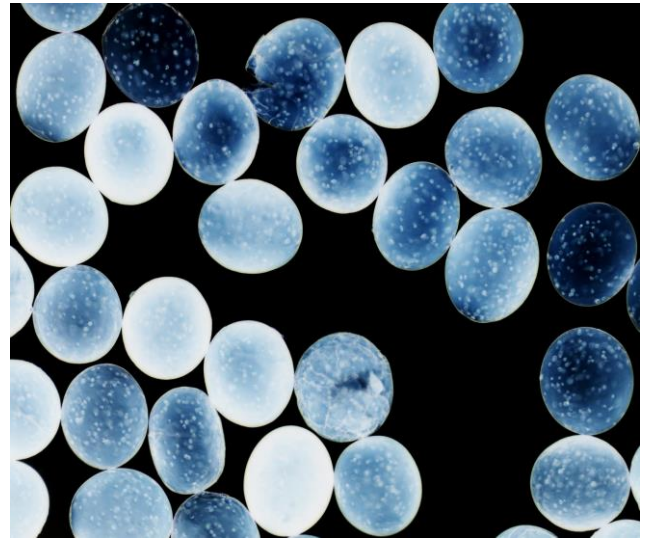
Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe durchgeführt (Tabelle 20). Standard 1 ist hierbei der Blindwert. Aus den Messwerten konnte dann ein Diagramm erstellt werden. Mittels der Geradengleichung der Ausgleichsgeraden dieser Standardkurve (Abbildung 18) konnte nun jedem gemessenen Extinktionswert eine Konzentration zugeordnet werden. Die Umrechnung von Extinktion zu Konzentration erfolgte anhand der Formel $C = (\text{Messwert} - 0,0801) / 0,00251$, wobei in der Formel C die Konzentration und Messwert die mittels Platereader FLUOstar Ω gemessene Extinktion beziehungsweise optische Dichte (OD) war.

2.16 BILDANALYSE



500 μm

Abbildung 19: Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahme der Fettstammzellen des Spenders 156 am 07.02.2011 dem 21. und letzten Kulturtag



500 μm

Abbildung 20: Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahme der Fettstammzellen des Spenders 156 am 07.02.2011 dem 21. und letzten Kulturtag, nachdem die Aufnahme invertiert und ein Schwarzabgleich durchgeführt wurde.

Hierfür wurden die im Rahmen der Lichtmikroskopie angefertigten Fotos (Abbildung 19) zunächst mittels Photoshop CS 5.1 invertiert. Anschließend erfolgte ein Schwarzabgleich (Abbildung 20).

Mittels ImageJ wurden im Anschluss mit dem elliptischen Auswahlwerkzeug die jeweiligen Beads ausgewählt. ImageJ bestimmte dann die Fläche sowie die Integrated Density (IntDen). Die Messwerte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und in IntDen pro Fläche umgerechnet. Diese Werte wurden schließlich graphisch aufbereitet und ausgewertet.

2.17 RIBONUKLEINSÄURE (RNA)-ISOLATION AUS IN ALGINAT-BEADS ENTHALTENEN ZELLEN

Tabelle 21: Benötigte Materialien für die RNA-Isolation aus in Alginat-Beads enthaltenen Zellen

Material	Hersteller
50 ml Reaktionsgefäß	BD Falcon™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's PBS	PAA, Pasching, Österreich
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TriFast	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
70 % und 99,9 % Ethanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HEPES	PAA, Pasching, Österreich
dH ₂ O	Klinikum rechts der Isar
peqGold Universal Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Glycerol		Sigma-Aldrich, München, Deutschland
pUC 19 DNA-Größenmarker		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nano Drop 1000		Thermo Scientific, Wilmington, USA
Lösungen	Zutaten	Herstellung
200 ml Citratlösung	Natriumcitrat	Für die Citratlösung werden 2,58 g Natriumcitrat ($C_{\text{final}} 50 \text{ mM}$), 0,90 g NaCl ($C_{\text{final}} 77 \text{ mM}$) und 0,48 g HEPES ($C_{\text{final}} 10 \text{ mM}$) in 200 ml DEPC H ₂ O gemischt.
	NaCl	
	HEPES	
	DEPC H ₂ O	
Diethylpyrocarbonat (DEPC) H ₂ O	DEPC	Aus 1 ml DEPC und 1 l dH ₂ O wird eine Lösung mit $C_{\text{final}} 0,1 \%$ hergestellt. Anschließend wird für 1 h bei 37 °C inkubiert. Vor Gebrauch wurde die Lösung autoklaviert und auf RT abgekühlt.
	1 l dH ₂ O	
10 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	TRIS-aminomethan (MW 121,14 g/mol)	Für den TBE-Puffer werden 540 g TRIS-aminomethane ($C_{\text{final}} 0,89 \text{ M}$), 275 g Boric Acid ($C_{\text{final}} 0,89 \text{ M}$) sowie 37,3 g EDTA ($C_{\text{final}} 20 \text{ mM}$) in 5 l dH ₂ O gelöst. Abschließend wird der pH auf 8,3 titriert.
	Borsäure (MW 61,83 g/mol)	
	EDTA (MW 372,24 g/mol)	
	dH ₂ O	

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Ladepuffer (5 X)	Bromphenolblau	1 mg Bromphenolblau, 25 ml 10 x TBE (C _{final} 5x), 5 ml Glycerol (C _{final} 10 %) und 20 ml H ₂ O werden gemischt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C oder -20 °C (dauerhaft)
	TBE	
	Glycerol	
	H ₂ O	
Agarosegel	peqGold Universal Agarose	1,5 g Agarose zu 100 ml 1fach TBE gegeben und in der Mikrowelle gelöst, sodass eine flüssige 1,5 % Agarose-TBE-Lösung entstand. Auf 100 ml Gel wurden dann 7 µl Ethidiumbromid gegeben
	TBE-Puffer	
	Ethidiumbromid	

Die RNA-Isolation aus in Alginat-Beads enthaltenen Zellen erfolgte in mehreren Schritten (Westhrin, Xie, *et al.* 2015; Cohen, Zaleski, *et al.* 2011). Die benötigten Materialien finden sich in Tabelle 21. Der erste Schritt war hierbei die Lösung der Zellen aus den Beads.

Hierfür wurden Beads einer Anzahl von $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen entsprechend aus der Kulturflasche in ein 50 ml Reaktionsgefäß übertragen.

Durch Stehenlassen des Reaktionsgefäßes kam es zu einer Sedimentation der Beads am Boden, sodass das Medium abgesaugt und die Beads mit PBS gewaschen werden konnten. Im nächsten Schritt wurde das PBS durch 25 ml im Wasserbad vorgewärmter Citratlösung ersetzt. Die Citratlösung sollte zu einer Auflösung der Beads und Freisetzung der Zellen führen. Dies wurde nach einer Inkubationszeit von 10-20 Minuten unter dem Mikroskop überprüft. Sobald sich die Beads aufgelöst hatten und die Zellen frei schwammen, wurde mit 650 g für 10 Minuten zentrifugiert und danach die Citratlösung abgesaugt. Die in Form eines Pellets am Boden zurückgebliebenen Zellen wurden in PBS gelöst und danach erneut für 10 Minuten bei 650 g zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde das PBS durch 500 µl TriFast ersetzt. Dieses wurde mit den darin schwimmenden Zellen in sterile Eppendorfgefäße transferiert. So aufbereitet konnten die gewonnenen Zellen bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden (Westhrin, Xie, *et al.* 2015).

Der zweite Schritt war der eigentliche Isolationschritt der RNA aus den Zellen. Da die Isolation mittels TriFast von PeqLab erfolgte, wurde sie nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die tiefgefrorenen Proben wurden durch 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und es wurden 100 µl Chloroform pro 500 µl verwendeten TriFast hinzugegeben. Bei allen nachfolgenden Bearbeitungsschritten wurden die Proben stets auf Eis gelagert. Nachdem alles für 15 Sekunden auf dem Vortex vorsichtig gemischt und anschließend für 5-10 Minuten inkubiert wurde, kam es zur Trennung der RNA von den anderen Zellbestandteilen. Nun konnte die Probe durch 10-minütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C in zwei bis drei Phasen aufgeteilt werden. Währenddessen wurden 250 µl Isopropanol für jede Probe in neuen Eppendorfgefäßen bereitgestellt und nach der Zentrifugation die die RNA-enhaltende obere, flüssige, klare Phase in sie übertragen.

Nachdem die Probe ein weiteres Mal gründlich gemischt wurde, wurde erneut für 5-10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut für 10 Minuten mit 14.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Hierbei kam es zur Präzipitation der RNA.

Der Überstand wurde nun vorsichtig vom gelartigen RNA-Pellet abgegossen, welches sich am Boden der Eppendorfgefäße befunden hat. Hierbei war besonders darauf zu achten, das kaum sichtbare Pellet nicht ausversehen mit zu verwerfen.

Das RNA-Pellet wurde dann mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und für weitere 10 Minuten mit 14000 g bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang mit 70 %igem Ethanol musste noch ein weiteres Mal wiederholt werden. Der Überstand wurde nach dem letzten Waschschrift vorsichtig vom RNA-Pellet abgegossen und das Pellet in 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Durch das Offenlassen der Eppendorfgefäße für 10-15 Minuten konnte der zurückgebliebene Ethanol entweichen (Scientific 2016).

Das nun vorliegende Gemisch aus DEPC-H₂O-Lösung und RNA konnte bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden. Vor der weiteren Verwendung der RNA musste jedoch noch ihre Menge und Reinheit quantifiziert werden. Dies stellte den dritten Schritt dar und erfolgte mittels photometrischer Messung an einem NanoDrop der Firma Thermo Scientific. Hierfür wurde nach Eichung des Messgerätes mittels 2 µl DEPC-H₂O eine ebenfalls 2 µl fassende Probe des DEPC-H₂O-RNA-gemisches auf die Messeinheit des NanoDrop pipettiert. Das Gerät ermittelte nun die Absorption der Probe bei 230 nm, 260 nm sowie 280 nm und darüber hinaus über eine modifizierte Beer-Lambert Gleichung

die RNA - Menge in ng/ μ l. Die Absorption bei 230 nm entsprach hierbei vor allem der Verunreinigung mit Phenolen und bei 280 nm vor allem der Verunreinigung mit Proteinen. Aus den Messwerten wurden nachfolgend die 260/280- sowie die 230/280- Ratio gebildet. Die 260/280-Ratio sollte dabei möglichst nah an 2 liegen. Wenn sie kleiner als 2 war, sprach dies für eine Verunreinigung der Probe. Die 230/280- Ratio, auch sekundärer Reinheitsparameter genannt, sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Bei niedrigeren Werten sprach auch dies für eine Verunreinigung der Probe (Cohen, Zaleski, *et al.* 2011).

Im vierten Schritt erfolgte dann die Überprüfung der Intaktheit der RNA. Diese wurde mittels Gelelektrophorese getestet.

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarose zu 100 ml 1fach TBE gegeben und in der Mikrowelle gelöst, sodass eine flüssige 1,5 % Agarose-TBE-Lösung entstand. Auf 100 ml Gel wurden dann 7 μ l Ethidiumbromid gegeben.

Das Gel wurde in eine Gelkammer mit Gelkammerrechen gegossen und zum Abkühlen gestellt. Zwischenzeitlich wurden die Proben vorbereitet. Hierfür wurde so viel der RNA-Suspension entnommen, dass darin 300 ng RNA enthalten waren. Für die Berechnung der benötigten Menge wurde die vom NanoDrop gemessene RNA-Konzentration verwendet.

Das Gesamtvolumen musste mittels DEPC H₂O auf das größte Probenvolumen gebracht werden, sodass am Ende alle Proben dasselbe Volumen hatten. Dann wurden 5 bis 10 μ l des PCR-Ladepuffers (5X) hinzugefügt.

Nun wurden 1-2 μ l des RNA-Größen-Markers pUC19 in die erste und die fertigen Proben in die folgenden Taschen des abgekühlten 1,5 % Agarosegels pipettiert, welches komplett von TBE umgeben war. Durch das Anlegen einer Gleichspannung von 90 V für 30-40 Minuten erfolgt die Auftrennung der RNA durch Wanderung vom Negativ- zum Positivpol der Spannung.

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei von der Größe der RNA-Abschnitte ab, sodass es zu einer Auftrennung nach der Größe kam. Der Größenmarker diente hierbei als Referenz.

Abschließend erfolgte eine Fotodokumentation mittels Gel-Doc. Hierbei wird durch Ultraviolettstrahlung das in die RNA-Interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Westhrin, Xie, *et al.* 2015; Cohen, Zaleski, *et al.* 2011).

2.18 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Tabellen und Tabellenkalkulationen wurden mittels Microsoft Excel beziehungsweise Open Office Calculate Version 3.2 erstellt. Sowohl die Aufbereitung der Erhobenen Daten als auch die statistische Auswertung erfolgte in Absprache mit dem Betreuer der Arbeit Herrn Professor van Griensven.

Die Statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaStat (Systat Software GmbH, Version 4.0). Hierfür wurden ausschließlich Rohdaten verwendet. Lediglich bei der AB-Färbung wurden die Messwerte zusätzlich zu den Absolut-Messwerten noch als Prozentwerte, mit den Messwerten von Tag 1 als 100 % ausgewertet. Dies wurde gemacht, um eine bessere Vergleichbarkeit der Abnahme der Viabilität über die Zeit bei einem unterschiedlichen Viabilitätsausgangsniveau an Tag 1 zu erreichen. Die grundsätzliche Auswertung der Daten aus der AB-Färbung, der AP-Aktivitätsmessung, sowie der ARS erfolgte nach demselben Prinzip. In einem ersten Schritt wurde Innerhalb einer Zelllinie Tag 1 mit 21 verglichen, anschließend wurden alle Tage einer Zelllinie untereinander verglichen. Im nächsten Schritt wurden immer zwei Zellarten an Tag 21 miteinander verglichen und in einem letzten Schritt wurden alle Zellarten auf einmal an einem Tag untereinander verglichen.

Bei der statistischen Auswertung wurde hierbei zunächst ein Test auf Normalverteilung durchgeführt, das hierbei angenommene P beträgt $< 0,05$. Lag Normalverteilung vor wurde anschließend ein Test auf gleiche Varianz (Equal Varianz Test) durchgeführt. Der P-Wert wurde wiederum mit $< 0,05$ festgesetzt.

Im Folgenden wurde zwischen dem Vergleich von zwei Gruppen und dem Vergleich mehrerer Gruppen unterschieden.

Beim Vergleich von lediglich zwei Gruppen und dem Vorliegen von Normalverteilung sowie dem anschließenden Bestehen des Equal Variance Test wurde ein Student's t-Test durchgeführt.

Wurden zwei Gruppen verglichen bei denen Normalverteilung vorlag und gleichzeitig jedoch der Equal Variance Test nicht bestanden, so erfolgte ein Mann-Whitney U-Test kombiniert mit einem Rank Sum Test.

Lag beim Vergleich von zwei Gruppen keine Normalverteilung vor so erfolgte sofort ein Mann-Whitney U-Test kombiniert mit einem Rank Sum Test.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen und dem Vorliegen von Normalverteilung erfolgte die Varianzanalyse mittels Equal Variance Test.

Lag keine Normalverteilung vor so erfolgte eine Varianzanalyse nach Kruskal Wallis.

Um die Gruppen zu identifizieren, die von den anderen abweichen, wurde anschließend ein paarweiser multipler Vergleichstest entweder nach Student-Newman-Keuls - bei großen n-Zahlen - oder nach Dunn - bei kleinen n-Zahlen - durchgeführt.

Die Angabe der Messwerte erfolgt als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung, falls Normalverteilung vorlag, ansonsten als Median mit Q25 und Q75.

3 ERGEBNISSE

3.1 LM GESTÜTZTE BILDANALYSE

In diesem Abschnitt wird exemplarisch, anhand einer repräsentativen Spenderzelllinie, für jede Zellart der LM Befund dargestellt. Dies soll einen Eindruck für die jeweilige Zellart und ihre Beads vermitteln. Bei den Osteoblasten erreichten 5 Spenderzelllinien Tag 21, bei den BMSC waren es 4 und bei den AdMSC 6. In den beiden Kontrollgruppen mit MSC- bzw. Osteoblastendifferenzierungsmedium waren es jeweils 3 Kulturlinien.

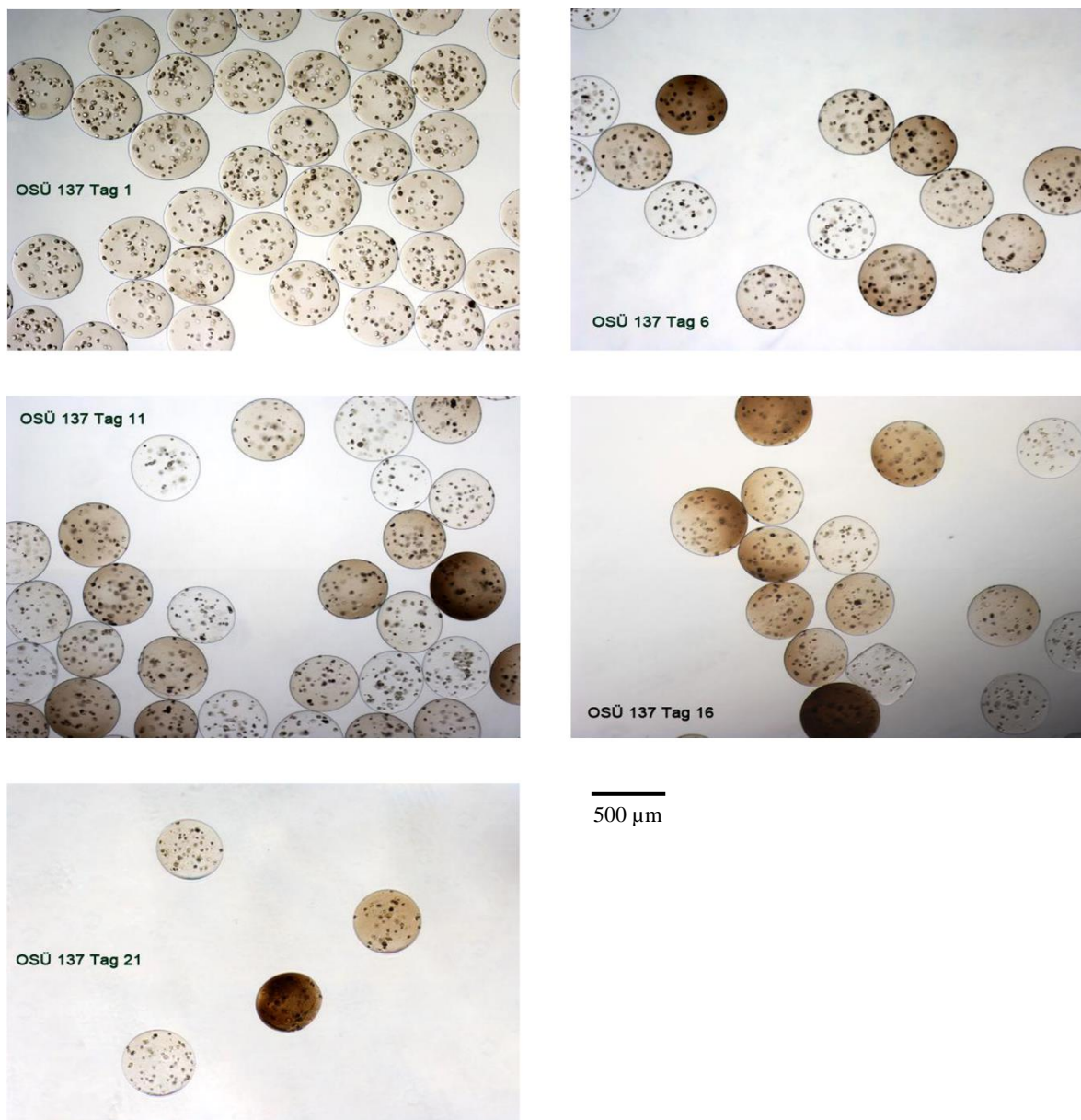


Abbildung 21: LM Aufnahmen der Osteoblasten an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21

3.1.1 Osteoblasten

Abbildung 21 zeigt den LM Befund der Osteoblasten – in diesem Fall OSÜ des Spenders Nummer 137 – in Alginatbeads. Die Beads haben eine relativ gleichmäßige Größe und homogene Verteilung der Zellen, insbesondere innerhalb der Beads. Es macht den Eindruck als wären etwas weniger Zellen in den Beads enthalten als bei den anderen beiden Zelltypen. Bereits an Tag 6 beginnen sich einige Beads braun zu verfärben. Dieses ist ein Zeichen für die beginnende Mineralisation. Bis Tag 16 kommen zahlreiche dunkelbraune Beads hinzu. Sie werden jedoch selbst bis Tag 21 nicht so ausgeprägt schwarz-braun wie bei den anderen beiden Zellarten. Auch bleiben zahlreiche weiße Beads übrig.

3.1.2 Knochenmarkstammzellen

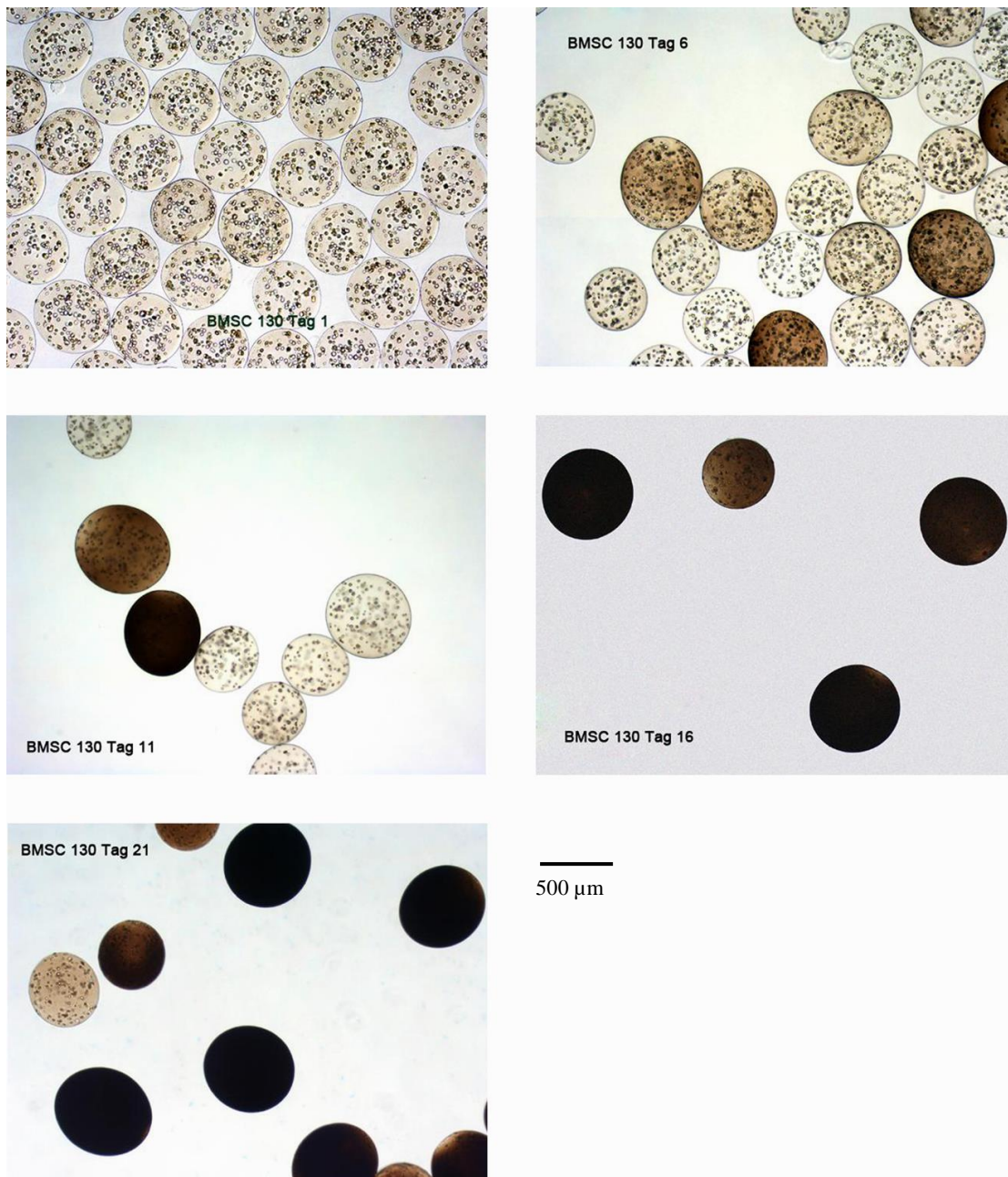


Abbildung 22: LM Aufnahmen der Knochenmarkstammzellen an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21

Bei den in Abbildung 22 gezeigten BMSC ist die Größe der Beads unterschiedlicher als bei den anderen hier exemplarisch gezeigten Zellen in Beads. In den Beads sieht man viele Zellen. An Tag 6 beginnen die Beads auch hier bereits sich dunkelbraun zu verfärben. An Tag 11 gibt es neben noch komplett weißen, unmineralisierten Beads, auch bereits fast schwarze Beads. An Tag 21 sind dann annähernd alle Beads dunkelbraun bis schwarz verfärbt. Nur einzelne Beads bleiben unmineralisiert.

3.1.3 Fettgewebstammzellen

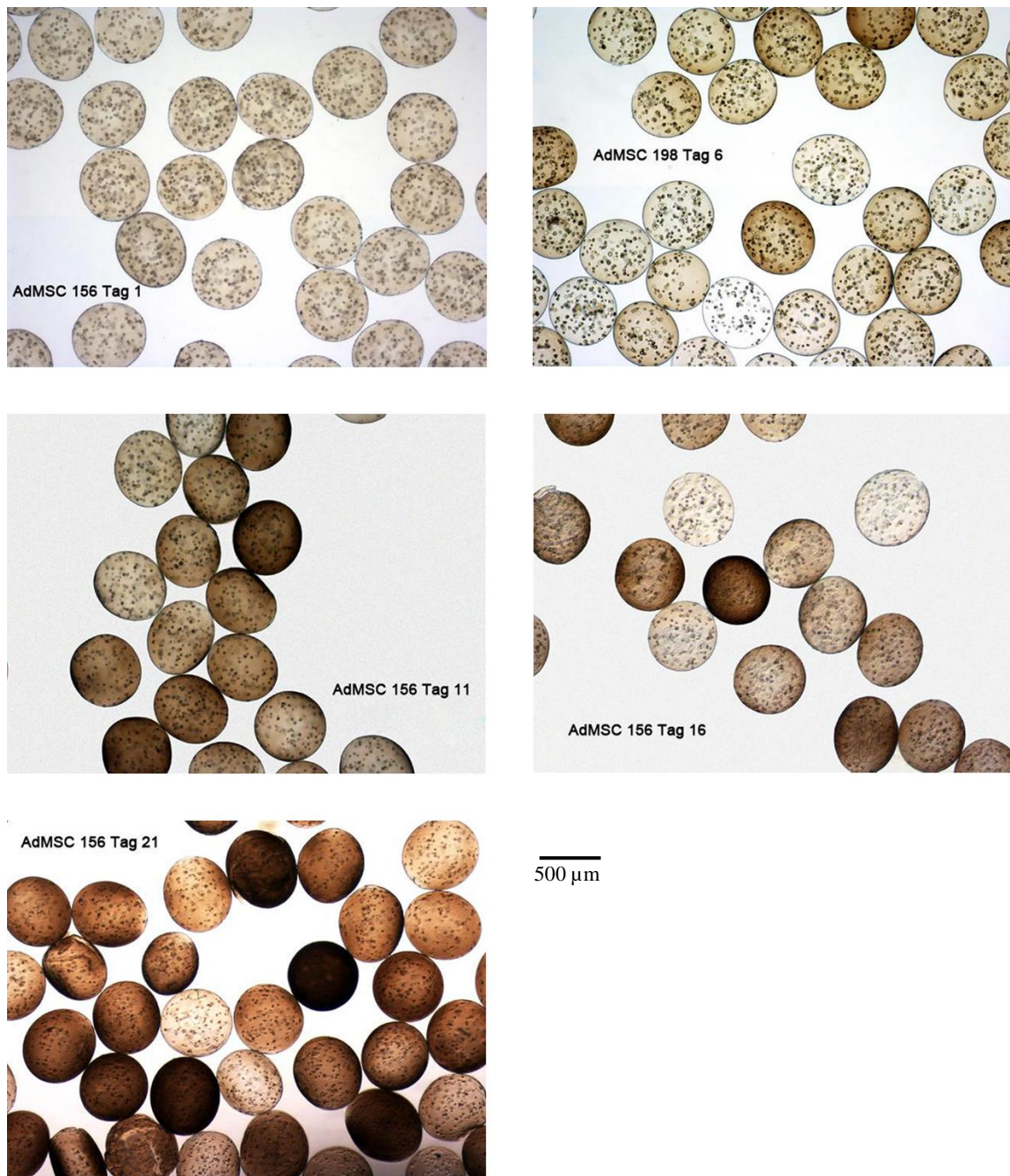


Abbildung 23: LM Aufnahmen der Fettgewebstammzellen an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21

Abbildung 23 zeigt die aus Fettgewebe gewonnenen SC in ihren Alginatebeads. Die Beads mit AdMSC sind gleichmäßig groß, allerdings zum Teil nicht rund, sondern leicht oval. Auch hier verfärben sich die Beads bereits ab Tag 6 deutlich. An Tag 21 sind schließlich ebenso wie bei den BMSC annähernd alle Beads deutlich verfärbt, wenn auch nicht so tief schwarz wie bei den BMSC. Außerdem fallen bei einigen Beads Risse auf der Oberfläche auf.

3.1.4 Leere Beads in MSC-Differenzierungsmedium

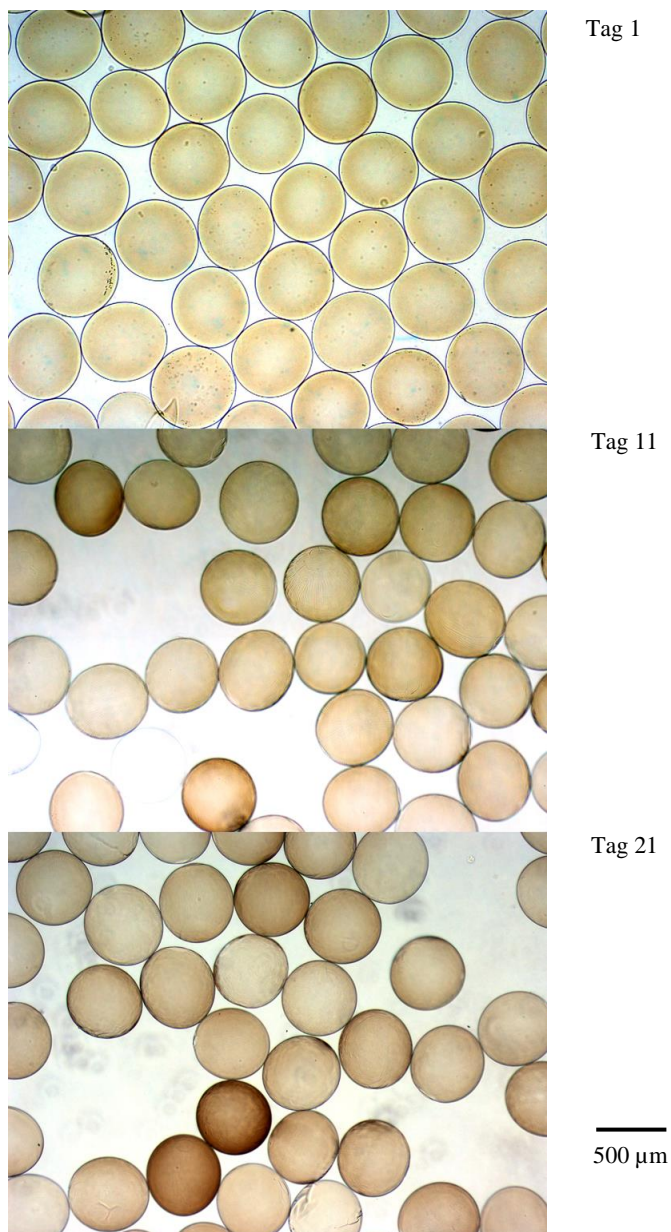


Abbildung 24: LM Aufnahmen der leeren Beads in MSC-Differenzierungsmedium an den Tagen 1, 11 und 21, von oben nach unten.

Abbildung 24 zeigt zum Vergleich die Alginatebeads ohne Zellen. Die Beads sind gleichmäßig groß und recht einheitlich rund. Die Beads wirken bereits direkt nach dem Einkapseln leicht gelblich verfärbt. Dieses war bei den Beads mit Zellen deutlich weniger ausgeprägt. An Tag 11 wirken einige Beads stärker braun gefärbt als die anderen. Dieses spricht für eine zunehmende Mineralisation. Die Verfärbung ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den Beads, die Zellen enthalten. Bis Tag 21 sind einige Beads nochmals geringfügig stärker mineralisiert als die anderen, jedoch ist die Verfärbung deutlich geringer ausgeprägt als bei den Beads mit Zellen an Tag 21.

3.2 LIVE-DEAD-FÄRBUNG

In diesem Abschnitt wird exemplarisch, anhand einer repräsentativen Spenderzelllinie, für jede Zellart der Befund des Live-Dead-Färbung anhand des LM-Bildes sowie des Live-Dead-Overlays dargestellt. Dies soll einen Eindruck für die jeweilige Zellart und ihre Beads vermitteln. Bei den Osteoblasten erreichten 5 Spenderzelllinien Tag 20, bei den BMSC waren es 4 und bei den AdMSC 6.

3.2.1 OSÜ

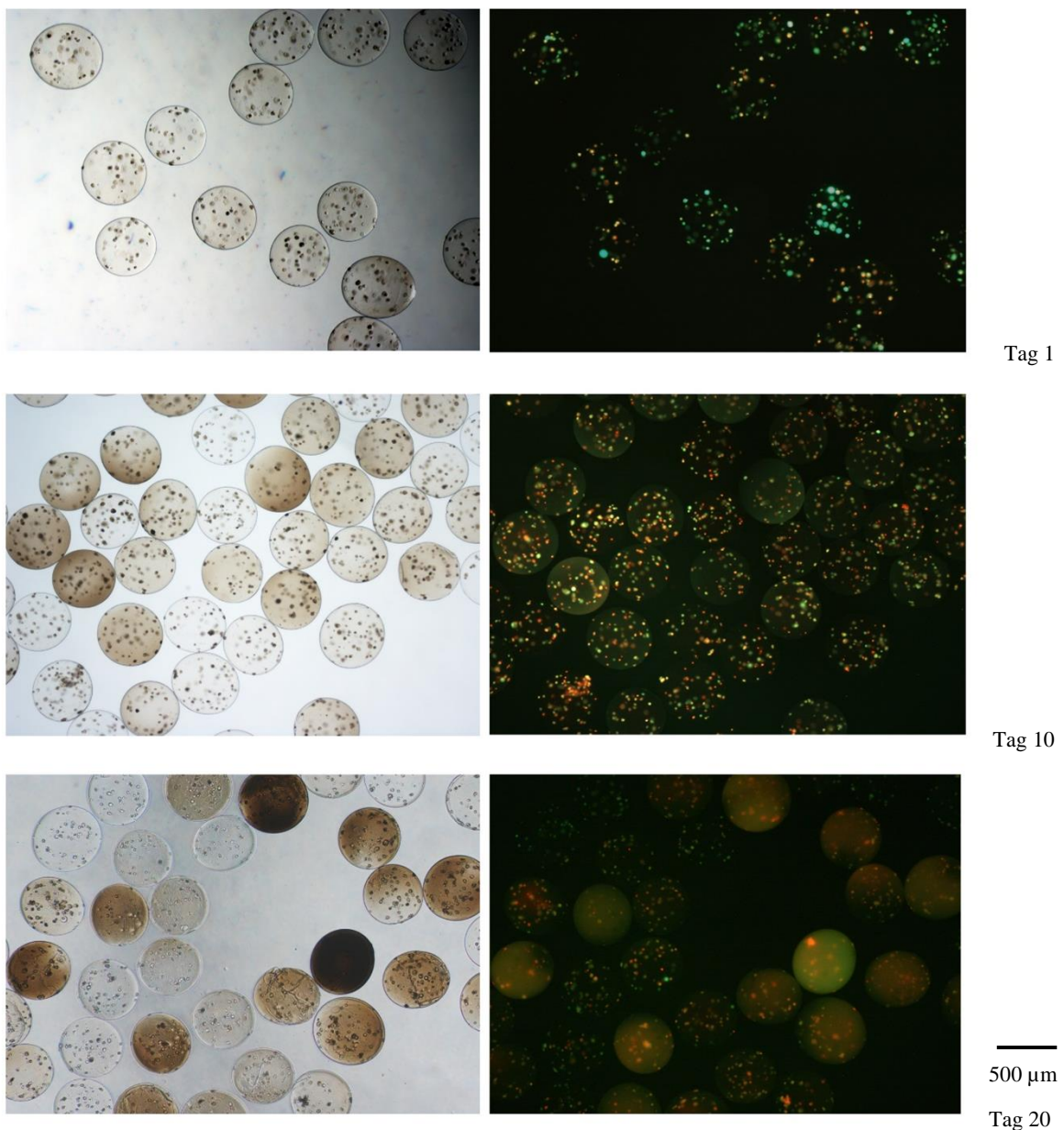


Abbildung 25: OSÜ, von oben nach unten Tag 1, Tag 10 und Tag 20. Links die repräsentativen lichtmikroskopischen Aufnahmen, rechts das jeweils zugehörige Live-Dead-Overlay

In den LM Aufnahmen (Abbildung 25) zeigt sich das bereits unter dem Punkt LM beschriebene Phänomen. Selbst an Tag 20 finden sich zahlreiche klare, unmineralisierte Beads. Lediglich die Hälfte der sichtbaren Beads zeigt deutliche Zeichen der Mineralisation und nur einige wenige dunkel schwarz-braun mineralisierte Beads sind zu sehen. Betrachtet man die Live-Dead-Färbungen, lassen sich an Tag 1 die Zellen einzeln abgrenzen und es finden sich noch zahlreiche rein grün anfärbende und somit als vital anzusehende Zellen. Wobei zu bemerken ist, dass die Färbung bereits an Tag 1 für Live schwächer wirkt als bei den BMSC und AdMSC und sich auch zahlreiche klar rot gefärbte und somit tote Zellen finden. Bereits an Tag 10 gewinnt man den Eindruck, dass sich grün (lebend) und rot (tot) gefärbte Zellen die Waage halten. In der Überlagerung rot-grün erscheinen zahlreiche Zellen als orange. Dies bedeutet, dass sie beide Färbungen aufgenommen haben. Sucht man an Tag 10 die Beads in der Live-Dead-Färbung, die auf dem lichtmikroskopischen Bild die stärkste Mineralisation zeigen, fällt auf, dass sich diese Beads komplett anfärben. Dieses Verhalten der Beads verstärkt sich mit dem Grad ihrer Mineralisation; dieses wird besonders auffällig an Tag 20. Die lichtmikroskopisch dunkelbraun bis schwarz mineralisierten Beads nehmen in ihrer Matrix sowohl die Live- als auch die Deadfärbelösung an und erscheinen in der Überlagerung orange.

3.2.2 BMSC

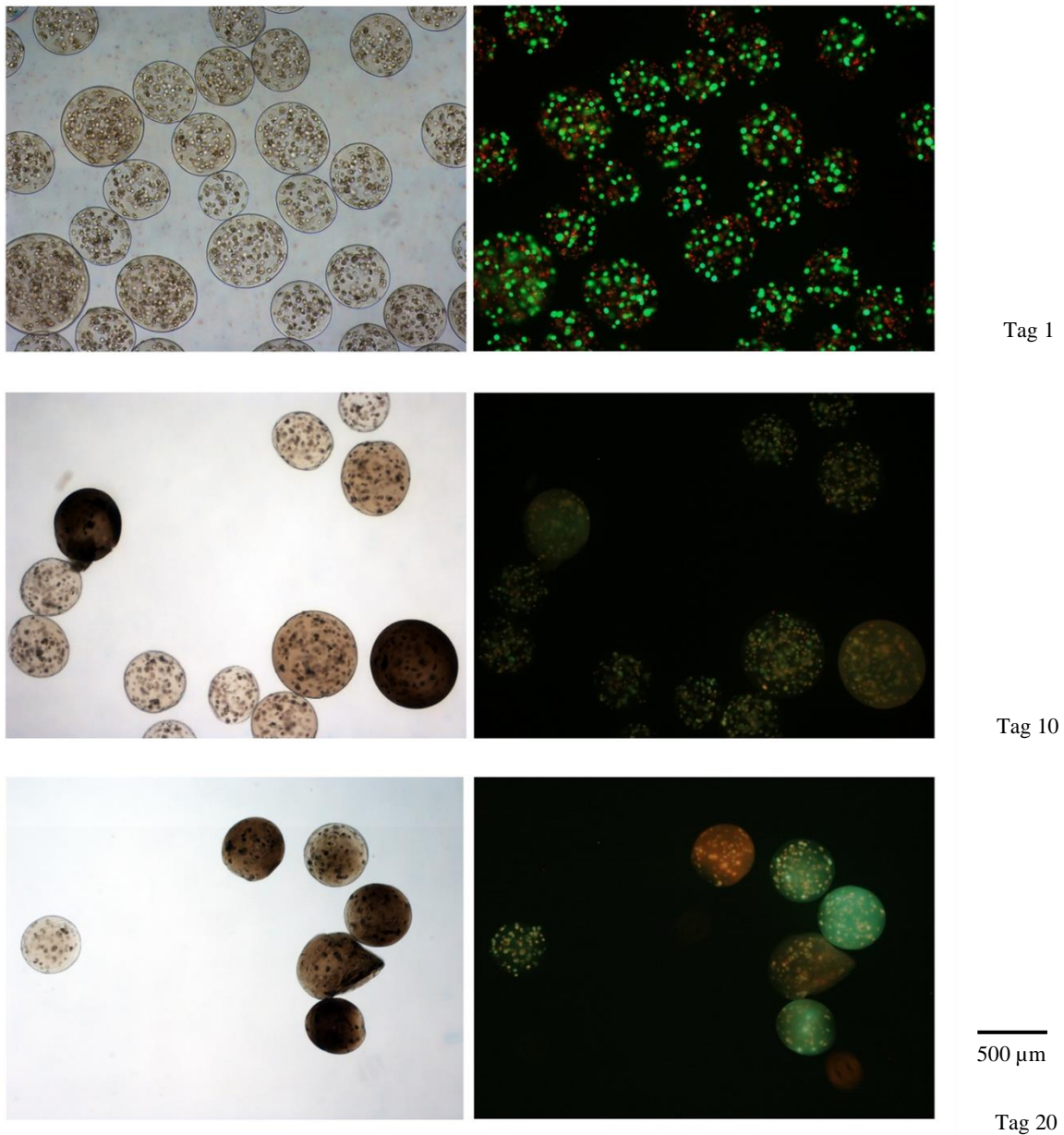


Abbildung 26: BMSC, von oben nach unten Tag 1, Tag 10 und Tag 20. Links die lichtmikroskopischen Aufnahmen, rechts das jeweils zugehörige Live-Dead-Overlay

Betrachtet man Abbildung 26, so zeigen sich vor allem an Tag 1 zahlreiche einzeln dick dunkelgrün leuchtende und somit lebende Zellen in den Beads. Rot gefärbte, tote Zellen finden sich kaum; es zeigen sich jedoch viele kleine rote Pünktchen in den Beads. An Tag 10 finden sich in der Lichtmikroskopischen Aufnahme erste stark mineralisierte dunkelbraun-schwarze Beads. Parallel dazu lassen sich die Beads schlechter für die Live-Dead-Aufnahmen färben, da sie, scheinbar wie auch bereits bei den OSÜ, mit steigendem Mineralisationsgrad auch vermehrt die Färbelösungen in die Beadmatrix einlagern. Bei gleicher Durchführung der Färbung färben sich nicht mehr einzelne Zellen, sondern die

kompletten Beads. Dies verstärkt sich noch weiter bis zu Tag 20, wo eine mit zunehmendem Mineralisationsgrad gleichzeitige zunehmende Färbung der ganzen Beads auftritt. Anders als bei den OSÜ erscheinen die Beads hier jedoch nicht vor allem orange (aus der Überlagerung rot-grün), sondern färben sich entweder überwiegend grün oder rot. Bereits ab Tag 10 lässt sich zu den einzelnen Zellen nur noch schwer eine Aussage treffen.

3.2.3 AdMSC

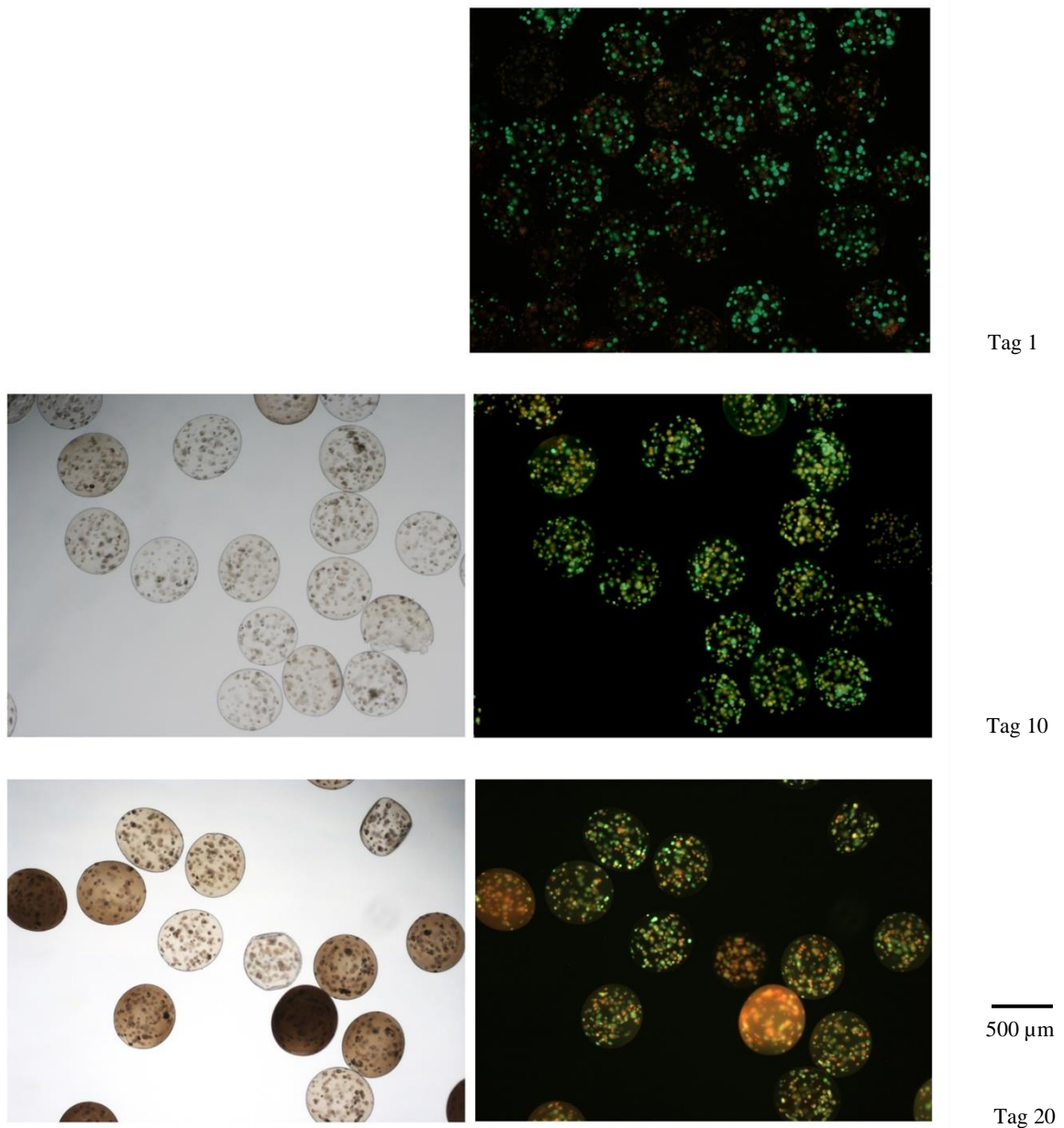


Abbildung 27: AdMSC, von oben nach unten Tag 1, Tag 10 und Tag 20. Links die lichtmikroskopischen repräsentativen Aufnahmen, rechts das jeweils zugehörige Live-Dead-Overlay

Abbildung 27 zeigt an Tag 1 bei den AdMSC zahlreiche einzeln dick dunkelgrün leuchtende und somit lebende Zellen in den Beads. Rot gefärbte, tote Zellen finden sich kaum und treten gegenüber den lebenden Zellen deutlich in den Hintergrund.

An Tag 10 finden sich in der LM Aufnahme erste leicht mineralisierte, hellbraune Beads. In der Live-Dead-Färbung ist das Bild annähernd unverändert mit weiterhin sehr vielen grün leuchtenden, lebenden Zellen. Einige Zellen erscheinen bei Überlagerung von roter

(Dead) und grüner (Live) Fluoreszenz orange. Sie lassen sich somit weder als eindeutig am Leben noch als bereits gänzlich abgestorben klassifizieren.

An Tag 20 zeigen sich jetzt mehrere komplett dunkelbraun bis schwarz verfärbte, gut mineralisierte Beads. Einige Beads sind jedoch weiterhin - verglichen zu Tag 10 - komplett unverändert und nicht mineralisiert. Dazwischen findet sich der Großteil der Beads in Hellbraun, gleichmäßig mineralisiert. Bei gleicher Durchführung der Live-Dead-Färbung färben sich nicht mehr einzelne Zellen, sondern die kompletten Beads. Dieses Phänomen wurde auch bei den anderen Beads mit Zellen beobachtet, wo mit zunehmendem Mineralisationsgrad gleichzeitige eine zunehmende Färbung der ganzen Beads auftrat. Ebenso wie bei den OSÜ erscheinen die Beads bei den AdMSC vor allem orange (aus der Überlagerung rot-grün) und färben sich nicht wie bei den BMSC entweder überwiegend grün oder rot.

3.3 ALAMAR-BLAU-MESSUNG

Die AB-Messung dient der Quantifizierung der Viabilität der Zellen. Hohe Messwerte bedeuten hierbei ein hohes Maß an Viabilität. Hierbei galt für die Osteoblasten N = 5 Spender, für die BMSC N = 4 Spender und für die AdMSC N = 6 Spender. Pro Spender und Tag, an dem die Messung durchgeführt wurde, erfolgten jeweils 3 Messungen. Hieraus ergibt sich die Gesamtzahl der durchgeführten Messungen. Betrachtet werden zunächst die absolut-Messwerte. In einem zweiten Schritt werden dann die relativen Messwerte in Prozent des Ausgangsmesswertes betrachtet.

Die absoluten Messwerte an Tag 1 zeigen, dass das Viabilitäts-Ausgangsniveau der Zellen für alle drei Zellarten recht unterschiedlich ist. So liegen die BMSC und AdMSC mit medianen Werten von 18,17 (Q25 = 13,46; Q75 = 27,85) für BMSC und 15,16 (Q25 = 9,47; Q75 = 23,11) für AdMSC sehr nah zusammen (kein statistisch signifikanter Unterschied bei $P > 0,671$). Die OSÜ haben hingegen lediglich einen medianen Ausgangswert von 7,07 (Q25 = 5,86; Q75 = 12,75). Somit unterscheiden sich die OSÜs statistisch signifikant in ihrer Ausgangsviabilität sowohl von den BMSC als auch von den AdMSC ($P = 0,005$ bzw. $P < 0,001$).

Von Tag 1 bis Tag 21 zeigt sich für alle Zelltypen bei den Absolutwerten ein weiterer Rückgang der AB-Messwerte. Wie stark dieser ist unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellart. Beim Vergleich der Zellarten untereinander an

Tag 21 ergibt sich jeweils statistische Signifikanz für die Unterschiede zwischen allen Zellarten.

Die Zelllinie mit den mit Abstand höchsten Viabilitätswerten ist die BMSC-Linie. Die zweithöchsten Werte liefern die AdMSC. Auf sie folgen mit sehr niedrigen Viabilitätswerten die OSÜ.

Vergleicht man nun Tag 1 und Tag 21 der jeweiligen Zellart miteinander, zeigt sich für die BMSC lediglich ein so geringer Rückgang des Viabilitätsniveaus, dass für ihn keine statistische Signifikanz erreicht wird ($P = 0,371$), bei einem medianen Wert von 12,69 ($Q25 = 5,81$; $Q75 = 20,12$) an Tag 21. Bei den OSÜ mit einem medianen Wert von 0,14 ($Q25 = -1,68$; $Q75 = 2,11$) an Tag 21 und den AdMSC mit einem medianen Wert von 4,00 ($Q25 = 1,26$; $Q75 = 9,04$) an Tag 21 ist die Abnahme jedoch statistisch signifikant (P jeweils $\leq 0,001$).

In Prozentzahlen ergibt sich dasselbe Bild. Die BMSC zeigen an Tag 21 noch 66,37 % ($Q25 = 46,45$ %; $Q75 = 146,58$ %) ihrer ursprünglichen Viabilität, was jedoch keinem statistisch signifikanten Unterschied zum Ausgangswert von Tag 1 (100 %) entspricht ($P = 0,485$). Die AdMSC haben noch 22,68 % ($Q25 = 15,60$ %; $Q75 = 45,01$ %) ihrer Ausgangsviabilität und die OSÜ gerade einmal noch 2,52 % ($Q25 = -25,54$ %; $Q75 = 24,82$ %) ihrer Ausgangsviabilität, was jeweils einem statistisch signifikanten Rückgang entspricht (P jeweils $\leq 0,001$).

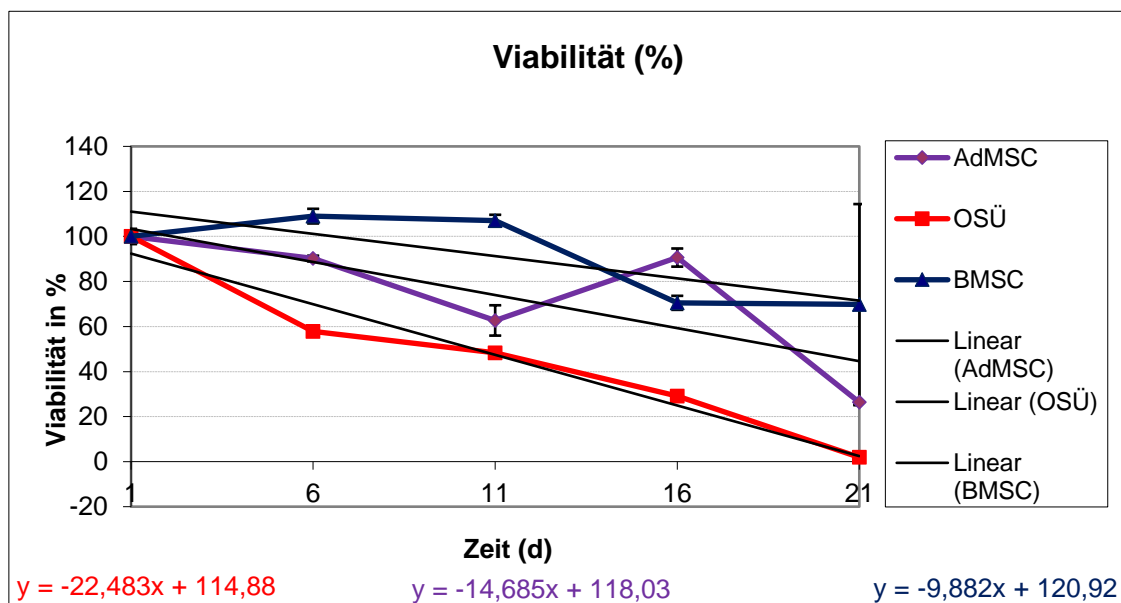


Abbildung 28: Alamar-Blau-Messwerte; AdMSC entsprechen hierbei den Fettstammzellen, OSÜ den Osteoblasten und BMSC den Knochenmarkstammzellen. Nach rechts aufgetragen ist jeweils der zeitliche Verlauf in Tagen (d) erkennbar, nach oben die Viabilität in %. Für die Osteoblasten gilt $N = 5$ Spender, für die BMSC gilt $N = 4$ Spender und für die AdMSC gilt $N = 6$ Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.

Anders als bei den Absolutwerten ergibt sich nun bei den Prozentwerten für Tag 21 zwar noch ein statistisch signifikant höherer Wert für die BMSC im Vergleich zu AdMSC ($P = 0,010$) und OSÜ ($P = 0,003$), jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen AdMSC und OSÜ ($P = 0,054$).

Abbildung 28 zeigt graphisch den Verlauf der AB-Messwerte. Hierbei wird deutlich, dass alle Zellarten einer klaren Abnahme ihrer Werte unterliegen. Dies zeigt sich auch in der Negativität der Gleichungen ihrer Trendliniengeraden. Besonders stark ausgeprägt ist diese Abnahme bei der Gruppe der Osteoblasten. Wobei hier die Messwerte am konstantesten abnehmen, wohingegen sie sowohl bei den AdMSC als auch bei den BMSC deutlichen Schwankungen unterliegen. Auffällig ist auch der stark abweichende Mediane-Wert für die AdMSC an Tag 16.

In der Gesamtheit betrachtet sieht man, dass alle Zellarten bezogen auf den Ausgangswert deutlich an Viabilität verlieren. Besonders drastisch ist diese Abnahme bei den OSÜ; AdMSC und vor allem BMSC halten sich deutlich besser.

3.4 ALKALISCHE PHOSPHATASE AKTIVITÄTSMESSUNG

Die Messung der Aktivität der AP gibt Rückschlüsse darauf wie hoch die Differenzierungsaktivität der Zellen ist. Hierbei galt für die Osteoblasten $N = 5$ Spender, für die BMSC $N = 4$ Spender und für die AdMSC $N = 6$ Spender. Pro Spender und Tag, an dem die Messung durchgeführt wurde, erfolgten jeweils 3 Messungen. Hieraus ergibt sich die Gesamtzahl der durchgeführten Messungen. Mittels den pro Messung verwendeten Beads und der Inkubationszeit war in einen Substratumsatz in $\mu\text{M}/\text{pro Bead und Minute}$ umgerechnet worden um vergleichbare Werte zu haben. Für alle drei Zelltypen werden hierbei die höchsten Werte an Tag 1 gemessen. Den höchsten medianen Wert erreichen dabei mit $0,06 \mu\text{M}$ ($Q25 = 0,00 \mu\text{M}$; $Q75 = 0,16 \mu\text{M}$) die BMSC, gefolgt von den AdMSC mit $0,02 \mu\text{M}$ ($Q25 = 0,01 \mu\text{M}$; $Q75 = 0,14 \mu\text{M}$) und den OSÜ mit ebenfalls $0,02 \mu\text{M}$ ($Q25 = 0,00 \mu\text{M}$; $Q75 = 0,05 \mu\text{M}$). Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant ($P = 0,175$, $P = 0,779$, $P = 0,379$)

Im Zeitverlauf kommt es zu einer Abnahme der AP-Aktivität. Hierbei liegt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den BMSC und den OSÜ sowie den AdMSC und OSÜ beim Vergleich der Werte für Tag 6, vor ($P = 0,038$ und $P = 0,031$).

Bis Tag 21 nähern sich die Messwerte für alle drei Zellarten symptotisch an Null an. Bei den Osteoblasten kommt es bereits im Zeitraum von Tag 1-6 zu einer statistisch signifikanten Abnahme der AP-Aktivität ($P = 0,043$). Im Vergleich Tag 1 mit 21 ist der Rückgang in den AP-Messwerten dann bei allen drei Zelltypen statistisch signifikant ($P = 0,002$, $P = 0,008$, $P \leq 0,001$).

Betrachtet man Abbildung 29 wird klar ersichtlich, dass alle drei Zelltypen bei verhältnismäßig hohen Werten beginnen und dann zügig gegen 0 streben. Hierbei sind die Werte sowie die Verläufe von Osteoblasten und AdMSC sehr ähnlich. Die Abnahme der Messwerte findet bei den BMSC ebenfalls statt; da sie allerdings mit einem viel höheren Ausgangswert an Tag 1 beginnen, sind bei ihnen die Messwerte auch an Tag 6 noch höher als bei den anderen beiden Zelltypen an Tag 1.

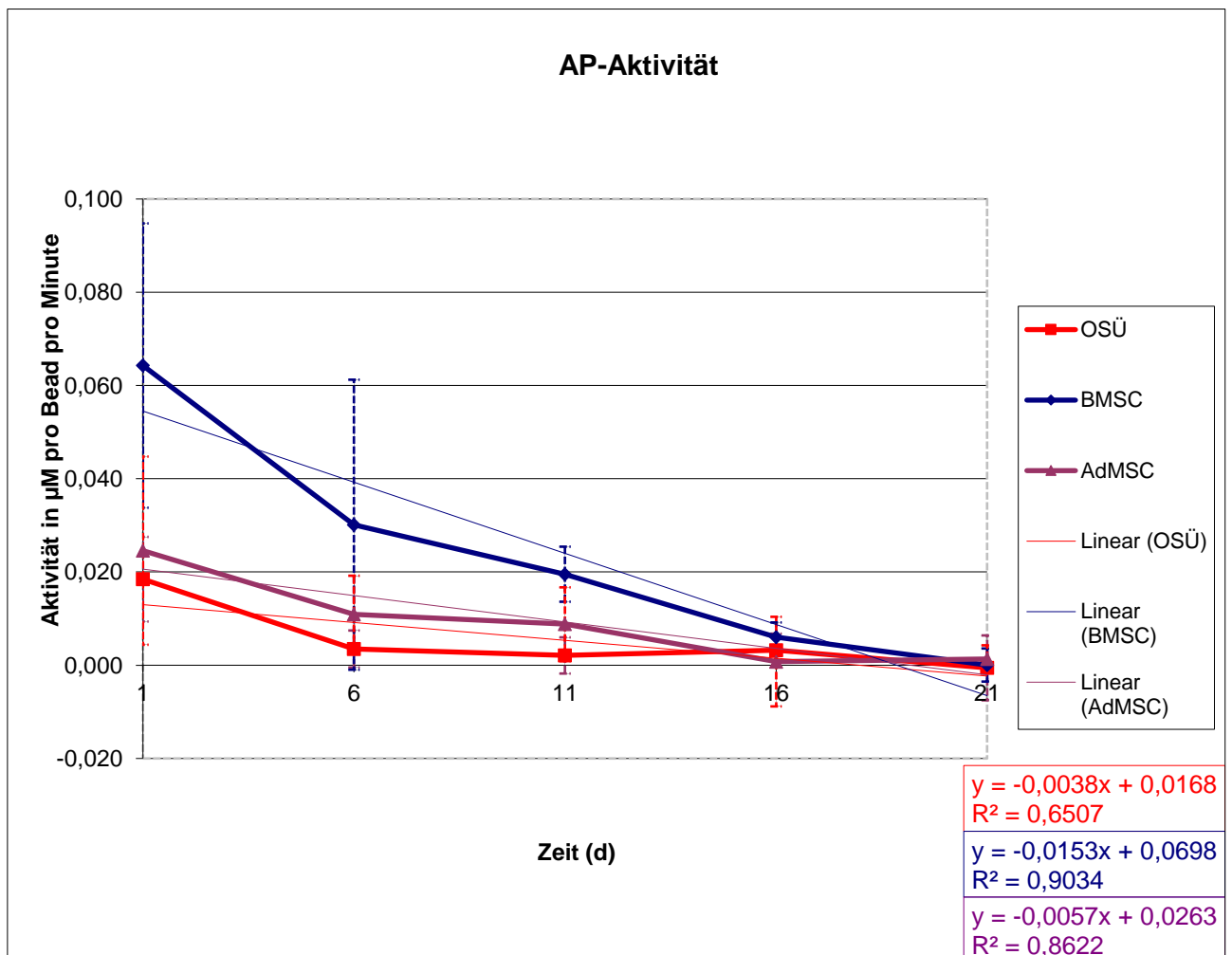


Abbildung 29: Graphische Darstellung der AP-Aktivität im Zeitverlauf. Nach rechts ist hierbei die Zeit und nach oben die Aktivität in μM aufgetragen. OSÜ entsprechen den Osteoblasten, BMSC den Knochenmarkstammzellen und AdMSC den Fettstammzellen. Für die Osteoblasten gilt $N = 5$ Spender, für die BMSC gilt $N = 4$ Spender und für die AdMSC gilt $N = 6$ Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.

Wobei bis Tag 16 alle drei Zellarten bereits in einem Wertebereich von 0 bis $0,01 \mu\text{M}$ pro Bead pro Minute angekommen sind. Hieraus ergibt sich für die BMSC die größte Steilheit für die Ausgleichsgerade mit $-0,02$. Bei den anderen beiden Zellarten beträgt die Steilheit der Ausgleichsgeraden $-0,01$ und weniger. Dies bedeutet für die BMSC die schnellste Abnahme der AP-Aktivität, aber von den mit Abstand höchsten Werten ausgehend. Ungewöhnlich ist, dass nicht primär ein Anstieg der AP-Aktivität erfolgt, sondern Tag 1 bereits das Maximum darstellt.

3.5 ALIZARIN-ROT-FÄRBUNG

Die Ergebnisse der ARS werden in Abbildung 30 dargestellt. Hierbei galt für die Osteoblasten $N = 5$ Spender, für die BMSC $N = 4$ Spender und für die AdMSC $N = 6$ Spender. Pro Spender und Tag, an dem die Messung durchgeführt wurde, erfolgten jeweils 3 Messungen. Hieraus ergibt sich die Gesamtzahl der durchgeführten Messungen.

Bei der ARS zeigen alle Zelltypen beim Vergleich der Werte für Tag 1 mit den Werten für Tag 21 eine statistisch signifikante Zunahme ($P = 0,027$, $P = 0,001$ und $P = 0,004$).

Die Kontrollgruppen, die aus Beads ohne eingekapselte Zellen - zum einen in MSC-Medium und zum anderen in Osteoblastenmedium - bestehen, zeigen hingegen keine statistisch signifikante Zunahme ($P = 0,930$ und $P = 0,596$).

Vergleicht man wiederum die drei Zelltypen an Tag 21 untereinander, liefern sie hier keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P = 0,085$, $P = 0,772$, $P = 0,228$). Wobei Osteoblasten mit im Mittel $5,30 \mu\text{M} \pm 3,24 \mu\text{M}$ und BMSC mit $5,34 \mu\text{M} \pm 2,26 \mu\text{M}$ nahezu identische Werte liefern und AdMSC mit $3,91 \mu\text{M} \pm 1,90 \mu\text{M}$ etwas geringere. Beim Vergleich der AdMSC, BMSC und Osteoblasten an Tag 21 mit den Kontrollen fällt auf, dass lediglich die BMSC statistisch signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe mit Osteoblastenmedium (ControlOST) ($P = 0,015$) und die Kontrollgruppe mit Stammzellmedium (ControlMSC) liefern ($P = 0,002$). AdMSC und Osteoblasten liefern statistisch signifikant höhere Werte als die ControlMSC ($P = 0,009$ und $P = 0,003$). Hierbei ist zu beachten, dass die AdMSC an Tag 21 einen Mittelwert von $3,91 \mu\text{M} \pm 1,90 \mu\text{M}$ liefern und die ControlOST von $3,19 \mu\text{M} \pm 0,98 \mu\text{M}$. Vergleicht man ControlOST und ControlMSC miteinander, so zeigen die Beads in Osteoblastenmedium statistisch signifikant höhere Werte ($P = 0,003$).

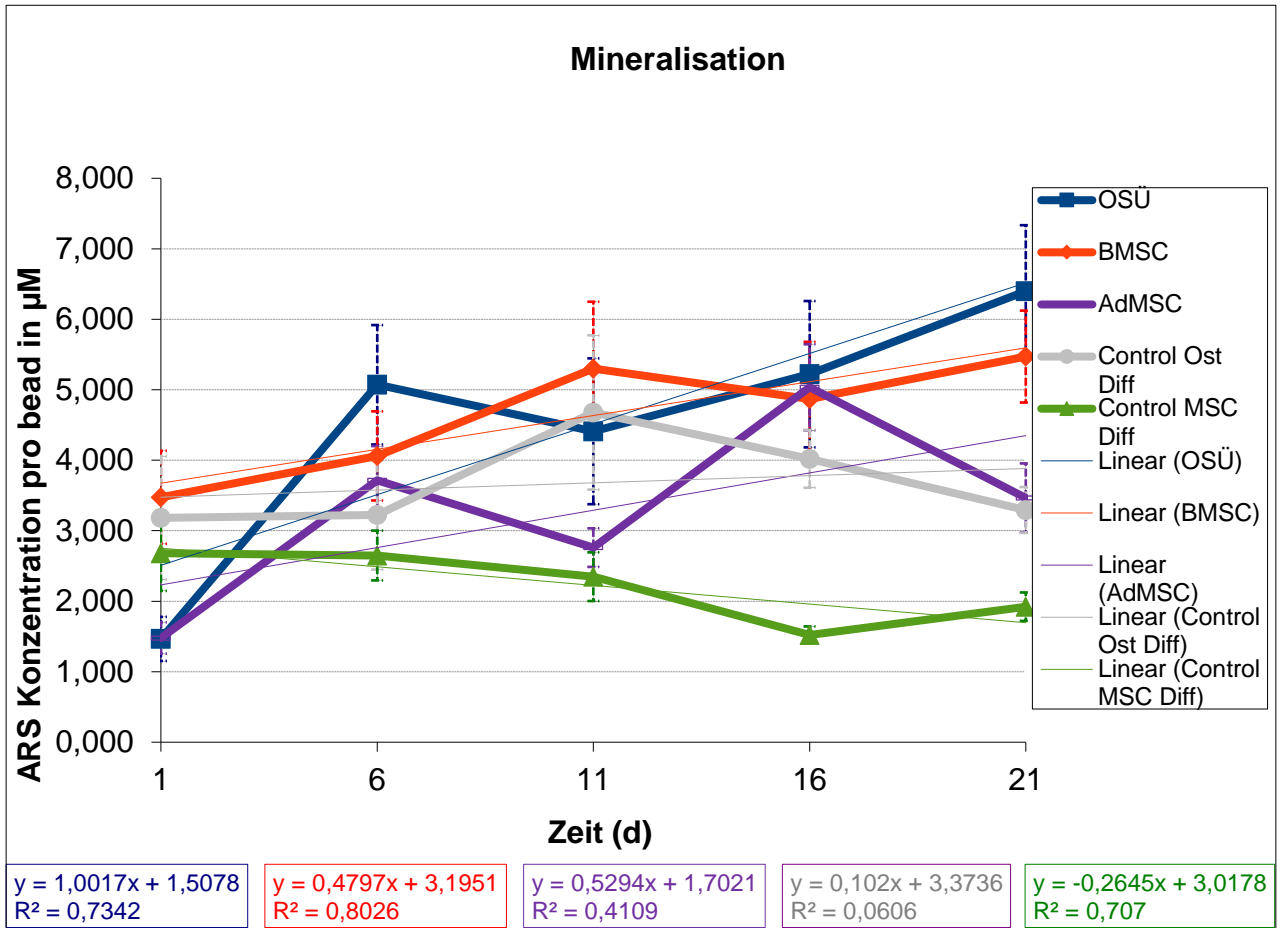


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Mineralisation. Nach rechts ist hierbei die Zeit und nach oben die Alizarin-Rot-Konzentration pro Bead in μM aufgetragen. OSÜ entsprechen den Osteoblasten, BMSC den Knochenmarkstammzellen und AdMSC den Fettstammzellen. Für die Osteoblasten gilt $N = 5$ Spender, für die BMSC gilt $N = 4$ Spender und für die AdMSC gilt $N = 6$ Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.

3.6 BILDANALYSE MITTELS MESSUNG DER INTEGRATED DENSITY (INTDEN)

Ergänzend zur ARS wurde exemplarisch, ausgehend von den in der Lichtmikroskopie aufgenommenen Bildern, noch eine Messung der IntDen durchgeführt.

In dieser zeigt sich ein ähnliches Bild wie bereits in der ARS (Abbildung 31). Bei allen drei Zellarten kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Dichte und somit der Mineralisierung. Die BMSC erreichen auch hier den höchsten Mineralisierungsgrad. Anders als bei der ARS ist die Zunahme der IntDen bei den Osteoblasten jedoch nur gering ausgeprägt, dafür bei den AdMSC moderat stärker.

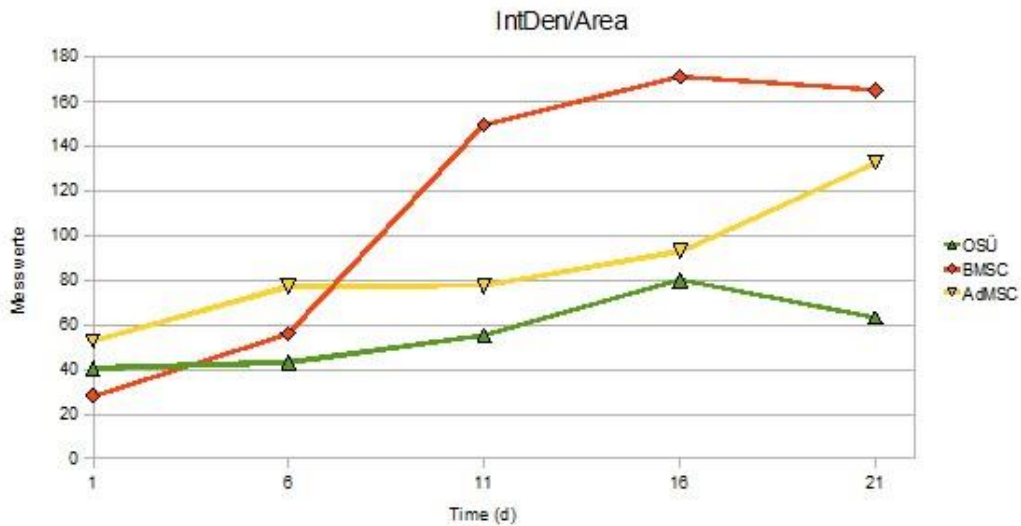


Abbildung 31: Graphische Darstellung der IntDen im Zeitverlauf. Nach rechts sind hierbei die Tage und nach oben der von Image J ausgegebene Messwert für die IntDen aufgetragen. OSÜ entsprechen den Osteoblasten, BMSC den Knochenmarkstammzellen und AdMSC den Fettstammzellen. Für die Osteoblasten gilt $N = 5$ Spender, für die BMSC gilt $N = 4$ Spender und für die AdMSC gilt $N = 6$ Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.

3.7 RNA-ISOLIERUNG

Die Testung der RNA-Proben auf Reinheit und Menge zeigte bei der photometrischen Messung mittels NanoDrop einen 260/280 Quotienten mit Werten um 1. Aus diesem Grund musste davon ausgegangen werden, dass die gewonnene RNA nicht in ausreichender Menge und Reinheit vorlag.

Ein hierzu passendes Ergebnis lieferte auch die Überprüfung der Intaktheit der RNA mittels Agarosegel. In der Fotodokumentation mittels Gel-Doc zeigten sich jeweils keine adäquaten RNA-Banden. Somit konnten keine weiteren Tests mit dieser RNA durchgeführt werden

4 DISKUSSION

Im Rahmen des demographischen Wandels kommt es zu einer zunehmenden Umkehr der Bevölkerungspyramide mit einem größer werdenden Anteil der Älteren. Mit dem Alter steigt jedoch auch die Frakturhäufigkeit, unter anderem wegen erhöhter Sturzgefahr und abnehmender Knochenqualität (Srouji and Livne 2005; Bartl, Stengel, *et al.* 2011). Gleichzeitig kommt es bei alten Patienten aufgrund eines verminderten Regenerationspotentials sowie veränderter Immunantworten des Knochens öfter zu postoperativen Komplikationen mit verzögerter oder mangelhafter Frakturheilung (Vester, Huber-Lang, *et al.* 2014). Dieses führt wiederum, verstärkt durch häufig vorhandene Komorbiditäten, zu erhöhten beziehungsweise verlängerten Hospitalisierungsraten. Durch lange Bettlägerigkeit und eingeschränkte Mobilisierbarkeit steigen das Komplikationsrisiko und somit auch die Letalität sowie die Kosten im Gesundheitswesen noch zusätzlich (Bartl and Bartl 2011; Jakob, Benisch, *et al.* 2011; Reumann, Meder, *et al.* 2019). Die Therapie von Frakturen bei Patienten mit vermindertem Knochenregenerationspotential ist nur eine von zahlreichen klinischen Situationen, in denen es trotz optimaler Therapie aller Komorbiditäten und der Ausschöpfung aller gegenwärtigen Therapieoptionen wünschenswert wäre, gezielt lokal die Knochenneubildung anzuregen oder verbessern zu können (Niethard, Pfeil, *et al.* 2009; Schroeder and Mosheiff 2011).

Eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Gewebe spielen SC. Gerade bei alten Patienten ist jedoch die Stammzellzahl verringert. Dies ist einer der Gründe für das verringerte Regenerationspotential (Jakob, Benisch, *et al.* 2011). Somit ist es ein erfolgversprechender Ansatz, die Menge an SC oder Zellen mit Stammzeleigenschaften künstlich im Frakturspalt zu erhöhen bzw. anzureichern. Goldstandard hierfür ist immer noch das Einbringen autologer Spongiosa oder autologer Knochentransplantate (Randau, Gravius, *et al.* 2014). Darüber hinaus finden Techniken, die ein Einbringen von Knochenmarkaspiraten beinhalten vermehrt Anwendung. Mittels z.B. Reamer-Irrigator-Aspirator-System gewonnene Knochenmarkaspirate zeigen höhere Konzentrationen an Wachstumsfaktoren bei vergleichbaren osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften und verminderter Morbidität im Bereich der Entnahmestelle (Schlickewei, Kleinertz, *et al.* 2019).

Vom Einbringen SZ-reichen autologen Gewebes hin zum TE ist es nur ein vermeintlich kleiner und im Endeffekt logischer sowie konsequenter Schritt, insbesondere, wenn man die Abnahme der SZ-Anzahl sowie der SZ-Qualität im Alter bedenkt. Weite Verbreitung im Rahmen des Tissue-Engineerings von Knochen haben KM-Stromazellen. Diese können gut zu Osteoblasten differenzieren. Bevorzugt werden hierbei vor allem autologe Zellen (Ehnert, J, *et al.* 2011). Da die Anzahl von BMSC im Knochen jedoch gering ist, müssen vergleichsweise große Mengen an gesundem KM entnommen werden, um ausreichend große Mengen an Zellen zu erhalten (Lucarelli, Donati, *et al.* 2004). Dieses ist eine der Hauptlimitationen der Verwendbarkeit von BMSC. Hingegen sind adipozytäre mesenchymale Stromazellen aus Fettgewebe in einer Bevölkerung, in der 67,1 % der Männer und 53,0 % der Frauen übergewichtig sind, also einen Body-Mass-Index von größer 25 haben, leicht verfügbar (Mensink, Schienkiewitz, *et al.* 2013). Dadurch können ausreichend große Mengen an Zellen gewonnen werden, sodass -anders als bei BMSC - oftmals keine *in vitro* Expansion nötig wird (Panetta, Gupta, *et al.* 2009). Hinzu kommt, dass sie ebenso leicht wie BMSC selektiert werden können und bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Kulturprotokoll besseres und schnelleres Wachstum gezeigt haben als die BMSC. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Im *et al.*, die für AdMSC ebenfalls eine höhere *in vitro*-Proliferationsrate als für BMSC gefunden haben (Im, Shin, *et al.* 2005). Gimble *et al.* geben für AdMSC Verdopplungsraten von 2-4 Tagen an (Gimble, Katz, *et al.* 2007), wobei die Verdopplungsraten bei BMSC bei deutlich über 5 Tagen liegen können (Siegel, Kluba, *et al.* 2013). Diese Eigenschaften machen AdMSC im Rahmen des Einsatzes im Knochen-Tissue-Engineering zu der idealen Alternative für BMSC. Eine mögliche Limitation ist jedoch die bereits unter anderem von Ratanavaraporn *et al.* erwähnte schlechtere Differenzierung in Richtung der osteogenen Linie verglichen zu BMSC (Ratanavaraporn, Kanokpanont, *et al.* 2009). Um die Effektivität der AdMSC bezüglich der Anregung der Knochenheilung abschließend zu klären, müsste diese in verschiedenen *in vivo*-Settings überprüft werden. So konnten beispielsweise Akita *et al.* zeigen, dass ein poly-lactic-coglycolic acid Scaffold mit AdMSC *in vivo* die peridontale Regeneration entscheidend verbessern kann (Garzon, Thomsen, *et al.* 2012).

Um Zellen gezielt einsetzen zu können, wird ein geeignetes Scaffold benötigt, mit dem die Zellen an den Zielort gebracht werden können. Das Scaffold muss die Zellen ausreichend lange am gewünschten Ort ‚fixieren‘, aber auch in einem vorhersagbaren Zeitraum und Umfang spontan zerfallen oder vom Körper wieder abgebaut werden. Ein Grundsatz ist hierbei, dass es wünschenswert ist, dass das Scaffold möglichst ähnlich der natürlichen Knochenmatrix sein sollte, die sich durch Stabilität bei hoher Elastizität auszeichnet, was durch die Kombination aus Kollagen und HA erreicht wird. Biomimetisch lässt sich dieses Prinzip durch Kalziumphosphatmineralisation von Alginat realisieren (Wu, Xie, *et al.* 2010). Vorteilhaft ist, dass Alginat bereits in einem breiten Spektrum - von Medizin (Rowley, Madlambayan, *et al.* 1999) bis Lebensmittelindustrie (EU-Kommission 2011)- Verwendung findet und es sich vielfach für das Einkapseln von Zellen (Drury and Mooney 2003) und anderen Stoffen (Rubert, Monjo, *et al.* 2012) bewährt hat. Cardoso *et al.* konnten für ein injizierbares Alginat-Kalzium-Phosphat-Gel *in vivo*, im Kaninchen, einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung zeigen (Cardoso, van den Beucken, *et al.* 2014). Die vorliegende Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Nanoinstitut der „Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet“ (NTNU)-Trondheim. Hierdurch bestand die Möglichkeit auf einen breiten Erfahrungsschatz in der Arbeit mit Alginat zuzugreifen (Xie, Olderoy, *et al.* 2010; Westhrin, Xie, *et al.* 2015). Alginat kann dank seines pflanzlichen Ursprungs, ohne Gefahr einer allo- oder xenogenen Kontamination gewonnen werden (Wu, Xie, *et al.* 2010). Dieses unterscheidet es beispielsweise von Alternativen tierischen oder menschlichen Ursprungs wie Chitosan und Kollagen. Darüber hinaus erfüllt Alginat die grundlegenden Eigenschaften zur Ermöglichung eines die eingekapselten Zellen versorgenden Massentransportes sowie Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit (Hwang, Cho, *et al.* 2009). Von Nachteil, vor allem in Hinblick auf die Verwendung im Rahmen des Knochen TE, ist die nur geringe mechanische Stabilität von Alginat (Olderoy, Xie, *et al.* 2012; Chan and Mooney 2008), die sich auch in der Kombination mit HA nur gering erhöht (Wands, Shepherd, *et al.* 2008). Wichtiger als die mechanische Stabilität war jedoch im Rahmen dieser Arbeit - im Hinblick der Verwendung von Alginat-Mikrobeads als Transporter für Zellen - wie gut die Zellen den Einkapselvorgang und während der Kultur in den Mikrobeads überleben. Im Hinblick auf diese beiden Ansprüche bietet Alginat, dank milder, zellschonender Gelationsbedingungen (Bidarra, Barrias, *et al.* 2014) sowie eines für die Zellviabilität

günstigen gewebeähnlichen Umfelds (Grellier, Granja, *et al.* 2009), ideale Bedingungen. Vermutlich handelt es sich bei Alginat deshalb um den am häufigsten zur Zellimmobilisation in Mikrokapseln verwendeten Werkstoff (Augst, Kong, *et al.* 2006).

Auch die Versorgung der Zellen in Alginatbeads mit Nährstoffen und der nicht weniger wichtige Abfluss von Abfallprodukten scheint in der 3D-Kultur der Alginatbeads zu funktionieren. Evangelista *et al.* stellten fest, dass der prozentuale Anteil lebensfähiger, in Alginat-Mikrokugeln immobilisierter Osteoblasten, zwischen den Kultur-Tagen 9 und 24 hoch geblieben ist - sowohl bei Verwendung von RGD-Modifiziertem Alginat als auch bei Verwendung von unverändertem Alginat. Evangelista *et al.* gelangten dadurch zu der Ansicht, dass es zu einer ausreichenden Versorgung der Zellen sowohl mit Sauerstoff als auch mit Nährstoffen innerhalb der Mikrokugeln kommt. Darüber hinaus gingen sie auch von einem ausreichenden Abtransport der in den Zellen anfallenden Metabolite aus. Als ursächlich hierfür sehen sie die geringe Größe der Alginatbeads von ca. 1 mm. Evaluiert wurde die Viabilität der Zellen mittels einer Calcein- und Propidiumiodid Färbung. Dieses entspricht in etwa dem in dieser Arbeit verwendeten Live-Dead-Färbung. Allerdings quantifizierten Evangelista *et al.* im Anschluss ihre Ergebnisse mittels einer Messung im Program Image J. Dieser Schritt erfolgte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht (Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch eine zusätzliche Quantifizierung der Zellviabilität mittels AB-Messung. Während die Live-Dead-Färbung lediglich zwischen lebenden und toten Zellen unterscheidet liefert die AB-Messung zusätzlich eine Aussage darüber wie hoch die metabolische Aktivität und das Redoxpotential der Zellen ist. Hierdurch lässt sich der zytotoxische Stress der auf die Zellen wirkt darstellen noch bevor es zu einem Absterben der Zellen kommt.

Aufgrund der oben ausgeführten Vorüberlegungen entschieden wir uns für eine experimentelle Studie die den Einsatz von Alginatbeads zur Kultivierung und Differenzierung von SC zu Osteoblasten untersuchen sollte. Hierfür wollten wir zeigen ob sich Osteoblasten, BMSC und AdMSC schonend in Alginat einkapseln und kultivieren lassen. Um diese Frage zu beantworten kontrollierten wir mittels Live Dead- sowie Alamar-Blau-Färbung an vorab im Studienprotokoll festgesetzten Tagen das Überleben der Zellen in den Beads. Durch die Kombination beider Verfahren

erreichten wir sowohl eine optische, als auch eine photometrisch quantitative Evaluation der Zellen.

Um auch die Differenzierung der SC zu Osteoblasten abzubilden erfolgte zusätzlich eine Messung der AP-Aktivität. Als letzten Punkte wurde untersucht ob und in welchem Umfang es zu einer Mineralisation der Alginatbeads kommt. Dies erfolgte zum einen mittels lichtmikroskopischer Beurteilung der Beads als auch quantitativ mittels Messung der Integrated Density und einer Messung des Kalziumgehaltes der Beads durch Alizarin-Rot-Färbung.

In der vorliegenden Arbeit zeigen Osteoblasten sowohl bei Live-Dead-Färbung als auch im Rahmen der AB-Messung bereits an Tag 1 nach dem Einkapseln deutlich schlechtere Ergebnisse als BMSC oder AdMSC. Legt man die quantifizierbaren Ergebnisse der AB-Messung zugrunde, haben die OSÜ den Einkapselungs-Vorgang scheinbar signifikant schlechter überstanden als die BMSC oder AdMSC. Dieses deckt sich mit dem subjektiven Eindruck der Bilder des Live-Dead-Färbung. Die Frage, wodurch dieser statistisch signifikante Unterschied verursacht wird, konnte nicht abschließend geklärt werden, da die Handhabung aller drei Zellarten analog erfolgte und somit die externen Einflüsse auf die Zellen, wie in etwa hohe Spannungen im Rahmen des Einkapselvorganges jeweils als identisch angesehen werden können. Generell haben die Zellen aber den Einkapselvorgang sehr gut überstanden, was dafürspricht, dass es sich um ein schonendes, gut geeignetes Verfahren handelt. Auch andere Studien kamen hierbei zu demselben Ergebnis. Selbst hohe Spannungen beim Einkapseln führen wohl zu keiner Schädigung der Zellen (Grellier, Granja, *et al.* 2009; Abbah, Lu, *et al.* 2008; Westhrin, Xie, *et al.* 2015; Gryshkov, Pogozhykh, *et al.* 2014; Abbah, Lu, *et al.* 2006). Im Verlauf der Zellkultur wird die Bewertung der Live-Dead-Färbung schwieriger, da es zu einer zunehmenden Anfärbung der Bead-Matrix mit Calcein und Propidiumiodid kommt, sodass keine klare und eindeutige Beurteilung der Zellviabilität mehr möglich ist. Dieses Phänomen tritt bei allen Zelltypen auf. Zieht man nun die im Rahmen des Live-Dead-Färbung zusätzlich angefertigten lichtmikroskopischen Aufnahmen hinzu, fällt auf, dass diese Färbeartefakte lediglich bei mineralisierten Beads auftreten und mit dem Grad der Mineralisation zunehmen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es zu einer Einlagerung von Calcein und Propidiumiodid aufgrund der zunehmenden Mineralisation in die Matrix der Beads kommt. In Abhängigkeit davon wie schnell

die Mineralisation der einzelnen Beads durch die jeweilige Zellart erfolgt, lässt sich dadurch mitunter bereits ab Tag 10 der Zellkultur in den Beads keine Aussage mehr über die Viabilität der Zellen anhand der Live-Dead-Färbung treffen. Hier sollte für zukünftige Studien, zumindest für Verlaufsmessungen, eine alternative Methode in Betracht gezogen werden.

Betrachtet man die AB- Messwerte zeigt sich für die BMSC dasselbe Ergebnis, welches auch Evangelista *et al.* erzielt haben: Es kommt zu keinem statistisch signifikanten Rückgang der Viabilität, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Versorgung der BMSC mit Nährstoffen und Sauerstoff in den Beads ausreichend war, auch wenn tendenziell ein Rückgang der Viabilität zu beobachten ist (Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Anders stellt sich jedoch das Bild bei den Osteoblasten und AdMSC dar. Diese unterliegen einem signifikanten Rückgang ihrer Viabilität, sodass davon auszugehen ist, dass diese beiden Zellarten signifikant schlechter mit den statischen Kulturbedingungen in den Mikrobeads zurechtkommen als die BMSC. Gryshkov *et al.* beschreiben für ihre MSC einen linearen Rückgang der Viabilität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Als Ursache hierfür vermuten sie eine Minderversorgung der Zellen aufgrund mangelnder Diffusion (Gryshkov, Pogozykh, *et al.* 2014).

Hier wäre zu testen, ob eventuell dynamische Kulturbedingungen zu einer besseren Verteilung der Nährstoffe und somit zu einer gesteigerten Viabilität führen könnten. Evangelista *et al.* sowie Grellier *et al.* verwendeten beispielsweise Spinner Flasks, um dynamische Kulturbedingungen zu ermöglichen. Darüber hinaus verwendeten Evangelista *et al.* sowie Grellier *et al.* 20×10^6 Zellen pro Milliliter Alginate, während in der vorliegenden Arbeit lediglich 2×10^6 Zellen pro Milliliter Alginate verwendet wurden (Grellier, Granja, *et al.* 2009; Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Evangelista *et al.* sehen in der hohen Zelldichte einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen Studien, da sie sich dadurch deutlich verbesserte Zell-Zell-Interaktionen erwarten (Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Abbah *et al.* konnten für murine AdMSC sowie lapine AdMSC in 3D- Alginate-Hyaluronsäure-Beads sogar ein besseres Proliferationsverhalten sowie Differenzierungsverhalten zur osteogenen Linie zeigen als bei Verwendung von normalen 2D-Kunststoff-Gewebekultur-Oberflächen zur Kultivierung der Zellen (Abbah, Lu, *et al.* 2008; Abbah, Lu, *et al.* 2006).

Die Differenzierung zur osteogenen Linie wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mittels AP-Aktivitätsmessung erfasst. Bei dieser zeigten die BMSC die absolut höchsten Aktivitätswerte, wobei zu beachten ist, dass für die Unterschiede keine statistische Signifikanz besteht. Zudem fällt auf, dass alle drei Zellarten, BMSC, AdMSC und OSÜ ihre AP-Maximalwerte bereits bei der ersten Messung an Tag 1 nach dem Einkapseln der Zellen in die Alginatebeads zeigten und es nicht wie erwartet anfangs zu einem Anstieg der Aktivität mit nachfolgendem Maximum und im weiteren Verlauf - nach Abschluss der Differenzierung - zu einem langsamen Rückgang der Aktivität kam. Die Abnahme der AP-Aktivität könnte durch den Rückgang der Viabilität erklärt werden. Dieses würde zu dem Befund passen, dass die BMSC sowohl bei der AB-Messung als auch bei der AP-Aktivität die höchsten Messwerte liefern. Fraglich ist dann jedoch weshalb es bei den Beads mit Zellen zu einer signifikanten Ossifikation der Beads kommt. Evangelista *et al.* haben die AP-Aktivität ihrer Osteoblasten lediglich an Tag 28 bestimmt. Hierbei zeigte sich in ihrer Studie bezüglich der Differenzierungsaktivität der Zellen eine Überlegenheit des RGD-Modifizierten Alginates (Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Daher wäre es ein weiterer vielversprechender und noch zu testender Ansatz, RGD-modifiziertes Alginate zu verwenden und hierdurch ggf. ein verbessertes Differenzierungsverhalten zu erzielen. Und auch bezüglich der ARS erhielten Evangelista *et al.* deutlich bessere Ergebnisse bei Verwendung von RGD-modifiziertem Alginate (Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007), so dass auch in Hinblick darauf weiter verbesserte Ergebnisse zu erwarten wären.

Interessant zu untersuchen wären auch die Auswirkungen einer Co-Immobilisation verschiedener Zellarten im Rahmen des von uns gewählten Settings. Grellier *et al.* sehen eine große Bedeutung in der Interaktion zwischen vaskulären EC und Osteoprogenitorzellen. Dies erscheint auch naheliegend, wenn man das Einsprossen von Blutgefäßen im Rahmen der enchondralen Ossifikation bedenkt. Deshalb untersuchten sie in einer Studie, inwieweit vaskuläre ECs sowohl *in vivo* als auch *in vitro* das osteogene Potential von Osteoprogenitorzellen beeinflussen können. Als Matrix verwendeten sie dabei RGD-modifizierte Alginate-Mikrobeads mit einer finalen Zelldichte von 20×10^6 Zellen pro Milliliter Alginate. Hiermit lagen sie zwischen der in dieser Arbeit verwendeten Zelldichte und der von Evangelista *et al.* verwendeten Zelldichte (siehe oben). Die Größe der erzeugten Mikrobeads betrug

200-500 μm und ist somit deutlich kleiner als bei Evangelista *et al.*, jedoch auch deutlich weniger einheitlich (Grellier, Granja, *et al.* 2009; Evangelista, Hsiong, *et al.* 2007). Zur *in vitro* Kultur wurden dynamische Kulturbedingungen gewählt. Als vaskuläre EC wurden humane Umbilikalvenenzellen (HUVEC) verwendet; Osteoprogenitorzellen (HOP) wurden aus humanen BMSC gewonnen. Unter den beschriebenen Kulturbedingungen kam es sowohl bei allein immobilisierten HOPs als auch bei Co-Immobilisierten HOPs-HUVECs zu einer ansteigenden metabolischen Aktivität. Die allein immobilisierten HUVECs zeigten jedoch bereits nach 8 Tagen keine verbleibende metabolische Aktivität. Als Marker für den Osteoblasten-Phänotyp wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR die AP- sowie die Osteokalzin Konzentration verwendet. Hierbei zeigte sich eine Überlegenheit der co-immobilisierten HOPs. Die Mineralisation wurde mittels von-Kossa-Färbung überprüft. Hierbei zeigten lediglich die Co-immobilisierten HOPs-HUVECs nach 22 Tagen eine signifikante Mineralisation der Alginatmatrix (Grellier, Granja, *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu zeigten im Rahmen dieser Arbeit alle drei Zelltypen sowohl in der Analyse mittels ARS als auch in der Analyse mittels ImageJ eine signifikante Zunahme der Mineralisation bis Tag 21, obwohl keine Co-Immobilisation erfolgt war und auch keine dynamischen Kulturbedingungen vorlagen. An Tag 21 besteht hierbei auch kein statistisch signifikanter Unterschied in den ARS-Messwerten für die einzelnen Zelllinien. Somit ist davon auszugehen, dass Osteoblasten, BMSC und AdMSC bei den hier verwendeten Bedingungen zu einer annähernd gleichwertigen Mineralisation führen und somit diesbezüglich ähnlich gut geeignet sind. Dass es im Rahmen dieser Arbeit, im Gegensatz zur von Grellier *et al.* vorgelegten Arbeit zu einer signifikanten Mineralisation kommt (Grellier, Granja, *et al.* 2009), scheint hierbei auch nicht allein an unterschiedlichen verwendeten Materialien der Kulturmedien oder des Alginates zu liegen, da es bei den im Rahmen dieser Arbeit zur Kontrolle verwendeten leeren Beads zu keiner signifikanten Zunahme der Mineralisation bis Tag 21 gekommen ist.

Zusätzlich zur *in vitro*-Kultur implantierten Grellier *et al.* Alginatbeads ohne Zellen, mit HUVECs, HOPs sowie HUVECs und HOPs in einen Knochendefekt bei Nackt-Mäusen. Hier zeigten die Beads ohne Zellen und die Beads, in denen lediglich HOPs waren, auch nach 6 Wochen keine signifikante Mineralisation des Defektes in der Röntgen micro-Computer Tomographie. Die besten Ergebnisse lieferte erneut die Co-

immobilisation von HUVECs und HOPs (Grellier, Granja, *et al.* 2009). Ausgehend von diesen durch Grellier *et al.* erreichten Ergebnissen wäre auch eine Co-Immobilisation von BMSC beziehungsweise AdMSC mit HUVECs oder ähnlichen Zellen ein wünschenswerter Ansatz für weitere Studien, der ggf. ein verbessertes Differenzierungsverhalten erwarten lassen würde. Ein weiterer alternativer, noch zu testender Ansatz wäre zudem die zusätzliche Verwendung von Wachstumsfaktoren wie BMP beziehungsweise die Verwendung von BMP-2-transfizierten Zellen, um dadurch das Differenzierungsverhalten der Zellen zu verbessern (Hausmann, Ehnert, *et al.* 2014).

Im Rahmen einer Folgearbeit wäre es zudem sicherlich auch wünschenswert, Spenderspezifische Daten wie Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen zu erheben und in die Auswertung mit einfließen zu lassen. Hierbei wäre es zudem wichtig zu wissen, aus welcher Körperregion das Fettgewebe, aus dem die verwendeten AdMSC isoliert wurden, stammt. Reumann *et al.* konnten zeigen, dass in Abhängigkeit von der Entnahmestelle signifikante Unterschiede bezüglich des Potentials zur osteogenen Differenzierung der AdMSC bestehen. Der Einfluss der Entnahmestelle auf das Differenzierungspotential scheint hierbei sogar größer zu sein als Alter, BMI oder Geschlecht des Spenders (Reumann, Linnemann, *et al.* 2018).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Vorläuferstudie, die in Zusammenarbeit mit dem Nanoinstitut der NTNU Trondheim durchgeführt wurde. Ziel der Arbeit ist es zu zeigen, dass eine 3D-Alginatmatrix mit SC vitalisiert werden kann. Darüber hinaus soll gezeigt werden, dass es im Rahmen einer *in vitro* Kultur zu einer osteogenen Differenzierung der Zellen sowie einer Mineralisation der Alginatmatrix kommt.

Im Rahmen orthopädischer sowie unfallchirurgischer Operationen ergibt sich oftmals der Bedarf an vitalisiertem Knochenersatzmaterial um beispielsweise komplexe-, infizierte Frakturen oder große Diskontinuitätsdefekte versorgen zu können. Selbiges gilt auch im Rahmen von Endoprothesen wechseln oder endoprothetischen Revisionsoperationen, Eingriffen die hinsichtlich einer immer älter werdenden Bevölkerung weiter im klinischen Alltag zunehmen werden.

Bisher verwendete autologe oder xenogene Transplantate bieten aufgrund ihrer Komorbiditäten, Risiken oder ihrem mangelnden Potential was Osteoinduktivität und Osteokonduktivität betrifft, keine vollständig zufriedenstellende Lösung.

Hier bietet aber das TE die Hoffnung alle Punkte der klassischen Bestandteile der Frakturheilung - osteogene Zellen, Wachstumsfaktoren und osteokonduktives Scaffold – erfüllen zu können.

Als Matrix findet im Rahmen dieser Arbeit Alginat Verwendung. Dieses ist bereits seit längerem sowohl in der Medizin, der Lebensmittelindustrie, als auch der Forschung in Verwendung und eignet sich sehr gut für das Einkapseln von Zellen in Mikrobeads.

In Rahmen dieser Arbeit wurden dem Alginat SC und Dinatriumhydrogenphosphat zugesetzt. Durch den Kontakt mit Kalziumchlorid während der Verkapselung entstanden so Beads aus einem Alginat-Hydroxyapatit-Verbundstoff, in welchem SC enthalten waren. Das HA sollte hierbei gemeinsam mit einem Differenzierungsmedium für die osteogene Differenzierung der SC sorgen.

Als Zellen für die Vitalisierung der Beads wurden Osteoblasten, BMSC und AdMSC verwendet.

Ziel der Arbeit war es zu zeigen, dass:

1. sich Osteoblasten, BMSC und AdMSC schonend in Alginat einkapseln und kultivieren lassen. Um dies zu evaluieren wurde - an vorab im Studienprotokoll festgesetzten Tagen - eine Live-Dead-Färbung sowie eine Alamar-Blau-Färbung durchgeführt.
2. die Zellen in den Beads aus Alginat mit HA in die osteogene Linie differenzieren und welche Unterschiede hierbei zwischen AdMSC und BMSC bestehen. Um die osteogene Differenzierung zu dokumentieren wurde - an vorab im Studienprotokoll festgesetzten Tagen - eine Messung der AP-Aktivität durchgeführt.
3. es zu einer Mineralisation der Alginatbeads kommt. Um dies zu evaluieren erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der Beads, eine quantitative Auswertung mittels Messung der Integrated Density, sowie eine Messung des Kalziumgehaltes der Beads mittels Alizarin-Rot-Färbung. Auch dies wurde jeweils an vorab im Studienprotokoll festgesetzten Tagen durchgeführt.

In der Live-Dead-Färbung fanden sich insbesondere an Tag 1 der Kultur sowohl bei den OSÜ/OSS, als auch bei den BMSC und den AdMSC zahlreiche vitale Zellen in den Beads, was dafürspricht, dass alle Zellen gut den Einkapselvorgang überlebt haben. Bemerkenswert ist hierbei, dass sich in der AB-Messung die OSÜ/OSS in ihrer Ausgangsviabilität an Tag 1 mit einem medianen Wert von 7,07 (Q25 = 5,86; Q75 = 12,75) signifikant ($p < 0,001$) von den BMSC und AdMSC unterscheiden. Diese haben mit AB-Messwerten für BMSC von 15,16 (Q25 = 9,47; Q75 = 23,11) und AB-Messwerten für AdMSC von 18,17 (Q25 = 13,46; Q75 = 27,85) gleich gut (kein statistisch signifikanter Unterschied bei $p < 0,001$) und deutlich besser als die OSÜ/OSS überlebt. Über die Zeit von 21 Kulturtagen kam es jedoch zu einem deutlichen Viabilitätsverlust der eingekapselten Zellen. Dies fiel bereits optisch im Rahmen der Live-Dead-Färbung auf und konnte auch mittels AB-Messung verifiziert werden. Die AB-Messwerte an Tag 21 betragen jeweils für OSÜ/OSS 0,14 (Q25 = -1,68; Q75 = 2,11) für BMSC 12,69 (Q25 = 5,81; Q75 = 20,12) und für AdMSC 4,00 (Q25 = 1,26; Q75 = 9,04). Dieser Rückgang ist lediglich bei den BMSC nicht statistisch signifikant, darüber hinaus war die Viabilität der AdMSC an Tag 21

statistisch signifikant besser als die der OSÜ/OSS und die der BMSC statistisch signifikant besser als die der AdMSC, wobei $p < 0,001$. Somit konnte gezeigt werden, dass prinzipiell ein Überleben für 21 Tage unter den gewählten Kulturbedingungen für alle drei Zelltypen möglich ist, es jedoch zu statistisch signifikanten Unterschieden hinsichtlich der Viabilität an Tag 21 kommt und die BMSC am besten unter den gewählten Kulturbedingungen überleben.

Bezüglich der Differenzierungsaktivität kann gesagt werden, dass sie für alle drei Zellarten an Tag 1 am ausgeprägtesten war. An diesem zeigten sich die höchsten AP-Messwerte jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Zellarten bei $p < 0,05$. Bei den OSÜ/OSS kam es dann bereits bis Tag 6 zu einem statistisch signifikanten Rückgang der AP-Aktivität, bei den BMSC und AdMSC war der Rückgang der AP-Aktivität erst an Tag 21 statistisch signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass alle drei Zellarten eine gleich gute Differenzierung in Richtung der osteogenen Linie zeigen und diese bereits sofort nach dem Einkapseln der Zellen beginnt.

Innerhalb der 21 Tage in Kultur kam es zu einer ausgeprägten Mineralisierung der Beads, diese zeigte sich rein optisch in einer deutlichen braun bis schwarz Färbung der Beads in der LM wobei diese erstaunlicherweise bei den OSÜ/OSS am geringsten ausfiel von allen zellhaltigen Beads. Die zur Kontrolle kultivierten Beads ohne Zellen zeigten bis Tag 21 nur eine sehr geringe Braunfärbung. Mittels Bestimmung der IntDen konnte diese Zunahme auch quantifiziert werden. Hier erreichten die BMSC an Tag 21 die höchsten Werte, gefolgt von den AdMSC. Die OSÜ blieben deutlich hinter den anderen beiden zurück.

Der optische Eindruck bestätigte sich dann auch mittels ARS. Während OSÜ/OSS, BMSC und AdMSC eine statistisch signifikante Zunahme der Messwerte bis Tag 21 zeigen bleibt diese bei den leeren Beads ohne Zellen bis Tag 21 aus ($p < 0,05$). Bei selbem Signifikanzniveau ergibt sich für die ARS-Messwerte an Tag 21 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Zellarten. Wobei BMSC mit $5,34 \mu\text{M} \pm 2,26 \mu\text{M}$ und Osteoblasten mit $5,30 \mu\text{M} \pm 3,24 \mu\text{M}$ nahezu identische Werte liefern und lediglich die Messwerte für AdMSC mit im Mittelwert $3,91 \mu\text{M} \pm 0,98 \mu\text{M}$ etwas geringer ausfallen.

Zusammenfassend konnten wir somit zeigen, dass es möglich ist OSÜ/OSS, BMSC und AdMSC in Alginatbeads zu kultivieren und dadurch eine signifikante

Mineralisierung der Beads zu erreichen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AdMSC genauso gut in die osteogene Richtung differenzieren wie BMSC und sich ebenfalls in dem von ihnen erzielten Ausmaß der Mineralisierung der Beads nicht statistisch signifikant von den BMSC unterscheiden. Lediglich die Viabilität der AdMSC ist nach 21 Tagen in Zellkultur signifikant schlechter als die der BMSC, wobei generell eine Kultivierung für 21 Tage unter den gewählten Bedingungen möglich ist. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei AdMSC um eine zukünftige mögliche Alternative für BMSC im Rahmen des TE von Knochen handelt.

6 QUELLENVERZEICHNIS

1. Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, Li ZY, Leong JC, Luk KD. Osteogenic behavior of alginate encapsulated bone marrow stromal cells: an in vitro study. *Journal of materials science Materials in medicine* 2008;19 Seite: 2113-9.
2. Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KMC, Liu WG, Zhao F, Li ZY, Leong JCY, Luk KDK. In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;347 Seite: 185-91.
3. Ali F, Saleh M. Treatment of distal femoral nonunions by external fixation with simultaneous length and alignment correction. *Injury* 2002;33 Seite: 127-34.
4. Anton F, Suck K, Diederichs S, Behr L, Hitzmann B, van Griensven M, Scheper T, Kasper C. Design and characterization of a rotating bed system bioreactor for tissue engineering applications. *Biotechnology progress* 2008;24 Seite: 140-7.
5. Aspera-Werz RH, Chen T, Ehnert S, Zhu S, Frohlich T, Nussler AK. Cigarette Smoke Induces the Risk of Metabolic Bone Diseases: Transforming Growth Factor Beta Signaling Impairment via Dysfunctional Primary Cilia Affects Migration, Proliferation, and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2019;20 Seite: 1-19.
6. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience* 2006;6 Seite: 623-33.
7. Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA. New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury* 2007;38 Suppl 1 Seite: 49-62.
8. Bakhshai B. Rechtliche Grundlagen. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochentransplantation Knochenbanken und klinische Anwendung von Bankknochen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2012 Seite: 5-12.
9. Balmayor ER, van Griensven M. Gene therapy for bone engineering. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3 Seite: 3-9.
10. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng* 2003;9 Seite: 549-54.
11. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006;12 Seite: 3007-19.

12. Bartl C, Stengel D, Bruckner T, Rossion I, Luntz S, Seiler C, Gebhard F. Open reduction and internal fixation versus casting for highly comminuted and intra-articular fractures of the distal radius (ORCHID): protocol for a randomized clinical multi-center trial. *Trials* 2011;12 Seite: 1-12.

13. Bartl R, Bartl C. Osteoporose Prävention - Diagnostik - Therapie ; 12 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2011 Seite: 3-38.

14. Beirer M, Kirchhoff C, Biberthaler P. Development of a German fracture register to assess current fracture care and improve treatment quality: A feasibility study. *EFORT Open Rev* 2017;2 Seite: 474-7.

15. Bernstein P, Bornhäuser M, Günther KP, Stiehler M. Knochen-Tissue-Engineering in der klinischen Anwendung. *Orthopäde* 2009;38 Seite: 1029-37.

16. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells* 2001;19 Seite: 180-92.

17. Biberthaler P. Versorgungsforschung. *Der Unfallchirurg* 2018;121 Seite: 938-9.

18. Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta biomaterialia* 2014;10 Seite: 1646-62.

19. Biga LM. Bone formation and development. Oregon State University, 2020. (Accessed 05.02.2020, 2020, at https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/#fig-ch06_04_02.)

20. Blackburn C, PhD, , Clegg D, PhD, , Cutler C, MD, MPH, FRCPC., Goldstein L, PhD, , Israsena N, MD, PhD, , Lee R, MD., Munsie M, PhD, , Pitossi F, PhD, , Schneider M, Sipp D, Srivastava D, MD., Stern J, MD, PhD, . Stem Cell Facts. 2020. (Accessed 13.02.20, 2014, at <https://www.closerlookatstemcells.org/wp-content/uploads/2018/10/stem-cell-facts.pdf>.)

21. Blokhuis TJ, Calori GM, Schmidmaier G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: what is the evidence? *Injury* 2013;44 Suppl 1 Seite: 40-2.

22. Brawley SC, Simpson RB. Results of an alternative autogenous iliac crest bone graft harvest method. *Orthopedics* 2006;29 Seite: 342-6.

23. Brochhausen C, Lehmann M, Zehbe R, Watzer B, Grad S, Meurer A, Kirkpatrick CJ. [Tissue engineering of cartilage and bone : growth factors and signaling molecules]. *Orthopäde* 2009;38 Seite: 1053-62.

24. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;45 Seite: 115-20.

25. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21 Seite: 2347-59.

26. Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C, Tagliabue L. Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results. *Injury* 2011;42 Seite: 587-90.

27. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007;28 Seite: 4240-50.

28. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plastic and reconstructive surgery* 1997;100 Seite: 297-302.

29. Cardoso DA, van den Beucken JJ, Both LL, Bender J, Jansen JA, Leeuwenburgh SC. Gelation and biocompatibility of injectable alginate-calcium phosphate gels for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2014;102 Seite: 808-17.

30. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells* 2007;25 Seite: 2739-49.

31. Chan G, Mooney DJ. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends in biotechnology* 2008;26 Seite: 382-92.

32. Cohen J, Zaleski KL, Nourissat G, Julien TP, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method. *J Biomed Mater Res A* 2011;96 Seite: 93-9.

33. Cowin SC. *Bone Mechanics Handbook*, Second Edition: Taylor & Francis; 2001 Seite: 1-34.

34. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons* 1996;35 Seite: 413-7.

35. Dawson JJ, Kanczler JM, Yang XB, Attard GS, Oreffo RO. Clay gels for the delivery of regenerative microenvironments. *Advanced materials* 2011;23 Seite: 3304-8.

36. Designua. *Osteon Entwicklung und Struktur*. Shutterstock, 2020. (Accessed 05.02.2020, 2020, at <https://www.shutterstock.com/de/image-illustration/osteon-development-structure-osteoblast-osteocyte-osteoclast-186714569>.)

37. Destatis. Bevölkerung im Wandel Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2019 Seite: 5-40.
38. Deutschland Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch Deutschland 2019. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2019 Seite: 127-162.
39. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine* 2011;9 Seite: 66.
40. Dittel K-K, Weise K. Komplikationsmanagement in der Traumatologie : 11 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2003 Seite: 164-245.
41. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8 Seite: 315-7.
42. Drosse I, Volkmer E, Capanna R, Biase PD, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury* 2008;39 Seite: 9-20.
43. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003;24 Seite: 4337-51.
44. Ehnert S, Aspera-Werz RH, Ihle C, Trost M, Zirn B, Flesch I, Schroter S, Relja B, Nussler AK. Smoking Dependent Alterations in Bone Formation and Inflammation Represent Major Risk Factors for Complications Following Total Joint Arthroplasty. *J Clin Med* 2019;8 Seite: 1-16.
45. Ehnert S, Glanemann M, Schmitt A, Vogt S, Shanny N, Nussler NC, Stöckle U, Nussler A. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch Surg* 2009;394 Seite: 985-97.
46. Ehnert S, J H, Kerler I, Schmitt A, M O, Freude T, Neumaier M, T E, T S, U S, Nussler A. Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe - Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen? *Zeitschrift für Regenerative Medizin* 2011;4 Seite: 1-3.
47. El-Amin SF, Botchwey E, Tuli R, Kofron MD, Mesfin A, Sethuraman S, Tuan RS, Laurencin CT. Human osteoblast cells: isolation, characterization, and growth on polymers for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2006;76 Seite: 439-49.
48. Esther J, Wolfgang R. Diabetes: eine Volkskrankheit und ihre Prävention; Epidemiologie des Diabetes in Deutschland. Mainz: Kirchheim; 2020. Report No.: ISSN 1614-824X Seite: 9-20.

49. EU-Kommission. Verordnung (EU) Nr. 1130/2011 der Kommission. Verordnung (EU) Nr 1130/2011. Amtsblatt der Europäischen Union: Europäische Kommission; 2011 Seite: 178-204.
50. Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, Salema R, Barbosa MA, Mooney DJ, Granja PL. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials* 2007;28 Seite: 3644-55.
51. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 1970;3 Seite: 393-403.
52. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1 Seite: 151-8.
53. Friesecke CS, N. Knöcherner Rekonstruktion bei diaphysären Knochensubstanzverlusten. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochen transplantation Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 75-86.
54. Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Current stem cell research & therapy* 2008;3 Seite: 254-64.
55. Fuchs J, Rabenberg M, Scheidt-Nave C. [Prevalence of selected musculoskeletal conditions in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2013;56 Seite: 678-86.
56. Garzon I, Thomsen P, Wehrhan F. Abstracts of the 3rd TERMIS (Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society) World Congress 2012. September 5-8, 2012. Vienna, Austria. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6 Suppl 1 Seite: 1-2.
57. Geiger PCBH. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International* 2012;2012 Seite: 1-11.
58. Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. *Injury* 2007;38 Suppl 1 Seite: 81-9.
59. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury* 2007;38 Suppl 4 Seite: 1-2.

60. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 2007;100 Seite: 1249-60.
61. Gordon J. Betts KAY, James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix Cellular differentiation. OpenStax, 2013. (Accessed 05.02, 2020, at [https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/3-6-cellular-differentiation.](https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/3-6-cellular-differentiation))
62. Grellier M, Granja PL, Fricain J-C, Bidarra SJ, Renard M, Bareille R, Bourget C, Amédée J, Barbosa MA. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* 2009;30 Seite: 3271-8.
63. Gryshkov O, Pogozykh D, Zernetsch H, Hofmann N, Mueller T, Glasmacher B. Process engineering of high voltage alginate encapsulation of mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering: C* 2014;36 Seite: 77-83.
64. Guder WKH, J.; Gosheger, G. Bankknochen bei benignen Tumoren. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochen transplantation*
Knochenbanken und klinische Anwendung von Bankknochen. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 139-50.
65. Hansis ML. Aktuelle Entwicklungen in der Unfallchirurgie. *Dtsch Arztebl International* 2000;97 Seite: 2038-42.
66. Haug AT, Kanz K-G, van Griensven M, Biberthaler P. Offene Fraktur. *MMW - Fortschritte der Medizin* 2017;159 Seite: 56-8.
67. Häupl T, Ringe J, Erggelet C, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Tissue Engineering. *Z Rheumatol* 2003;62 Seite: 46-9.
68. Hausmann M, Ehnert S, Hofmann V, Döbele S, Freude T, Stöckle U, Nussler A. Einsatz der Bone morphogenetic Proteins (BMPs) zur Behandlung von Pseudarthrosen – Effizienz und Therapieversagen. *Z Orthop Unfall* 2014;152 Seite: 144-51.
69. Haussling V, Deninger S, Vidoni L, Rinderknecht H, Ruoss M, Arnscheidt C, Athanasopulu K, Kemkemer R, Nussler AK, Ehnert S. Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering (Basel)* 2019;6 Seite: 1-20.
70. Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T. Resorbierbare Knochenersatzmaterialien. *Orthopäde* 2011;40 Seite: 761-73.
71. Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2010;7 Suppl 4 Seite: 379-91.

72. Hentz VR, Chang J. Tissue engineering for reconstruction of the thumb. *The New England journal of medicine* 2001;344 Seite: 1547-8.
73. Hofmann A, Gorbulev S, Guehring T, Schulz AP, Schupfner R, Raschke M, Huber-Wagner S, Rommens PM, Group* obotCS. Autologous Iliac Bone Graft Compared with Biphasic Hydroxyapatite and Calcium Sulfate Cement for the Treatment of Bone Defects in Tibial Plateau Fractures: A Prospective, Randomized, Open-Label, Multicenter Study. *JBJS* 2020;102 Seite: 179-93.
74. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A, International Society for Cellular T. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7 Seite: 393-5.
75. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy* 2008;213 Seite: 66-72.
76. Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, Liu SP, Jong GP, Chiu YW, Wu HS, Tsou YA, Cheng CW, Lin SZ. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization and Differentiation Potential. *Cell Transplant* 2012;22 Seite: 701-8.
77. Huo MH, Friedlaender GE, Salvati EA. Bone graft and total hip arthroplasty. A review. *The Journal of arthroplasty* 1992;7 Seite: 109-20.
78. Hwang YS, Cho J, Tay F, Heng JY, Ho R, Kazarian SG, Williams DR, Boccaccini AR, Polak JM, Mantalaris A. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30 Seite: 499-507.
79. Im G, II, Shin Y-W, Lee K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage* 2005;13 Seite: 845-53.
80. Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP. Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81 Seite: 306-16.
81. Jakob F, Benisch P, Ebert R, Seefried L, Schieker M, Ignatius A. Zelluläre Defekte und Regulationsstörungen bei der Heilung osteoporotischer Frakturen. *Osteologie* 2011;20 Seite: 23-8.
82. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 2011;42 Suppl 2 Seite: 77-81.

83. Jerosch J, Bakhschai B. Vorwort. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. Knochen transplantation
Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 1-2.
84. Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. *Injury* 2008;39 Suppl 3 Seite: 37-42.
85. Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27 Seite: 964-73.
86. Jorgensen C, Gordeladze J, Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Current opinion in biotechnology* 2004;15 Seite: 406-10.
87. Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M. Histologie. 6., neu übersetzte, überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005 Seite: 91-106.
88. Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: Basic science to clinical translation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011;43 Seite: 286-9.
89. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America* 2007;19 Seite: 513-21.
90. Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature* 2003;423 Seite: 316-8.
91. Katthagen B-D. Bankknochen in der Kinderorthopädie am Beispiel der Azetabuloplastik bei Hüft dysplasie. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. Knochen transplantation
Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 129-38.
92. Kitagawa T, Yamaoka T, Iwase R, Murakami A. Three-dimensional cell seeding and growth in radial-flow perfusion bioreactor for in vitro tissue reconstruction. *Biotechnology and bioengineering* 2006;93 Seite: 947-54.
93. Kneser U, Schaefer DJ, Munder B, Klemm C, Andree C, Stark GB. Tissue engineering of bone. Minimally invasive therapy & allied technologies : MITAT : official journal of the Society for Minimally Invasive Therapy 2002;11 Seite: 107-16.
94. Kohli N, Wright KT, Sammons RL, Jeys L, Snow M, Johnson WE. An In Vitro Comparison of the Incorporation, Growth, and Chondrogenic Potential of Human Bone

Marrow versus Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells in Clinically Relevant Cell Scaffolds Used for Cartilage Repair. *Cartilage* 2015;6 Seite: 252-63.

95. Li Y, Rodrigues J, Tomas H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chemical Society reviews* 2012;41 Seite: 2193-221.

96. Liedert A. Tissue-Engineering. In: *Biology" BbEU-Mm*, ed. Ulm2011 Seite: 27-32.

97. Lisowska B, Kosson D, Domaracka K. Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: The role of prostaglandins in bone metabolism. *Drug Design, Development and Therapy* 2018;Volume 12 Seite: 1753-8.

98. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfusion and Apheresis Science* 2004;30 Seite: 169-74.

99. Mahboubian S, Seah M, Fragomen AT, Rozbruch SR. Femoral lengthening with lengthening over a nail has fewer complications than intramedullary skeletal kinetic distraction. *Clin Orthop Relat Res* 2012;470 Seite: 1221-31.

100. Mahendra A, Maclean AD. Available biological treatments for complex non-unions. *Injury* 2007;38 Suppl 4 Seite: S7-12.

101. Maronna U. Geleitwort. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochen transplantation Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 3-4.

102. Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V. Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 2004;25 Seite: 3233-43.

103. McGee-Russell SM. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem* 1958;6 Seite: 22-42.

104. Meenen NM. Tissue Engineering - eine Standortbestimmung. *Z Orthop Unfall* 2008;146 Seite: 19-20.

105. Mensink GB, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C. [Overweight and obesity in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 2013;56 Seite: 786-94.

106. Meurer A, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ. „Tissue Engineering“ – eine Standortbestimmung und Zukunftsperspektiven. *Orthopäde* 2009;38 Seite: 1007-8.

107. Moreira CA DD, Baron R. Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling. In: Feingold KR AB, Boyce A, et al., ed. Endotext [Internet], MDText.com2008 Seite.
108. Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Ansari S, Xu X, Chee W, Schricker S, Shi S. Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study. *J Mater Sci: Mater Med* 2012;23 Seite: 3041-51.
109. Muller CW, Hildebrandt K, Gerich T, Krettek C, van Griensven M, Rosado Balmayor E. BMP-2-transduced human bone marrow stem cells enhance neo-bone formation in a rat critical-sized femur defect. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11 Seite: 1122-31.
110. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010;31 Seite: 3572-9.
111. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. Orthopädie und Unfallchirurgie. 6., korrigierte Aufl. ed. Stuttgart: Thieme; 2009 Seite: 279-343.
112. Oehme SU. Bankknochen in der Knieendoprothetik. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. Knochentransplantation
Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 99-108.
113. Olderoy MO, Xie M, Andreassen JP, Strand BL, Zhang Z, Sikorski P. Viscoelastic properties of mineralized alginate hydrogel beads. *Journal of materials science Materials in medicine* 2012;23 Seite: 1619-27.
114. Ollier LI, LecIdÉM. *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. Paris: Victor Masson et Fils Place De L'École-De-Médecine; 1867 Seite: 434-446.
115. Pagano A, Crooijmans R, Groenen M, Randazzo N, Zerega B, Cancedda R, Dozin B. A chondrogenesis-related lipocalin cluster includes a third new gene, CALgamma. *Gene* 2003;305 Seite: 185-94.
116. Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva medica* 2009;51 Seite: 25-41.
117. Penner S. Thermodesinfizierter Knochen in der Revisionsendoprothetik der Hüfte: Pfannenaufbau in Composite-Technik. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. Knochentransplantation

Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 86-98.

118. Pieske O, Wittmann A, Zaspel J, Löffler T, Rubenbauer B, Trentzsch H, Piltz S. Autologous bone graft versus demineralized bone matrix in internal fixation of ununited long bones. *Journal of trauma management & outcomes* 2009;3 Seite: 1-11.

119. Pineda LM, Busing M, Meinig RP, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *Journal of biomedical materials research* 1996;31 Seite: 385-94.

120. Pruß A. Einleitung. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochentransplantation Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 3-5.

121. Pruß AF, L. Spenderauswahl und Labortestung. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochentransplantation Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2012 Seite: 13-8.

122. Qi X, Ye J, Wang Y. Alginate/poly (lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement scaffold with oriented pore structure for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009;89A Seite: 980-7.

123. Rachmiel A, Aizenbud D, Pillar G, Srouji S, Peled M. Bilateral mandibular distraction for patients with compromised airway analyzed by three-dimensional CT. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2005;34 Seite: 9-18.

124. Randau TM, Gravius S, Nüssler A. Aktueller Stand der Stammzelltherapie in Orthopädie und Unfallchirurgie. *Z Orthop Unfall* 2014;152 Seite: 320-7.

125. Ratanavaraporn J, Kanokpanont S, Tabata Y, Damrongsakkul S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chito oligosaccharide films. *Carbohydrate Polymers* 2009;78 Seite: 873-8.

126. Regauer M, Jurgens P, Budenhofer U, Hartstock M, Bocker W, Burklein D, Mutschler W, Sader R, Schieker M. Quantitative scanning acoustic microscopy compared to microradiography for assessment of new bone formation. *Bone* 2006;38 Seite: 564-70.

127. Reichert JC, Epari DR, Wullschleger ME, Berner A, Saifzadeh S, Noth U, Dickinson IC, Schuetz MA, Hutmacher DW. [Bone tissue engineering. Reconstruction of critical sized segmental bone defects in the ovine tibia]. *Orthopäde* 2012;41 Seite: 280-7.

128. Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S. Knochenersatz. Der Unfallchirurg 2012;115 Seite: 938-49.
129. Reumann MK, Linnemann C, Aspera-Werz RH, Arnold S, Held M, Seeliger C, Nussler AK, Ehnert S. Donor Site Location Is Critical for Proliferation, Stem Cell Capacity, and Osteogenic Differentiation of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Implications for Bone Tissue Engineering. Int J Mol Sci 2018;19 Seite: 1-15.
130. Reumann MK, Meder A, Klopfer T, Stuby F. Pseudarthrosen am Femur inklusive Korrekturosteotomien. OP-JOURNAL 2019;35 Seite: 310-7.
131. Rittstieg P, Wurm M, Müller M, Biberthaler P. Aktuelle Versorgungsstrategien der Unterschenkelfraktur des Erwachsenen. Der Unfallchirurg 2020;123 Seite: 479-90.
132. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. Calcif Tissue Int 1985;37 Seite: 453-60.
133. Rössler H, Rüther W, Pitzen P, Steinhagen J. Orthopädie und Unfallchirurgie. 19., aktualisierte und erw. Aufl ed. München: Elsevier; 2005 Seite: 2-12.
134. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. Biomaterials 1999;20 Seite: 45-53.
135. Rubert M, Monjo M, Lyngstadaas SP, Ramis JM. Effect of alginate hydrogel containing polyproline-rich peptides on osteoblast differentiation. Biomedical materials 2012;7 Seite: 1-10.
136. Runkel M, Rommens PM. Pseudarthrosen. Der Unfallchirurg 2000;103 Seite: 51-63.
137. Schieker M, Heiss C, Mutschler W. Knochenersatzmaterialien. Der Unfallchirurg 2008;111 Seite: 613-20.
138. Schieker M, Jakob F, Amling M, Mutschler W, Böcker W. Versorgung osteoporotischer Frakturen aus traumatologischer Sicht. Osteologie 2011;20 Seite: 5-10.
139. Schieker M, Seitz S, Gülkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W. [Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model]. Orthopäde 2004;33 Seite: 1354-60.
140. Schlickewei CW, Kleinertz H, Thiesen DM, Mader K, Priemel M, Frosch KH, Keller J. Current and Future Concepts for the Treatment of Impaired Fracture Healing. Int J Mol Sci 2019;20 Seite: 1-26.

141. Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC. Tissue Engineering von Knochengewebe. *Der Unfallchirurg* 2009;112 Seite: 785-95.
142. Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence. *Injury* 2011;42 Seite: 609-13.
143. Scientific TF. TRIzol Reagent, Experimental Protocol for DNA Isolation. 2016 Seite: 1-4.
144. Seebach C, Schultheiss J, Wilhelm K, Frank J, Henrich D. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro. *Injury* 2010;41 Seite: 731-8.
145. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 2007;38 Suppl 1 Seite: 75-80.
146. Servier SMAB. Osteon, bone cross section. 2020. (Accessed 09.05.2020, 2020, at https://smart.servier.com/smart_image/bone-structure-2/.)
147. Siebert HR, Beck A. [Trauma surgery in the elderly]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2005;76 Seite: 139-50.
148. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC medicine* 2013;11 Seite: 1-20.
149. Siewert JR, Brauer RB. *Basiswissen Chirurgie mit 101 Tabellen ; [jetzt neu mit Fallquiz]. 2., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2010 Seite: 30-33.*
150. Sikorski AR, V. Knochentransplantate in der Fußchirurgie. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochentransplantation Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 115-28.*
151. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82 Seite: 1107-12.
152. Sobotta J, Welsch U. *Lehrbuch Histologie : Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. 2., völlig überarb. Aufl., 1. Nachdr. ed. München [u.a.]: Elsevier; 2006 Seite: 127-152.*

153. Soldner E, Herr G. Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. *Trauma Berufskrankh* 2001;3 Seite: 256-69.
154. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Alzheimer C, Speckmann Hescheler K. *Physiologie [mit dem Plus im Web]*. 5. Aufl., [2. Nachdr.] ed. München [u.a.]: Elsevier; 2009 Seite: 650-662.
155. Srouji S, Livne E. Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease. *Mechanisms of ageing and development* 2005;126 Seite: 281-7.
156. Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 1995;270 Seite: 9420-8.
157. Starr AJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85 Seite: 2049-50.
158. Steinbüchel A. *Mikrobiologisches Praktikum Versuche und Theorie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2003 Seite: 409-429.
159. Stevens A, Lowe J. *Human Histology*. 3 ed. London, New York, Sydney, [u.a.]: Elsevier; Mosby; 2005 Seite: 222-246.
160. Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102 Seite: 11450-5.
161. Strom O, Borgstrom F, Kanis JA, Compston J, Cooper C, McCloskey EV, Jonsson B. Osteoporosis: burden, health care provision and opportunities in the EU: a report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of osteoporosis* 2011;6 Seite: 59-155.
162. Tapp H, Hanley EN, Jr., Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Experimental biology and medicine* 2009;234 Seite: 1-9.
163. Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C. Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *Dtsch Arztebl International* 2007;104 Seite: 1663-70.
164. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Lipogems(R) Technology Development. *Curr Stem Cell Rep* 2016;2 Seite: 304-12.
165. Unger RE, Halstenberg S, Gunther H, Sartoris A, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ. [In vitro trials with single and co-cultures of osteoblasts and endothelial cells : evaluation
138

of new biomaterials for bone reconstruction and regeneration]. *Orthopäde* 2009;38 Seite: 1020-8.

166. Vester H, Huber-Lang MS, Kida Q, Scola A, van Griensven M, Gebhard F, Nussler AK, Perl M. The immune response after fracture trauma is different in old compared to young patients. *Immun Ageing* 2014;11 Seite: 1-20.

167. Wands I, Shepherd DE, Hukins DW. Viscoelastic properties of composites of calcium alginate and hydroxyapatite. *Journal of materials science Materials in medicine* 2008;19 Seite: 2417-21.

168. Wei S, Cai X, Huang J, Xu F, Liu X, Wang Q. Recombinant human BMP-2 for the treatment of open tibial fractures. *Orthopedics* 2012;35 Seite: 847-54.

169. Weir MD, Xu HH. Human bone marrow stem cell-encapsulating calcium phosphate scaffolds for bone repair. *Acta biomaterialia* 2010;6 Seite: 4118-26.

170. Wess K-MD, A.; Schubert, M. Bankknochen im Rahmen der Umstellungsosteotomie. In: Jerosch JK, B.-D.; Pruß A., ed. *Knochentransplantation Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2012 Seite: 109-14.

171. Westhrin M, Xie M, Olderooy MO, Sikorski P, Strand BL, Standal T. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. *PLoS One* 2015;10 Seite: 1-16.

172. wikimedia. The cross-section of a bone. 2008. (Accessed 05.02.2020, 2020, at https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone_cross-section.svg.)

173. Wirth CJ, Refior HJ, Hackenbroch MH, Plitz W. [Tissue engineering in orthopedics--a gravid future concept]. *Orthopäde* 2000;29 Seite: 73-4.

174. Woodruff MA, Lange C, Reichert J, Berner A, Chen F, Fratzl P, Schantz J-T, Hutmacher DW. Bone tissue engineering: from bench to bedside. *Materials Today* 2012;15 Seite: 430-5.

175. World-Health-Organization. Global Health Observatory. World Health Organization, 2008. (Accessed 15.09.2014, 2014, at http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/overweight_obesity/atlas.html.)

176. Wu H, Xie MH, Zou P, Liu YL, He YJ. 2-Chloro-ethyl 4-nitro-benzoate. *Acta crystallographica Section E, Structure reports online* 2010;66 Seite: o2708.

177. Xia Z, Bishop J. 5.33 - Expansion of hMSCs and Their Application. In: Moo-Young M, ed. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2011 Seite: 425-36.
178. Xie M, Olderoy MO, Andreassen JP, Selbach SM, Strand BL, Sikorski P. Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks. *Acta biomaterialia* 2010;6 Seite: 3665-75.
179. Zhao L, Weir MD, Xu HH. Human umbilical cord stem cell encapsulation in calcium phosphate scaffolds for bone engineering. *Biomaterials* 2010;31 Seite: 3848-57.
180. Zou J, Wang G, Geng D, Zhu X, Gan M, Yang H. A novel cell-based therapy in segmental bone defect: using adipose derived stromal cells. *The Journal of surgical research* 2011;168 Seite: 76-81.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gliederung des Röhrenknochens, modifiziert nach Wikimedia (wikimedia 2008).....	9
Abbildung 2: Aufbau des Knochens, modifiziert nach Servier Medical Art (Servier 2020)	11
Abbildung 3: Einzelne Phasen der Knochenbildung im Bereich des Röhrenknochens, modifiziert nach Lindsay M. Biga et al. (Biga 2020).....	12
Abbildung 4: Phasen des Knochenumbaus, sowie Zellen im Knochen, modifiziert nach Lisowska et al. (Lisowska, Kossonet al. 2018)	14
Abbildung 5: Anordnung der Zellen des Knochens innerhalb eines Osteons, modifiziert nach Designua (Designua 2020).....	15
Abbildung 6: Abfolge der einzelnen Phasen der Frakturheilung; A: Initiale Verletzungsphase; B: Entzündungsphase; C: Phase der Kallushärtung; D:Remodelling-Phase (Niethard, Pfeilet al. 2009).....	17
Abbildung 7: Übersicht der Klassifikation der Pseudarthrosen nach Runkel & Rommens(Runkel and Rommens 2000).....	21
Abbildung 8: Das Diamond Concept der Frakturheilung (Giannoudis, Einhornet al. 2007)	23
Abbildung 9: Ohrmaus (Cao, Vacantiet al. 1997).....	31
Abbildung 10: Differenzierungspotential von SC, modifiziert nach Betts et al. (Gordon J. Betts 2013).....	37
Abbildung 11: Differenzierungs- und Verwendungspotential von AdMSC modifiziert nach Bunnell, Flat et al. (Bunnell, Flaetet al. 2008)	43
Abbildung 12: weltweite prozentuale Prävalenz von Übergewicht (BMI > 25) bei über 20 jährigen beider Geschlechter (World-Health-Organization 2008)	44
Abbildung 13: Schritte der Gewinnung von AdMSC aus Lipoaspirat (Gimble, Katzet al. 2007).....	45
Abbildung 14: Chemischer Aufbau von Alginat (Steinbüchel 2003)	46
Abbildung 15: Dokumentationszettel der während der Kultur eingekapselter Zellen verwendet wurde und den Zeitlichen Ablauf widerspiegelt. Rot umrandet sind wichtige Informationen zur vorliegenden Zelllinie. Blau umrandet ist der jeweilige Tag der Zellkultur und Grün umrandet die durchgeführte Aktion. Ist das am jeweiligen Tag stehende Kästchen für die Aktion hell, wird die Aktion an diesem Tag vorgenommen.	

Vermerkt sind der Wechsel des Kulturmediums, die Alizarin-Rot-Färbung, die Alamar-Blau-Färbung, die Alkalische Phosphatase-Aktivitätsmessung, die Isolation von RNA aus den Zellen, die Live-Dead-Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie, die Lichtmikroskopie mit Fotodokumentation und das Einfrieren einer Probe.	50
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Bead-Generators und Einkapselvorganges nach Xie et al. (Xie, Olderoyet al. 2010).....	66
Abbildung 17: Standardkurve der AP-Messung. Auf der y-Achse ist die Absorption und auf der x-Achse die Aktivität in $\mu\text{M}/\text{min}$ aufgetragen.	81
Abbildung 18: Alizarin-Rot-Standardkurve. Auf der y-Achse ist die optische Dichte (OD) und auf der x-Achse die Konzentration (C) in μM aufgetragen.....	84
Abbildung 19: Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahme der Fettstammzellen des Spenders 156 am 07.02.2011 dem 21. und letzten Kulturtag.....	86
Abbildung 20: Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahme der Fettstammzellen des Spenders 156 am 07.02.2011 dem 21. und letzten Kulturtag, nachdem die Aufnahme invertiert und ein Schwarzabgleich durchgeführt wurde.....	86
Abbildung 21: LM Aufnahmen der Osteoblasten an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21.....	94
Abbildung 22: LM Aufnahmen der Knochenmarkstammzellen an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21	96
Abbildung 23: LM Aufnahmen der Fettgewebstammzellen an den Tagen 1, 6, 11, 16 und 21	97
Abbildung 24: LM Aufnahmen der leeren Beads in MSC-Differenzierungsmedium an den Tagen 1, 11 und 21, von oben nach unten.	98
Abbildung 25: OSÜ, von oben nach unten Tag 1, Tag 10 und Tag 20. Links die repräsentativen lichtmikroskopischen Aufnahmen, rechts das jeweils zugehörige Live-Dead-Overlay.....	99
Abbildung 26: BMSC, von oben nach unten Tag 1, Tag 10 und Tag 20. Links die lichtmikroskopischen Aufnahmen, rechts das jeweils zugehörige Live-Dead-Overlay....	101
Abbildung 27:AdMSC, von oben nach unten Tag 1, Tag 10 und Tag 20. Links die lichtmikroskopischen repräsentativen Aufnahmen, rechts das jeweils zugehörige Live-Dead-Overlay.....	103
Abbildung 28: Alamar-Blau-Messwerte; AdMSC entsprechen hierbei den Fettstammzellen, OSÜ den Osteoblasten und BMSC den Knochenmarkstammzellen. Nach rechts aufgetragen ist jeweils der zeitliche Verlauf in Tagen (d) erkennbar, nach oben die Viabilität in %. Für die Osteoblasten gilt N = 5 Spender, für die BMSC gilt N = 4 Spender	

und für die AdMSC gilt N = 6 Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.....	105
Abbildung 29: Graphische Darstellung der AP-Aktivität im Zeitverlauf. Nach rechts ist hierbei die Zeit und nach oben die Aktivität in μM aufgetragen. OSÜ entsprechen den Osteoblasten, BMSC den Knochenmarkstammzellen und AdMSC den Fettstammzellen. Für die Osteoblasten gilt N = 5 Spender, für die BMSC gilt N = 4 Spender und für die AdMSC gilt N = 6 Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.	107
Abbildung 30: Graphische Darstellung der Mineralisation. Nach rechts ist hierbei die Zeit und nach oben die Alizarin-Rot-Konzentration pro Bead in μM aufgetragen. OSÜ entsprechen den Osteoblasten, BMSC den Knochenmarkstammzellen und AdMSC den Fettstammzellen. Für die Osteoblasten gilt N = 5 Spender, für die BMSC gilt N = 4 Spender und für die AdMSC gilt N = 6 Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.	109
Abbildung 31: Graphische Darstellung der IntDen im Zeitverlauf. Nach rechts sind hierbei die Tage und nach oben der von Image J ausgegebene Messwert für die IntDen aufgetragen. OSÜ entsprechen den Osteoblasten, BMSC den Knochenmarkstammzellen und AdMSC den Fettstammzellen. Für die Osteoblasten gilt N = 5 Spender, für die BMSC gilt N = 4 Spender und für die AdMSC gilt N = 6 Spender. Pro Spender und Tag erfolgten jeweils 3 Messungen.....	110

8 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Professor Nüssler bedanken, dass er mir durch Überlassen dieser Arbeit diese überhaupt ermöglicht hat und diese trotz aller Verzögerungen bis zum Ende betreut hat. Zudem möchte ich mich bei Frau PD Dr. Sabrina Ehnert bedanken, dass Sie mich in die Grundsätze des experimentellen Arbeitens eingeführt hat. Selbiges gilt für Herrn Dr. Magnus Olderoy vom *NTNU Trondheim*, vor allem in der Anfangsphase der experimentellen Arbeit war er eine unverzichtbare Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei den norwegischen Kooperationspartnern des Nanoinstitutes *der NTNU Trondheim* bedanken, die mit Know-how sowie Equipment überaus hilfreich waren.

Mein ausdrücklicher Dank gilt darüber hinaus Herrn Professor Dr. Peter Biberthaler, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der TU-München.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Dr. van Griensven, welcher diese Arbeit bis zum Schluss geduldig und hilfsbereit begleitete und ohne dessen Unterstützung sie nicht fertig geworden wäre.

Mein Dank gilt auch dem Team der unfallchirurgischen Forschung, insbesondere Herrn Fritz Seidl, für die stetige Unterstützung mit Rat und Tat sowie meiner Co-Doktorandin, Francesca von Matthey, für die tolle Zusammenarbeit.

Als letztes gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, ohne die ich heute nicht der wäre, der ich bin und ohne die es diese Arbeit ebenfalls nicht geben würde.