
Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie der
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Einfluss des Sonic Hedgehog Proteins (rekombinant,
n-terminal) auf das Wachstum und die Differenzierung
von humanen mesenchymalen Stammzellen in invitro-
Kulturen.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Christian Brüning

aus Frankfurt am Main

Mainz 2019

Wissenschaftlicher
Vorstand : Datenschutz

1. Gutachter: Datenschutz

2. Gutachter: Datenschutz

Tag der Promotion: 09.07.2019

**für meine verstorbene Mutter und meinen Vater,
für meine Frau**

Inhaltsverzeichnis

Kapital 1: Einleitung

1	Einleitung und Historische Einordnung	1,2
1.1	Gelenke	4
1.1.1	Aufbau und Funktion	4
1.2	Knorpelgewebe	6
1.2.1	Aufbau und Funktion von Knorpelgewebe	6
1.3	Gelenkerkrankungen	7
1.4	Was ist eine Arthrose?	10
1.4.1	Pathomechanismen	11
1.4.2	Klassifikation der Knorpeldefekte	12
1.4.3	Diagnostische und kurative Angriffspunkte	12
1.5	Heilverfahren	13
1.5.1	Nicht-operative Verfahren	13
1.5.2	operative Verfahren	14
1.5.2.1	Verfahren ohne aktives Einbringen von Zellen oder biologischen Substanzen	14
1.5.2.1.1	Lavage und Arthroskopie	14
1.5.2.1.2	Knorpel-Glättung mit Shaver	15
1.5.2.1.3	Debridement	15
1.5.2.1.4	Abrasio /Chondroplastik	15
1.5.2.1.5	Pridie-Anbohrung	16
1.5.2.1.6	Mikrofrakturierung	16

1.5.3 Verfahren mit interventionellem, erweitertem Einsatz von chirurgischen Methoden	16
1.5.3.1 Osteotomie	17
1.5.3.2 Distraction von Gelenken	17
1.5.3.3 Gelenkendoprothesen	17
1.5.4 Verfahren mit aktivem Einbringen von Zellen oder biologischen Substanzen	18
1.5.4.1 Hyaluronsäure-Spritzen	18
1.5.4.2 Autologe Gewebetransplantation (ACI)	18
1.5.4.3 Scaffold- (Gerüst-) basierte (3D)- Autologe Gewebetransplantation	19
1.5.4.4 Matrix-induzierte autologe Chondrozyten Implantation (MACI)	20
1.5.4.5 Thrombozytenreiches Plasma (PRP)	20
1.5.4.6 Osteochondrale Transplantation (Mosaik-Plastik)	21
1.5.5 Tissue Engineering	22
1.5.5.1 Grundlagen	22
1.5.5.2 Matrices	22
1.5.5.3 Zellen in Suspension	23
1.5.5.4 Stromazellen aus dem Knochenmark	23
1.6 Chondrogenese	24
1.7 Stammzellen	25
1.7.1 Klassifikation	25
1.7.2 Humane mesenchymale Stammzellen	26
1.8 Signalproteine/ Wachstumsfaktoren	28
1.8.1 Transforming Growth Faktor (TGF-Superfamilie)	28
1.8.1.1 Signalwege der TGF- β Superfamilie	28
1.8.1.2 Transformierender Wachstums-Faktor β -1 (TGF- β -1)	30
1.8.2 Hedgehog Protein-Familie	32
1.8.2.1 Sonic Hedgehog Protein Funktionen	32
1.8.2.2 Sonic Hedgehog Protein	33
1.8.2.3 Hedgehog-Signalweg	34
1.8.2.4 Die morphogenen Eigenschaften von Sonic Hedgehog Protein	36

1.8.2.5 Sonic Hedgehog und Erkrankungen	37
1.9 Zielsetzung der Versuche	38
Kapitel 2: Material und Methoden	40
2.1 Methoden	40
2.1.1 Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)	40
2.1.2 Lösen und Passagieren von Zellen aus Zellflaschen mit Trypsin-EDTA	42
2.1.3 Einfrieren von Zellen bei -80°C	43
2.1.4 Auszählen der Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops und Zählkammer	45
2.1.5 Auszählen der Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops (computergestützt)	45
2.1.6 Anlegen einer Wachstumskurve mit 6-Loch Platte	45
2.1.7 Anlegen eines Wachstums-Assays mit einer 6-Loch Platte	46
2.1.8 Färbung mit Alzianblau nach Mowry	47
2.1.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	48
2.1.10 Färbung mit Trypanblau	48
2.1.11 Immunhistochemische Färbung gegen Aggrecan	50
2.1.12 Immunhistochemische Färbung gegen 5-Bromo-2`-deoxyuridin (BrdU)	51
2.1.13 Real-Time Poly-Chain-Reaktion (RT-PCR)	52
2.1.14 Anlegen einer Mikro-Pallet-Kultur	54
Kapitel 3: Resultate und Ergebnisse	56
3.1 Trypanblau-Färbung	57
3.2 Qualifizierung der humanen mesenchymalen Stammzellen mittels RT-PCR	57
3.3 Zeit- und Dosis-/ Wirkungsprofil von rekombinantem, n-terminalem Sonic Hedgehog Protein	59
3.4 Versuchsreihen/ Wachstumskurven mit TGF-β und Sonic Hedgehog Protein in 6-Wells für 21 Tage	59
3.5 Wachstums-Assays mit TGF-β und Sonic Hedgehog Protein in 6-Wells für 3 Tage Versuchsreihe	64
3.6 Wachstumsnachweis und Färbung mit 5-Bromo-2`-deoxyuridin (BrdU)	70
3.7 Färbungen mit Alzian-Blau	72
3.8 Färbungen mit Anti-Aggrecan	73
3.9 Qualifizierung des chondrogenen Wachstums mit RT-PCR	75

3.10	Mikropellet-Kulturen mit hMSCs	75
Kapitel 4: Diskussion		77
4.1	Ergebnis-Interpretation	79
4.1.1	Beantwortung/Diskussion der wissenschaftlichen Fragestellung 1	79
4.1.2	Beantwortung/Diskussion der wissenschaftlichen Fragestellung 2	83
4.1.3	Beantwortung/Diskussion der wissenschaftlichen Fragestellung 3	84
4.2	Fehleranalyse in der Gewebsgewinnung und Präparation	85
4.3	Mikropellet-Kulturen und 3-D Wachstum	86
Kapitel 5: Zusammenfassung (deutsch/englisch)		88/89
Kapitel 6: Quellenverzeichnis		90
6.1	Literaturverzeichnis	91
6.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis, Datensätze	109
6.3	Abkürzungen	120
Kapitel 7: Anhang		123
7.1	Verbrauchsmaterialien	124
7.2	Erklärung	132
7.3	Danksagung	133
7.4	Lebenslauf	135

Kapitel 1:

Einleitung

1 Historische Einordnung

Schon bei den Griechen und Römern, aber auch in Ägypten, wurden viele Erkrankungen beschrieben, die sich in vielfältiger Weise an den Gelenken des menschlichen Körpers zeigten. Neben der auch damals schon bekannten und beforschten Gicht, aber auch den vielen verschiedenen Formen von Wirbelsäulendeformitäten, wurde auch über die Arthrose und deren Folgen geschrieben und man versuchte, diese zu behandeln. Meist kam man mit den Bemühungen kaum über das krankheitsbeschreibende Stadium hinaus.

Obgleich die damaligen Gelehrten wenig Wissen von den pathophysiologischen Hintergründen der Erkrankung hatten, so konnten sie trotzdem auf kleine Erfolge mit diversen thermischen Verfahren und Salbenverbänden verweisen, die zumindest vorübergehend die Krankheitsverläufe verbesserten und bei dem alternden Patientenkollektiv Linderung vermittelten. Dies zielte aus unserem heutigen Verständnis natürlich nur auf eine symptomatische, unspezifische Verbesserung der äußerlichen Zeichen wie Rötung, Schwellung, Erguss oder Entzündung hin. Trotzdem gab es erste Formen und Versuche mit Exo- und Endoprothesen. Ein Vergleich mit den heute verwendeten Prothesen fällt allerdings schwer. Operationen nach heutiger Vorstellung wurden, wenn überhaupt, nur im ganz kleinen Rahmen durchgeführt, da die möglichen Risiken einer Operation und deren Komplikationen zu dieser Zeit bei weitem häufiger und noch nicht gut behandelbar waren. Wenn bei den damaligen Patienten die Schmerzen zu stark wurden, musste man die Gliedmaße häufig amputieren, um die Schmerzen zu nehmen. Die Altersstruktur, wie wir sie heute vorfinden, entsprach in keinsten Weise der damaligen. Eine Behandlung zwar im Fokus der Ärzte, steht aber nicht an vorrangiger Stelle. Dies waren somit schlecht behandelbare Erkrankungen, deren Schmerzen man im Alter häufig ausgesetzt war.

Im Mittelalter finden sich wenig Aufzeichnungen und weitere Entwicklungen auf dem Gebiet der Behandlung von Arthrose und deren Begleitsymptomen. Tatsächlich muss man wohl als Anfangspunkt einer suffizienten Arthrosetherapie die sich weiter entwickelnde Chirurgie nehmen. Im Rahmen von großen Kriegen, wie dem deutsch-französischen Krieg von 1870/71 oder dann dem 1. und 2. Weltkrieg, entwickelten z.B. Ferdinand Sauerbruch oder Konrad Bielsalski zunächst die gut-funktionierenden Exoprothesen, aber auch schon Teilendoprothesen wie die "Sauerbruch-Endoprothese" oder die "Fischer-Hand" für die vielen Verehrten der Kriege.

Natürlich sind auch diese Prothesen noch nicht mit den heutigen Möglichkeiten vergleichbar,

aber sie gaben schon damals die Richtung vor. Was die "Fischer-Hand" zum Teil manuell-mechanisch konnte, wird heutzutage mit myoelektrischer Ansteuerung und Elektroden durchgeführt.

Die Endoprothetik aus heutiger Sicht hat ihren Anfang Mitte des 19. Jahrhunderts genommen. Den Versuch, Gelenkoberflächen durch Weichteilinterposition oder Resektion und Glättung funktionell wiederherzustellen, gibt es also erst seit einem überschaubaren Zeitraum. Ein tatsächlicher Fortschritt bei der Endoprothesenbehandlung stellte sich erst durch verbesserte Narkoseverfahren und aseptische Wundversorgung ein. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelt Themistocles Gluck eine Prothese aus Elfenbein.¹ Fixiert mit Gips und Geigenharz war diese Konstruktion durch Lockerung und schwere Infektion noch nicht für die Therapie am Menschen geeignet. Nichtsdestotrotz finden sich auch heute noch Teile seines Konzepts in den modernen Prothesen.¹ Auch die Interposition von Fett und Faszie in den Gelenkspalt, wie von Murphy 1914² und von Putti 1920³ versucht, brachten keinen Erfolg in der Bekämpfung der Arthrose.

In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde begonnen, körperfremde metallische Materialien in Hüft- und Kniegelenke einzubringen.

Heute werden prothetische Verfahren gewählt, die kleinstmögliche Entnahme von Knochen und Knorpel gewährleisten, um die individuell vorhandenen physiologischen und anatomisch-mechanischen Verhältnisse nach Möglichkeit zu erhalten.

Alle bis zum heutigen Tag entwickelten und funktionierenden Verfahren sind so konzipiert, dass im Rahmen der degenerativen Erkrankungen, zu denen die Arthrose zählt, Knorpelgewebe durch Abnutzung in einem schleichenden Prozess zerstört wird. Das symptomatische, schmerzlindernde Konzept der Prothesenimplantation soll in Zukunft durch ein auf der Zellebene ansetzendes Konzept ersetzt werden. Viele der aktuellen wissenschaftlichen Bemühungen zielen nicht mehr auf die operative Entfernung von Knorpelgewebe, sondern dessen Regeneration und in vitro- bzw. in vivo-Neubildung. Dies wird unter dem Begriff des modernen „Tissue engineering“ zusammengefasst, zu dem in der Folge in dieser Arbeit noch berichtet wird.

Um dieses Ziel zu erreichen, bedient man sich heutzutage bei den hochwertigen toti- oder pluripotenten, mesodermalen Stammzellen, um die Entwicklung von Knorpelgewebe zu ermöglichen.

1.1 Gelenke

Als Gelenke werden Knochenverbindungen bezeichnet, die entweder kontinuierlich über Bindegewebe, Knorpel oder diskontinuierlich über einen Gelenkspalt miteinander verbunden sind. Man unterscheidet zwischen Synarthrosen wie Syndesmosen, Synchronosen, Synostosen und die Hemiarthrosen voneinander, die sich vor allem in der Bindegewebsart der Verbindung unterscheiden.

Das Gegenstück dazu sind die Diarthrosen. Zu ihnen zählen die großen Gelenke des menschlichen Körpers wie Knie- oder Hüftgelenk.

Es gibt einfache und komplexe Gelenkverbindungen. Man unterscheidet ebene (Intervertebralgelenke) von ein- (Mittel- und Endglieder des Fingers), zwei- (Handgelenk) und dreiachsige (Hüft oder Schulter) Gelenke voneinander.

1.1.1 Aufbau und Funktion eines Gelenks

Diarthrosen zeichnen sich durch verschiedene Merkmale aus. Wichtigstes Kriterium ist der Gelenkspalt, den man als variablen Spielraum in einem komplex miteinander harmonisierenden Bewegungssystem bezeichnen kann. Mit ihm wird die eigentliche Funktion des Gelenks vermittelt: die Beweglichkeit. Zusätzlich spielt er eine wichtige Rolle bei der Kraftaufnahme und -übertragung. Wenn die Beweglichkeit des Gelenks von Natur aus stark eingeschränkt ist, spricht man von Amphiarthrose.

Weitere wichtige Anteile der Diarthrosen sind der Gelenkknorpel, die Gelenkkapsel, die Gelenkhöhle, die Gelenkbänder sowie Sonderstrukturen wie Disci articulares oder Labra glenoidalia.

Der Gelenkknorpel kleidet die Gelenkflächen aus. Die jeweilige Schichtdicke ist abhängig von der individuellen Belastung des Gelenks durch Zug und Druck, aber auch von Scherkräfte.

Die Gelenkkapsel umschließt das Gelenk allseitig und ist als eine Fortsetzung des Periostschlauches (Bindegewebsschlauch) anzusehen. Die Kapsel unterteilt sich in eine Membrana fibrosa (äußere Schicht) und eine Membrana synovialis (spezifische Innenschicht) mit guter Durchblutung.

Die Gelenkhöhle oder auch kapillärer Spalt enthält die Gelenkschmiere (Synovia). Diese dient als Gleitmittel und Ernährung des gefäßlosen Gelenkknorpels. An der Bildung der

proteolytischen, hyaluronsäurehaltigen, schleimartigen Flüssigkeit sind die Fibrozyten der Membrana synovialis beteiligt.

Die Gelenkbänder sichern die Führung der Gelenke während der Bewegung und verhindern somit abnorme Bewegungsmuster. Sie begrenzen das Bewegungsausmaß des jeweiligen Gelenks. Den Zusammenschluss der Gelenkflächen bewerkstelligen sie allerdings nicht. Dies wird durch Zugkräfte der über dem Gelenk entlang ziehenden Muskeln ermöglicht.

Sonderstrukturen wie Discus articulares haben Druck und Polsterfunktion. Labra glenoidalia bestehen aus teils sehnigem, aber auch faserknorpeligem Gewebe und vergrößern als verformbarer Ringwulst die Schultergelenkspfanne auf das zwei- bis vierfache der eigentlichen knöchernen Ausmaße.

Um das Funktionieren eines Gelenks zu ermöglichen, ist eine sehr gute Gefäßversorgung und Innervation notwendig. Diese ist in Gelenken reichlich vorhanden. Vor allem die Synovialmembran ist stark kapillarisiert. Das einströmende Blut kommt meist aus Gefäßgeflechten und dem Gelenkkopf.

Zahlreiche afferente Nerven finden sich im Stratum fibrosum der Gelenkkapsel zur Wahrnehmung der Tiefen- und Schmerzsensibilität. Die Schmerzempfindlichkeit von Gelenken ist deshalb relativ hoch.

Gelenkbeweglichkeit ist abhängig von Training oder Ruhigstellung. Die Bewegung eines Gelenks führt zu Umfangssteigerung des Bewegungsausmaßes oder auch Ausbreitung von überknorpelten Berührungsflächen. Gelenkkapselabschnitte werden ausgeweitet und Hemmungsbänder verlängert.

Im Gegensatz dazu kommt es bei Ruhigstellung eines Gelenks zur Schrumpfung von Kapsel und Bandapparat, Verklebung von Synovialmembranen, Lösung von Fibrozyten und Verschmelzung der synovialen Oberflächen. Es folgt daraus eine Bewegungseinschränkung.

Inbegriffen in die Degeneration sind natürlich auch die hyalinen Knorpelgewebe. Eine Regeneration ist, aufgrund des Fehlens des zur Versorgung notwendigen Perichondriums, nicht möglich. Reparatur an diesen Stellen geschieht durch niedriger wertigen Faserknorpel. Auch die Bänder oder Kapseln sowie Menisken sind schlecht versorgte, bradytrophe Gewebe, deren Regeneration nach traumatischer Läsion oft lange Zeiträume in Anspruch nimmt.

Degenerative Veränderungen, die im Alter, aber auch bei mangelnder Bewegung auftreten, führen zur Gelenkabflachung und Knorpelverkalkung oder Knorpelproliferation in den Randpartien.^{4,5,158}

1.2. Knorpelgewebe

Knorpelentwicklung beginnt mit dem Zusammenrücken von Mesenchym-Zellen, die ihre Fortsätze einziehen. Es steht der prächondrale Knorpel. Die beteiligten Zellen bilden große Mengen an rauhem, endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparaten und Mitochondrien. Sie beginnen Tropo-Kollagen zu bilden und werden als Chondroblasten bezeichnet. Die Chondroblasten geben ihre Interzellulärsubstanz in allen Richtungen ab und bilden so Zelloberflächen um sich. Die Zellen driften durch die großen Mengen an Interzellulärsubstanz immer weiter voneinander weg und es entsteht das eigentliche Knorpelgewebe. Der Vorgang wird als interstitielles Knorpelwachstum bezeichnet und findet nur bei der initialen embryonalen Knorpelbildung statt. Später bezeichnet man das Wachstum als appositionell, weil die Knorpelzellen von der Knorpeloberfläche aus wachsen. Knorpelgewebe wächst an Stellen im Körper mit hohen Zug- und Scherkräften.^{4,6,152,153,154}

1.2.1 Aufbau und Funktion von Knorpelgewebe

Reifer Knorpel besteht aus Chondrozyten und Interzellulärsubstanz, der sogenannten Matrix. Knorpelzellen liegen häufig in einer Knorpelhöhle, die von einem Knorpelhof umgeben ist. Die Zellen, die zusammen in einer Höhle liegen, werden als isogene Zellgruppe bezeichnet, da sie aus der Zellteilung der pluripotenten Knorpelzellen hervorgegangen sind. Die Wand der Knorpelzelloberfläche wird als Knorpelkapsel bezeichnet. Zusammen bilden Knorpelzelloberfläche, Kapsel und Hof ein Chondrom. Junge und alte Knorpelzellen unterscheiden sich voneinander. Junge Zellen sind flach und liegen häufig subperichondral, während ältere Zellen meist im Knorpelinneren liegen und voluminös und hypertrophiert sind.

Die zweite wichtige Komponente des Knorpelgewebes ist die Interzellulärsubstanz. Sie besteht aus faserigen Proteinen wie Kollagen Typ II und Glykanen wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Diese machen entsprechend ihrer Konzentration innerhalb der jeweiligen Knorpeltypen deren Festigkeit aus. Knorpelgewebe ist gefäß- und nervenfrei. Die Ernährung der Zellen erfolgt durch Diffusion von der Knorpeloberfläche her bzw. aus der Gelenkflüssigkeit. Gelenkflüssigkeit (Synovia) ist ein Ultrafiltrat des Serums zu dem die Synovialzellen beigemischt sind. Knorpelgewebe ist bradytrophes Gewebe. Ein Perichondrium, wie man es bei der Knorpelentwicklung findet, gibt es beim Gelenkknorpel nicht. Somit ist ein weiteres Knorpelwachstum physiologisch nicht möglich.

Knorpelgewebe gehören zu den geformten Stützgeweben. Dies ist aufgrund seiner Interzellulärsubstanz möglich. Die besondere Eigenschaft des Knorpels ist die Druck- und Biegeelastizität. Knorpel findet auch bei großer Belastung und Torquierung seine vorgegebene Form wieder. Dies ist eine günstige Eigenschaft, um das Gleiten in Gelenken zu vereinfachen. Knorpelgewebe besteht bis zu 70% aus Wasser. Im Alter nehmen der Wassergehalt des Knorpelgewebes und somit auch die Elastizität ab. Es werden drei Zonen im Knorpelgewebe unterschieden: 1. Superfizielle, 2. transitionale und 3. tiefe Zone. Sie werden mit 1. 10%, 2. 40-60% und 3. 40% Anteil an der Knorpelzusammensetzung angegeben.^{158,159}

Im menschlichen Körper werden drei verschiedene Gruppen von Knorpeltypen unterschieden. Es handelt sich um Faserknorpel, hyalinen und elastischen Knorpel.

Die Knorpeltypen unterscheiden sich in der Lage der Chondrozyten im Gewebe, der Grundsubstanz, der Elastizität und ihrer Lage im Körper. Der häufigste im Menschen vorkommende Knorpeltyp ist der hyaline Knorpel. Er ist makroskopisch von bläulich-milchiger und glasiger Erscheinung.¹⁵⁵

Im Faserknorpel liegen die Chondrozyten in kleinen Gruppen zusammen, die Grundsubstanz enthält wenig Matrix, dafür aber viele Kollagenfasern vom Typ I und II. Im Vergleich ist Faserknorpel wenig elastisch. Faserknorpel kommt aufgrund seiner Eigenschaften in der Symphyse, den Disci intervertebralis oder auch im Kiefergelenk vor.

Hyaliner Knorpel hingegen besteht aus isogenen Zellgruppen, ist reich an Matrix mit Kollagen Typ II, sehr druckelastisch und man findet ihn in Rippenknorpel, Trachealknorpel oder dem Kehlkopf sowie vielen Gelenken.¹⁵²

Elastischer Knorpel ist selten im menschlichen Körper zu finden. Er ist dem hyalinen Knorpel ähnlich. Ausgezeichnet durch hohe Elastizität aufgrund von zusätzlichen elastischen Fasern und reichlicher Matrix sowie Kollagen Typ II findet man ihn in den Ohrmuscheln oder dem Kehlkopf.^{4,6, 156, 157, 160}

1.3 Gelenkerkrankungen

Unter den Begriff Gelenkerkrankungen lassen sich viele verschiedene Erkrankungen des Menschen subsumieren. Hierunter fallen degenerative, neurogene, entzündlich-rheumatische, metabolische, hämophile Arthropathien und Gelenkchondromatosen.

Besonders häufig sind die degenerativen und entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.

Bei den degenerativen Gelenkerkrankungen unterscheidet man die primären und sekundären Arthrosen. Die verschiedenen Arten der Arthrosen werden im Kapitel 1.4 noch ausführlich besprochen.

Bei den neurogenen Gelenkerkrankungen lässt sich vor allem die tabische Arthropathie hervorheben. Sie kann als der Prototyp des Erkrankungsmusters bezeichnet werden. Häufig ist es die Spätform der Erkrankung, die das spezifische Bild ausprägt. Aber auch eine Syringomyelie und diabetische Neuropathie können das Bild der neurogenen Gelenkerkrankungen ausbilden. Auslösende Faktoren sind tropische Schäden an Nerven und chronische Traumatisierung infolge von fehlender Tiefensensibilität. Auffällig ist die Diskrepanz von wenig empfundenem Schmerz zu stark fortgeschrittener Gelenkzerstörung. Häufig wird hier nur eine Besserung durch Operation erreicht.

Ein großes und vor allem vielfältiges Bild zeigen die Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Es werden entzündlich-rheumatische von degenerativ-rheumatischen und rheumatischen Weichteilerkrankungen unterschieden. Bei den entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wird weiterhin eine Unterteilung abhängig vom Gelenkbefall vorgenommen: monartikulär, oligoartikulär und polyartikulär. Eine weitere Klassifikation unterteilt in akute, chronisch-juvenile und chronisch-adulte Erkrankungen.

Zu den degenerativ-rheumatischen Erkrankungen werden auch bei den genannten Klassifikationen die Arthrosen gezählt.

Die Ursachen von vielen rheumatischen Erkrankungen ist immer noch unbekannt. Die Wissenschaft hat dieses Feld von immunologischen Erkrankungen in den letzten Jahren aber deutlicher in den Mittelpunkt der Bemühungen gerückt und so entsteht heute ein etwas differenzierteres Bild zu dieser großen Anzahl an Erkrankungen.

Zu nennen ist hier vor allem der Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF Alpha). Es handelt sich hier um ein Zytokin, das eine wichtige Rolle bei Inflammation, der protektiven Immunantwort sowie der Entstehung und Aufrechterhaltung der sekundären lymphatischen Organe spielt. Darüber hinaus ist TNF Alpha auch an für den Organismus zum Teil schädlichen Effekten beteiligt. Dazu zählen Sepsis, Fieber und Autoimmunerkrankungen¹⁶¹. Früher als Kachektin bezeichnet, gehört TNF- α zur Tumor-Nekrose-Faktor / Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie (TNF/TNFR) von der mittlerweile mehr als 40 Mitglieder bekannt sind. Zum größten Teil werden sie von Immunzellen exprimiert.¹⁶²

TNF- α wird als monomeres Transmembranprotein (mTNF) synthetisiert und dann

proteolytisch zu einem löslichen homotrimeren Zytokin (sTNF) mit einem Gewicht von 51 kD gespalten. Beide Formen sind biologisch aktiv^{163,164}. TNF- α wird vor allem von aktivierten Makrophagen, aber auch von Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen und NK-Zellen sowie Endothelzellen produziert.

Viele der entzündlich-rheumatischen Erkrankungen haben eine genetische Disposition und stehen in Verbindung mit einem Antigen gegen das HLA-System des eigenen Körpers. Zum Beispiel sind HLA-B27 assoziierte Arthropathien ein Startpunkt für die bakterielle Infektion mit Yersinien, Chlamydien oder Campylobacter oder auch virale Infektionen mit Coxsackie B oder Borrelien. Man unterscheidet viele verschiedene Stadien der Erkrankung voneinander. Zunächst entwickelt sich eine proliferative Phase, in der es zu einer entzündlichen Veränderung der Synovialis, der Bursen und Sehnen kommt. Im folgenden Stadium, der destruktiven Phase, werden Knorpel und Knochen zerstört. Es kommt zusätzlich zu einer Bänderdehnung und Deformitäten. Als 3. Stadium folgt die Degeneration in Form von Arthrose und das Endstadium wird als "ausgebrannte" Phase bezeichnet. Der entzündliche Prozess steht, aber die Degeneration schreitet voran. Charakteristisches Symptom ist der Ruheschmerz.

Eine weitere häufige Erkrankung ist die chronische Polyarthrose auch als rheumatoide Arthritis bezeichnet. Sie ist als systemische Erkrankung mit den Merkmalen polyartikulärer Befall, symmetrische Verteilung und Chronizität klassifiziert. Unter chronischer Polyarthrose werden eine Vielzahl Erkrankungen subsummiert. Diese treten gehäuft an den großen Gelenken, aber wie schon erwähnt auch symmetrisch an allen anderen Gelenken auf. Zu den Kriterien der Erkrankung zählen: Morgensteifheit, Arthritis von drei und mehr Gelenkregionen, symmetrischer Befall, Arthritis an den Gelenken der Hand, Rheumaknoten, nachweisbare Rheumafaktoren und radiologisch-typische nachweisbare Veränderungen.

Um die schon erwähnte Assoziation zu HLA B27 zu verdeutlichen, sollen hier noch einige Beispiele genannt werden, wie der M. Bechterew, Arthritis psoriatica und das Reiter-Syndrom. Bei der Spondylarthrose M. Bechterew kommt es zu einer zunehmenden Versteifung des Wirbelsäule und Sacroiliakalgelenke. In 95% der Fälle ist eine Verbindung zu HLA B27 zu finden. Auch bei der Arthritis psoriatica findet sich ein großer Anteil an HLA B27 positiven Patienten trotz der Tatsache, dass die Rheumafaktoren negativ sind. Sichtbares Zeichen der Erkrankung sind die mit der Arthritis verbundenen Hauteffloreszenzen. Der M. Reiter ist eine Symptomatik aus: Balanitis, Keratodermatitis, psoriatiforme Hautveränderungen und Mono- bzw. Oligoarthritis. Auch diese ist zu 80% HLA B27

assoziiert. Der M. Reiter wird als postinfektiöse und reaktive Arthritis bezeichnet.

Eine weitere Gruppe von Gelenkerkrankungen sind die metabolischen Arthropathien. Einer der Hauptvertreter ist die Gicht, eine Gelenkveränderung bei Hyperurikämie. Dies führt zu Einlagerung von Uratkristallen in Stütz- und Bindegewebe und entsprechende Beschwerdesymptomatik. Es wird ein akutes von einem chronischen Geschehen sowie primäre und sekundäre Formen unterschieden. Akutes Geschehen zeigt sich zum Beispiel durch Podagra des Fußes und chronisches durch Auftreten von Gichttophi am Körper.

Als Pseudogicht wird die Einlagerung von Kalziumpyrophosphatkristallen bezeichnet. Auch sie führt zu vergleichbaren Beschwerden wie die Gicht mit Rötung, Schwellung, Erguss und Schmerzen.

Zu den selteneren Gelenkerkrankungen zählt die hämophilie-assoziierte Arthropathie. Durch die wiederholten Einblutungen in die Gelenke kommt es zu einer Minderversorgung der Knorpel- und Gelenkflächen durch Synovialflüssigkeit. Diese führt schon im Kindesalter zur Verschlechterung der Konsistenz des Gelenkknorpels mit daraus folgenden Deformitäten und Achsenveränderungen der betroffenen Gelenke.

Zuletzt soll hier auch auf die Gelenkchondromatosen hingewiesen werden. Es handelt sich hierbei um eine gutartige, metaplastische Umwandlung von synovialen Gewebe zu Knorpel. Diese knorpeligen Gelenkkörper entwickeln sich über viele Jahre und werden zum Teil in den Gelenkraum abgestoßen und führen dort zu Schmerzsymptomatik.^{6,7,8}

1.4 Was ist eine Arthrose?

Bei der Arthrose handelt es sich um eine Degeneration des Knorpelgewebes mit sekundärer Knochenläsion und entzündlich bedingter Schrumpfung der Gelenkkapsel. Es besteht nicht selten eine Korrelation zwischen den subjektiv empfundenen Schmerzen und dem objektivierbaren, radiologischen bzw. morphologischen Befund.

Degeneration an Gelenken beginnt schon sehr früh im menschlichen Körper und so finden sich spätestens ab dem 4. Lebensjahrzehnt radiologisch nachweisbare Veränderungen. Subjektive Beschwerden beginnen häufig erst ab dem 6. Lebensjahrzehnt. Primäre Arthrosen zeichnen sich durch Minderwertigkeit des Knorpelgewebes aus. Die größere Gruppe nehmen allerdings die sekundären Arthrosen ein. Diese entstehen häufig aufgrund von Überbelastung (Dysplasien, Achsenfehler, Instabilitäten oder M. Perthes sowie Epiphyseolysis capitis femoris), Traumen (wie Frakturen oder Luxationen), Entzündungen (bakterielle Arthridien

oder chronische Polyarthritiden), metabolische Erkrankungen (Gicht, Chondrokalzinose oder Ochronose) sowie endokrine Erkrankungen wie Hyperparathyreoidismus oder Hyperthyreose.

1.4.1 Pathomechanismus der Arthrose

Der zugrundeliegende Pathomechanismus setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Zum einen werden die Matrixmoleküle des Knorpelgewebes geschädigt. Dies führt zu einer Minderung der Proteoglykane. Zusätzlich kommt es zu einer Zerstörung des kollagenen Netzwerkes und einer Minderung der Aggregationsrate von Proteoglykanen. Dies führt in der Zusammenschau zu einer Proliferation und Steigerung der Synthese- und Degradationsleistung der Chondrozyten. In diesem Zustand können die Chondrozyten die Degeneration kompensieren.

Kommt es aufgrund des Fortschreitens der Degeneration zu einer Überlastung der Chondrozyten, führt dies zu irreversibler Schädigung des kollagenen Netzwerkes und ein Absterben der vorhandenen Chondrozyten. Zunehmende Matrixdegeneration und Matrixschäden durch Enzyme (Matrix-Metalloproteasen, MMP 16) führen zum forcierten Abbau der Knorpelflächen bis auf das anliegende Knochengewebe.^{9,10,147,148} Spontane Knorpelheilung ohne Fremdeinwirkung konnte bis jetzt nicht beschrieben werden, allerdings ist es möglich, durch Einwirkung von außen eine spontane Heilung zu erbringen. Auf dieser Grundlage werden einige der später genannten Verfahren genutzt.

Symptomatisch steht bei den meisten Erkrankten der Schmerz im betroffenen Gelenk und die Bewegungseinschränkung im Vordergrund. Radiologisch zeigen sich im voll ausgeprägten Krankheitsbild eine Gelenkspaltverschmälerung, Geröllzysten, subchondrale Sklerosierung und Osteophyten.

Zu Beginn der Erkrankung bestehen belastungsabhängige Beschwerden, die vom Gelenkraum oder von periartikulären Weichteilen ausgehen können. Dies führt zu reflektorischen Muskelverspannungen, die der Schonung der betroffenen Gelenke dienen.

Es folgt ein Stadium, in dem die Bewegung schmerzhaft wird, allerdings kann diese durch Bewegung gebessert werden. Die Gelenkkapsel ist häufig zu diesem Zeitpunkt schon mitbeteiligt. Intraartikuläre Veränderungen und Gelenkkontrakturen sind zusätzlich vorhanden.

Im Folgestadium kommt es zum Ruheschmerz und Bildung von funktionellen Kontrakturen. Dies führt zu Achsfehlstellungen, Muskelatropie, Instabilität des Gelenks und Einsteifung (Ankylose).

Die Diagnose erfolgt über konventionell-radiologische Aufnahmen und die bestehende Klinik des Patienten.

Grundsätzlich muss immer an Osteoporose und Knochenmetastasen in diesem Zusammenhang gedacht werden.⁸

1.4.2 Klassifikation von Knorpeldefekten

Im Rahmen der Diagnostik, speziell anhand der Magnetresonanztomographie und als Operationsbefund, zeigt sich die unterschiedliche Ausprägung des Knorpelschadens (Chondromalazie), der in verschiedene Grade eingeteilt wird. Im klinischen Alltag ist die Outerbridge-Klassifikation gebräuchlich, die sich am arthroskopischen Befund des Knorpelschadens orientiert. Grad I bezeichnet eine intakte Oberfläche mit leichter Erweichung und eventuell oberflächlichen Rissen und Fissuren. Grad II zeigt einen abnormalen Knorpel mit einer Läsionstiefe von < 50% der Knorpeldicke. Der Grad III ist gekennzeichnet durch eine Läsionstiefe von >50%. Der Knorpeldefekt reicht je nach Abstufung bis zur Knochenschicht. Der höchste Grad IV beschreibt eine vollständige Knorpelläsion bis auf den Knochen, die sogenannte Knorpelglatze.^{147,148}

Obleich viele Modifikationen und auch neue Scores zur Quantifizierung der radiologischen Befunde bei Arthrose publiziert wurden, hat sich der Score von Kellgren und Lawrence von 1957 bzw. 1963 langfristig durchgesetzt. Die Einteilung gilt für konventionelle Röntgen Aufnahmen.

Es werden folgende Zeichen in der Klassifikation berücksichtigt: 1. Nachweis von Osteophyten, 2. Abnahme der Gelenkspaltweite, 3. vermehrte subchondrale Sklerose und 4. Deformitäten der gelenkbildenden Anteile.¹⁶⁵

Die neueren Arthrose Scores, wie der OARS Score nach Altman, basieren auf der Bewertung reproduzierbarer Einzelkriterien. Nach den Vorgaben der OARS (Osteoarthritis Research Society) werden auf konventionellen Röntgenbildern die Größe von Osteophyten und das Ausmass der Gelenkverschmälerung separat graduiert. (Grad 0-3).¹⁶⁶

1.4.3 Diagnostische und kurative Angriffspunkte

Die Behandlung und Therapie der Arthrose stützt sich auf verschiedene Eckpfeiler. Wichtig ist und bleibt weiterhin die Schmerztherapie. Als nicht-operative und nicht-invasive Methode ist die Schmerztherapie meist von vielen Patienten zunächst bevorzugt und lindert vor allem die Schmerzsymptomatik und -problematik der Betroffenen. Hier haben sich zunächst die nicht-steroidalen Anti-Rheumatika (NSAR) und desweiteren die selektiven Cox-2 Hemmer etabliert. Die NSAR sind schlechter magen-verträglich werden aber trotzdem vielfach genutzt.^{167,168} Zudem werden kortikoidhaltige Medikamente und NSAR^{169,170} zur Entzündungshemmung bei Gelenkerguss und hyaluronsäurehaltige Medikamente¹⁷¹ zum Erhalt der Synovialflüssigkeit und besseren Versorgung des Gelenkknorpels in frühen Stadien der Erkrankung eingesetzt.¹⁷² Diese symptom-orientierte Behandlung ändert aber nichts am Voranschreiten der Degeneration. Neuere wissenschaftliche Ansätze versuchen, die Erkrankung auf Zellebene oder molekularem Niveau zu erfassen und zu behandeln. Sie befassen sich zum Beispiel mit den die Proteoglykan-abbauenden Enzymen wie Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP)¹⁷³. Weitere Möglichkeiten sind die Stimulation von im Knorpelverband vorliegenden Chondrozyten und deren Wachstum.¹⁷⁴

1.5 Heilverfahren

Da es sich bei der Arthrose um eine "Volkserkrankung" handelt, gibt es viele verschiedene Möglichkeiten der Behandlung. Man unterscheidet die nicht-operativen von den operativen Verfahren.

1.5.1 Nicht-operative Verfahren

Zu den nicht-operativen Möglichkeiten zählen krankengymnastische und physio- und ergotherapeutische Behandlung (z.B. Balneo-Therapie, Bewegungsbäder, Stosswellentherapie, Iontophorese, Kieser- und Kneipp-Training, Alexander-Technik), Bandagierung, Akupunktur, Diäten, Nahrungsergänzungsmittel, autogenes Training, Homöopathie, Schmerzmittel, Osteopathie, aber auch orthopädische Hilfsmittel wie individuell gefertigte Schuhe. Die Liste der konservativen Therapiemöglichkeiten lässt sich problemlos weiter fortsetzen, die genannten Methoden stellen nur einen kleinen Teil dar, bieten aber eine gute Auswahl.

Alle diese Verfahren ändern nichts am Voranschreiten der Erkrankungen und werden häufig in den Anfangsstadien der Erkrankung genutzt, um Schmerzen zu lindern und die Beweglichkeit des Patienten zu bessern und die Symptomatik der Erkrankung, so lange es möglich ist, nach hinten zu verschieben. Die Akzeptanz dieser Verfahren ist bei den meisten Patienten deutlich höher als das im Verlauf der Erkrankung zunehmend anstehende operative Verfahren.¹⁷⁵⁻¹⁸¹

1.5.2 Operative Verfahren

Auch operative Verfahren gibt es in großer Vielfalt. Sie werden angepasst an das Vorschreiten der Arthrose gewählt. Zunächst werden Verfahren genutzt, um die Selbstheilung des in Degeneration befindlichen Knorpels zu bessern, bevor man letztendlich die destruierten Knorpel- und Knochenoberflächen durch Prothesenersatz therapiert. Der Prothesenersatz zum Beispiel bringt durch Entnahme des erkrankten Gewebes und bei optimal eingebrachter Prothese eine Linderung der Schmerzen und einen Stop der Beschwerden. Varisierende und valgisierende Umstellungsosteotomien an Femur oder Tibia können bei vorwiegend unikompartimenteller Arthrose im Kniegelenk zu einer häufig zeitlich begrenzten Schmerzlinderung und einer zeitlichen Verschiebung der letztlich häufig dann doch notwendigen prothetischen Versorgung führen. Eine exakte Indikationsstellung ist hierbei allerdings zwingend notwendig. Intra- und postoperative Folgen und Komplikationen müssen aber stets gegen eine weiterhin konservative Therapie aufgewogen werden. Die Besserungsrate der verschiedenen Verfahren variiert.^{182,183}

1.5.2.1 Verfahren ohne aktives Einbringen von Zellen oder biologischen Substanzen

1.5.2.1.1 Lavage und Arthroskopie

Die Spülung oder Lavage eines Gelenks mit Lösungen wie Ringer oder Natriumchlorid über Stichinzisionen und Trokare¹² haben sich als sehr hilfreich bei der Behandlung von Arthrose erwiesen. Allein eine explorative Arthroskopie ohne weitere Behandlung der Knorpelflächen hat in einigen Untersuchungen schon zu einer deutlichen Besserung der Beschwerden im Patientenkollektiv geführt.^{13,14} Zunächst ist die Arthroskopie dazu gedacht, sich über den Ist-

Zustand einer Gelenkzerstörung einen Überblick zu verschaffen.^{14,15} Mittlerweile zeigen neuere Studien, daß dieses Konzept veraltet ist und man davon abgerückt ist. Die Evidenz für eine Arthroskopie zur reinen Lavage ist hier negativ ausgefallen.^{184,185}

1.5.2.1.2 Knorpel-Glättung mit Shaver

Knorpel-Glättung wird immer im Zusammenhang mit Arthroskopie durchgeführt. Durch den Eingriff hofft man auf die mechanische Entnahme von lädierten Knorpelanteilen. Dies wird mit Hilfe verschiedener Instrumentarien wie einem Shaver bewerkstelligt. Anwendung findet es vor allem bei niedrig- und mittelgradigen Knorpelerweichungen. Auch hier muss man feststellen, dass sich bis jetzt keine statistische oder biomechanische Erklärung für die Besserung der Beschwerden findet.^{17,18,19,20} Versuche an Hasen haben dies bestätigt.²¹ Es kam in der Folge sogar zu einem apoptotischen Zelluntergang der Chondrozyten.^{22, 23} Ob das Verfahren hilfreich oder notwendig ist, ist also nicht wissenschaftlich belegt.

1.5.2.1.3 Debridement

Debridement ist eine Verschärfung der oben schon genannten Knorpelglättung. Dabei werden eine arthroskopische Spülung mit Meniskusresektion (bei Rissbildungen), Osteophytenabtragung und die Entnahme von freien Gelenkkörpern kombiniert.²⁴ Wenn man Zellbiologie als Grundlage des Verfahrens nimmt, so muss man klar sagen, dass die Integrität des noch bestehenden Knorpelgewebes weiter destruiert wird und so einer folgenden Regeneration entgegengewirkt wird. Auch hier kommt es zu Zellnekrose und Apoptose.²¹⁻²³ Sowohl in experimentellen^{25,26} als auch in klinischen^{27,28} Studien konnte eine Verschlechterung nachgewiesen werden.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

1.5.2.1.4 Abrasio /Chondroplastik

Diese Eingriffsform, wie auch die Pridie-Bohrung und die Microfrakturierung, geht davon aus, dass wenn man den destruierten Knorpel durch zusätzliche Frakturierung beeinflusst, es zu einer Einblutung und Freisetzung von unter dem destruierten Knorpel liegenden gesunden und teilungsaktiven Zellen kommt. Es kommt zur spontanen Selbstheilung, Bildung von Ersatzknorpel und Besserung der Knorpelschichtdicke. Diese Entdeckung wurde zuerst bei

Hasen²¹ und Hunden³⁴ gemacht, lässt sich aber in klinischen Studien gut auf den Menschen übertragen. Es wird angenommen, dass die Selbstheilung durch das freigesetzte Knochenmark ermöglicht wird. Es gibt viele retrospektive Studien zur Abrasio/Chondroplastie, deren Besserungsraten allerdings nicht einheitlich und ebenfalls sehr variabel sind.^{13, 35-37} Auch hier gibt es wenig klinisch verbindliche Studien.^{38,189,190}

1.5.2.1.5 Pridie-Anbohrung

Es handelt sich um ein 1959 von Pridie entwickeltes Verfahren mit dem Ziel, durch therapeutisches Anbohren des subchondralen Knochenmarksraums in den Bereichen der Läsion ein Stimulus zu setzen, der reflektorisch zu einer spontanen Heilung führt. Heute wird dies zum Beispiel bei Patienten mit Osteochondrosis dissecans angewandt. Klinische Studien zeigen, dass Patienten mit Arthrose die größte Besserung im Vergleich der obengenannten Methoden haben.⁴³ Bei den Studien handelt es sich allerdings um Kurzzeit-Studien. Über längere Zeiträume sind bisher keine belastbaren Ergebnisse erarbeitet worden.^{44,191,192}

1.5.2.1.6 Mikrofrakturierung

Bei der Mikrofrakturierung wird die Knochenfläche unter dem Gelenkknorpel angeritzt. In einer arthroskopisch durchgeführten Operation wird zunächst der geschädigte Gelenkknorpel bis an die Knochengrenzschicht abgetragen und anschließend durch ca. 3 mm tiefe Löcher mit einer gewinkelten Arle perforiert. Die Löcher werden in regelmäßigen Abständen alle 2-3 mm eingebracht. Diese Stimulation des Knochenmarks soll zur Bildung von Faserknorpel anregen. Aus den künstlich erzeugten Defekten tritt aus dem Knochen ein Blutkoagel, das auch Stammzellen mit sich führt, die sich dann zu Faserknorpel im behandelten Bereich bilden.³⁹ Entwickelt wurde die Methode durch Steadman et al. Auch hier gibt es kaum verblindete, klinische Studien und die tatsächliche Freisetzung von mesenchymalen Stammzellen ist reduziert.^{40-42,193,194}

1.5.3 Verfahren mit interventionellem, erweitertem Einsatz von Chirurgie

1.5.3.1 Osteotomie

Tibiale Osteotomie ist eines der chirurgischen Verfahren, die zur Besserung von Arthrose genutzt werden. Allerdings wird es auch zur Korrekturmöglichkeit für große extraartikuläre valgische und varische Deformitäten genutzt. Mittlerweile wird die Osteotomie auch in Kombination mit dem totalen Gelenkersatz^{44,46} oder Knorpelglättung mit Shaver^{38,47} eingesetzt. Die Osteotomie zielt weniger auf die Induktion von Knorpelwiederherstellung, sondern eher auf die verbesserte Einstellung der physiologischen, biomechanischen Vorgaben des beteiligten Gelenks. Durch den Wechsel von intraartikulären Druckverhältnissen durch Osteotomie kann eine zeitweilige Besserung der Schmerzsymptomatik erzielt werden. Die Osteotomie hat sich mittlerweile zu einem Standardverfahren entwickelt und wird häufig, wenn sie als Einzelverfahren verwendet wird, eher unikompartimentellen Arthroseformen genutzt.^{48-50,196,197} Die Kombination von Osteotomie mit anderen interventionellen Verfahren wurde in einigen klinischen Studien getestet und es finden sich positive Ergebnisse.^{47,50-57} Eine bestimmte Kombination der verschiedenen Verfahren konnte nicht differenziert werden. Die Kombination mit vorgeschalteter Gelenkarthroskopie wird heute zur Diagnose und Indikationssicherung eingesetzt, bevor eine Umstellungsosteotomie erfolgt.¹⁹⁵

1.5.3.2 Distraction von Gelenken

Gelenkdistraction (Auseinanderdehnen der Gelenkflächen) zielt im Rahmen der Arthrosebehandlung vornehmlich auf die Reduktion der Schmerzsymptomatik und Verlängerung des Zeitraums bis zur operativen Versorgung. Es wird postuliert, dass es einen knorpel-regenerierenden Effekt haben soll.⁵⁸ Allerdings gibt es wenig bis keinen evidenzbasierten Halt für die postulierten Effekte.¹⁹⁸ Die Verhaltensweise gilt eher für ein junges Patientenkollektiv bezogen auf die Diagnose „Arthrose“ und ist komplikationsanfällig.

1.5.3.3 Gelenkendoprothesen

Bei den Endoprothesen handelt es sich um Implantate, welche dauerhaft im Körper verbleiben. Am häufigsten werden die künstlichen Hüftgelenksprothesen implantiert.¹⁹⁹

Heutzutage stehen auch Endoprothesen für andere Gelenke wie das Knie-, Schulter-, Sprung- und Ellbogengelenk zur Verfügung. Arthrose und die damit verbundenen Schmerzen stellen die häufigste Indikation für eine Implantation dar. Diese werden über verschiedene Zugänge entweder zementiert, nicht-zementiert oder als Hybrid-Prothese an die Stelle des Gelenks eingebracht. Es besteht die Möglichkeit aus einer Vielzahl an Prothesen zu wählen, die angepasst an den Fortschritt der Arthrose an den verschiedenen Abschnitten des Gelenks eingesetzt werden können. Die Prothesen-Operation findet in Vollnarkose oder spinaler Anästhesie statt. Es wird immer weiter versucht, die Operationseingriffe und Prothesen zu verkleinern und die operationsspezifische Belastung für den Patienten zu reduzieren. Prothesen-Operationen werden heute in grosser Zahl durchgeführt. Dabei wird das krankhafte Gewebe und Gelenk zum größten Teil ersetzt. Hier wird keine Rücksicht auf Erhalt oder Regeneration von Knorpelgewebe genommen. Durch den sofortigen Wegfall der Schmerzsymptomatik wird das Verfahren bei optimalem Einbringen der Prothese von vielen Patienten gut toleriert.²⁰⁰ Die Erkrankung ist dann häufig für einen langen Zeitraum gut im Griff. Die 10 Jahre Prothesen-Liegezeiten von eingebrachten Prothesen liegen bei im Mittel 82% und können durchaus 20 Jahre erreichen.²⁰¹ Allerdings dürfen auch hier Komplikationsraten und Nebenwirkung der Behandlung nicht unterschätzt werden. Diese können langwierig sein und die Schmerzproblematik des Patienten noch erschweren.²⁰²

1.5.4 Verfahren mit aktivem Einbringen von Zellen oder biologischen Substanzen

1.5.4.1 Hyaluronsäure-Spritzen

Die Hyaluronsäure ist eine körpereigene Substanz, die in der Lage ist, Gewebeflüssigkeit anzuziehen und lokal zu binden. Hyaluronsäure kommt an verschiedenen Stellen im Körper vor, u.a. auch im Glaskörper unserer Augen. Mit ihren stoßdämpfenden und schmierenden Eigenschaften ist Hyaluronsäure der Hauptbestandteil der Gelenkschmiere, aber auch ein Baustein des Knorpelgrundgerüsts im Gelenkknorpel.

Ins Gelenk gespritzt soll Hyaluronsäure die Viskosität der Gelenkflüssigkeit und die Gleitfähigkeit des Knorpels verbessern, außerdem dessen Stoffwechsel und Ernährung unterstützen. Dadurch soll eine Verbesserung der Belastbarkeit erreicht werden. Bei Therapien soll die Hyaluronsäure die Schmiereigenschaft der Synovialflüssigkeit verbessern.

Hyaluronsäure wird sowohl bei altersbedingten Abnutzungserscheinungen als auch bei verletzungsbedingten Gelenkschäden verwendet. Die Wirkung ist vorübergehend und insgesamt nach Studienlage fraglich.^{59,203-205}

1.5.4.2 Autologe Gewebetransplantation (ACI)

Hier werden vor allem perichondrale und periosteale Gewebe genutzt. Die Möglichkeit dazu wurde schon 1925 durch Haebler⁶⁰ entdeckt. Aber erst 30 Jahre später konnten die Daten bestätigt werden.⁶¹ Seit den 70iger Jahren wird chondrales und osteales Gewebe zur Autotransplantation genutzt. Das Transplantat soll bei der Induktion und Reparatur zerstörten Knorpelgewebes helfen.⁶²⁻⁶⁴ Die Idee hinter der Transplantation von chondralem Gewebe ist die Erkenntnis, dass chondrales Gewebe lebenslange Teilungsaktivität besitzt.^{60,61,65} Es muss also einen Pool von adulten Stammzellen geben, die in der germinativen Zone des Perichondriums bestehen bleiben und reaktiviert werden können. Somit ist es möglich, eine Reparatur auch bei schwergradigen Knorpelläsionen herzustellen. Allerdings ist die Proliferationsrate innerhalb der Transplantate nicht sonderlich erfolgreich und meist inkomplett. Die Methode wurde mit Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren wie TGF- β kombiniert.^{66-68,206,207} Viele dieser Versuche wurden bis jetzt nur an Versuchstieren (Hasen) durchgeführt und der Transfer auf den Menschen stellt bei nicht selten aufgetretenen Komplikationen weiterhin eine hohe operative Herausforderung dar. Es stehen Probleme bei Nahttechniken, Kalzifizierungen und Ablösungsreaktionen im Vordergrund. Nichtsdestotrotz ist die Gelenkfunktionalität in vielen Studien als zunehmend gut beschrieben.^{70-72,208,209}

Die Methode hat allerdings insgesamt ungeklärte Fragen. Zunächst gibt es wenige Vergleichsstudien zu anderen Verfahren. Bei der Durchführung wird immer auch der Knorpelgrund verletzt und es kommt zu Blutung, die wie oben einleitend beschrieben eine spontane Knorpelregeneration vorantreibt. (wie zum Beispiel bei der Pridie-Bohrung) Zusätzlich kann Transplantatgewebe, das auf die Läsion gegeben wird, nicht nach außen wachsen, wenn wie bei dem Verfahren durchgeführt, das chondrale Gewebe zur Läsion und nicht von der Läsion weggedreht liegt.

1.5.4.3 Scaffold- (Gerüst-) basierte (3D)- Autologe Gewebetransplantation

Die 2. Generation der autologen Gewebetransplantation focussiert sich auf die Entwicklung von 3D-Gerüsten/Clusterns, um die Chondrozyten in die Knorpeldefektzonen einbringen zu können. Dabei haben mit 3D-Strukturen eingebrachte Chondrozyten einige Vorteile im Vergleich zu den ohne Gerüst transplantierten Chondrozyten. Zum Beispiel können die Defektzonen besser aufgefüllt werden. Desweiteren gibt es weniger Entnahmestellen-Komplikationen und die chirurgische Technik selbst ist einfacher zu handhaben. Die folgende Genesungs- und Einheilzeit der Transplantates beim Patienten ist verkürzt. Letztlich zeigt sich auch die Differenzierung zu hyalinem Knorpel hin deutlich erstärkt.^{245,246}

1.5.4.4 Matrix-induzierte autologe Chondrozyten Implantation (MACI)

Die MACI ist die am häufigsten genutzte “Gerüst”- unterstützte Knorpel-Rekonstruktionstechnik in der heutigen klinisch-chirurgischen Praxis. Bei der MACI müssen zwei chirurgische Eingriffe durchgeführt werden. In der ersten werden Knorpelzellen gewonnen, isoliert und invitro expandiert. Nach 3 Tagen werden die vervielfältigten Knorpelzellen auf ein absorbierbares Kollagen aufgebracht und dann über Miniarthrotomie implantiert. Wichtig ist das Kollagen mit der richtigen Transplantatseite auf den Knorpeldefekt aufzubringen, da sonst ein Einwachsen am Defekt nicht möglich ist.²⁴⁶⁻²⁴⁸

1.5.4.5 Thrombozytenreiches Plasma (PRP)

Thrombozytenreiches Plasma wird durch Plasmapherese mit einem Autotransfusionsgerät oder einem speziellen Tischgerät aus autologem Patientenvollblut hergestellt. Das Trennungsprinzip beruht auf Zentrifugalkraft, durch die sich die einzelnen Blutbestandteile aufgrund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichts schichtweise anordnen und dann separat gesammelt werden können. Das Vollblut wird dabei in die Bestandteile Erythrozyten, Thrombozytenarmes Plasma und Thrombozytenreiches Plasma getrennt. In einem zweiten Arbeitsschritt kann aus dem separierten PRP ein thrombinreiches Gel hergestellt werden. Dieses kann bei der Wundheilung, auch gerade bei chronischen Wunden eine wichtige Rolle spielen. Einen weiteren positiven Effekt verspricht die Methode auf postoperative Nachblutung und Schmerzen. Bei Blutungen und Thrombozytenmangel kann zur Behandlung angereichertes Plasma von

Fremdspendern verwendet werden.²⁴⁹

In Übersichtsarbeiten konnte gezeigt werden, daß die Injektion von PRP eine stärker Schmerzreduktion über einen Zeitraum von 6 Monaten ergab als in Placebo Kontroll-Gruppen. Die bessere Schmerzreduktion konnte auch in Vergleichsstudien mit Hyaluronsäure-Injektionen bestätigt werden. Die Schmerzreduktion zeigt sich unabhängig von einer oder zweier durchgeführter Injektionen gebessert. Die Studienlage zeigt sich allerdings noch nicht eindeutig, so daß es hier weitere Anstrengungen bedarf.^{250, 251}

1.5.4.6 Osteochondrale Transplantation (Mosaikplastik)

Bei der Mosaik-Plastik wird chondrales oder osteochondrales Knochengewebe innerhalb eines Knorpels "transplantiert". Hierbei werden sowohl autologes⁷³⁻⁷⁵ wie auch allogenes⁷⁶⁻⁷⁹ Gewebe genutzt. Die Vorgehensweise gibt es schon seit Anfang der 1980iger Jahre.²¹⁰ Es werden aus wenig beanspruchten Abschnitten des Knorpels Stanzen entnommen, die an Stellen mit hoher Degeneration und Abnutzung eingebracht werden. Insgesamt gibt es allerdings zu den Verfahren wenig Tierversuche und vor allem kurz-dauernde Follow-Up Zeiträume. Follow-Ups über lange Zeiträume sind bisher in Studien selten. Auch zeigt sich bis heute, dass die osteogenen Transplantate deutlich bessere Ergebnisse zeigen als die chondrogenen. Die Durchführung von Mosaik-Plastiken beim Menschen in Follow-Ups mit kurzen und mittleren Zeiträumen ist offensichtlich gut bis sehr gut.^{73,74,76, 80-82.}

Es gibt wenig prospektive, verblindete Studien zu diesem Themengebiet.²¹¹ Studien zufolge²¹ unterliegt die Methode häufig sowohl im Bereich des entnommenen wie auch der Bereich des neugedeckten Areals, deutlicher Degeneration²¹², so dass bei der Methode zusätzlich viel Gewebe zerstört wird. Die Knorpelanteile aus dem wenig belastenden Areal sind schlecht auf die Belastung in den hochbelasteten Arealen ausgelegt und so kommt es zusätzlich zu Degeneration und Abbau. Hier kann es am Ende zu einer Ausweitung der Gelenksarthrose kommen.²¹³

1.5.5 Tissue Engineering

1.5.5.1 Grundlagen

Unter „Tissue Engineering“ versteht man in den Naturwissenschaften im Allgemeinen den Versuch der Rekonstruktion von lebenden Geweben oder Organismen. Die Vorgehensweise ist sehr vielfältig, lässt sich aber strukturell auf einige Anteile reduzieren. Dazu gehören gewonnene Zellen aus einem (vornehmlich lebenden) Organismus, ein drei-dimensionales Trägermedium, ein spezifisches oder unspezifisches Zellkulturmedium sowie vielfältige Wachstumsfaktoren und supportive Substrate. Diese Grundlage ist Ausgangspunkt für eine geradezu unüberschaubare Vielfalt an Versuchsaufbauten zur Zellanzucht am Lebenden (in vivo) oder in der Zellkultur (in vitro), die auch durch eine große Anzahl an supportiven Substraten ermöglicht wird.

Mit den gezüchteten Geweben sollen Heilungsprozesse (beispielsweise offene Wunden) unterstützt, funktionsuntauglich gewordenes Gewebe (beispielsweise Knorpelgewebe in den Gelenken) regeneriert sowie zerstörte Gewebe (beispielsweise verbrannte Haut) ersetzt werden. Als Zielsetzung wird immer wieder die Züchtung von komplexen Geweben oder sogar Organen angesehen. Eines der Motive für diese Forschung ist der gestiegene Bedarf an Geweben und Organen, welcher durch das Spendeangebot nicht gedeckt werden kann.

Die Herausforderung des Tissue Engineering besteht zum einen darin, ein geeignetes Gerüst zu finden, an dem sich die Zellen orientieren und mehrschichtige Strukturen bilden können, zum anderen müssen die Bedingungen verstanden und nachgebildet werden, unter denen die Zellen wachsen, sich vermehren und in die verschiedenen Gewebetypen ausdifferenzieren können. Stammzellen dienen häufig, aufgrund ihrer noch grossen Wachstums- und Differenzierungsfähigkeit, als Ausgangsmaterial. Das Tissue Engineering gilt beim aktuellen Stand der Wissenschaft als die aussichtsreichste Methode zum weiteren Verständnis von Gewebebildung und Organogenese.²¹⁴

1.5.5.2 Matrices

Als "Grundlage" und zur Aufzucht von Zellen stehen eine Vielzahl von Matrices zur Verfügung, die auf unterschiedlichste Weise Wachstum und Differenzierung von Zellen unterstützen. Zu nennen wären als übergeordnete 3-D Systeme: protein-basierte Matrices,

Kollagen-Matrices²¹⁵, Gelatine, Fibrin, carbohydrate-basierte Polymere, Hydrogele²¹⁶, Agarose, Hyaluronsäure, Chitosan²¹⁷, synthetische Polymere wie Carbonfasern, Dacron oder Teflon. Plastik-Zellkulturflaschen (z. B. Polystyren)²¹⁸ werden vielfach genutzt. Auf deren Oberflächen findet eine sehr gute Zelladhäsion sowie Wachstum statt. Es handelt sich dabei um ein 2-dimensionales System, das sich in einer Vielzahl von Versuchen als wenig störungsanfällig herausgestellt hat.

1.5.5.3 Zellen in Suspension

In den 1980er wurden zunächst nur Chondrozyten und Chondroblasten in dreidimensionale Matrices eingebettet und zu Transplantationszwecken genutzt. Um ausreichend Zellmassen in den Defektzonen anreichern zu können, wurde von Grande⁸⁴ eine Zellsuspension vorgeschlagen. Bis heute gibt es keinen experimentellen Beweis dies zu tun, da man bis heute nicht nachweisen konnte, dass dedifferenzierte Chondrozyten zu höherwertigen, potenten Zellen zurückdifferenzieren können. Dies gilt sowohl für die zweidimensionalen Matrix-Kulturen^{85,86} als auch für die wässrigen Systeme⁸⁷. Die Ausnahme bilden die dreidimensionalen Matrix-Systeme. Dass man trotzdem dedifferenzierte Chondrozyten nutzt, liegt an der hohen Teilungsfähigkeit in den invitro-Kulturen, die benötigt werden, um die großen Gewebsdefekte füllen zu können.

1.5.5.4 Stromazellen aus dem Knochenmark

Seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass aus dem Knochenmark (z.B. Oberschenkelknochen) multipotente Vorläuferzellen gewonnen werden können⁸⁸⁻⁹¹. Seit den 1990iger Jahren^{40,92} hat man sich auch mehr mit der Charakterisierung^{42,93,94} der Zellen beschäftigt. Der Vorteil ist ihre Pluripotenz, die Fähigkeit sich in viele verschiedene Zellen differenzieren zu können. Ihre Schwäche ist, dass es im zunehmenden Alter beim Menschen immer weniger Zellen zu gewinnen gibt. Mesenchymale Stammzellen wurden in diversen Tiermodellen⁹⁵⁻⁹⁷ oder in Verbindung mit verschiedenen Matrices wie Collagen-Gelen⁹⁸ oder Hyaluronsäure-Gelen⁹⁹ genutzt. Trotz erfolgreicher in vitro-Versuche und Einsatz von Wachstumsfaktoren ist es nicht gelungen, dies auf humane in vivo-Versuche erfolgreich umzusetzen. Hier spielen offensichtlich einige exogene, aber auch endogene noch nicht verstandene Faktoren eine

Rolle.^{219,220} Heute werden vermehrt adipogene Zellen für die genannten in vivo Versuche genutzt.²²¹

1.6 Chondrogenese

Als Chondrogenese wird die Entwicklung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen bis zum voll ausgebildeten Knorpel bezeichnet.

Mesenchymale Stammzellen findet man während der Embryogenese 1. in den Zellen des Neuralrohres, 2. den Sklerotomen des paraaxialen Mesoderms und 3. der Somatopleura der lateralen Mesodermplatte. Zunächst beginnen sich die mesenchymalen Stammzellen physikalisch zusammenzulagern. Diesen Schritt bezeichnet man als „mesenchymale Kondensation“.⁸³ Durch die Zusammenlagerung können die zellulären Interaktionen mit dem extrazellulären Raum sowie den umgebenden Zellen deutlich verbessert werden. N-Cadherine und das Neuralzelladhäsions-Molekül (N-CAM) werden für die Zell-Zell-Interaktionen und den Kondensationsschritt verantwortlich gemacht. Mesenchymale Stammzellen bilden dann zunächst Kollagen Typ I, Fibronectin und Proteoglykane. Dadurch bilden sich dichte Zellmassen von mesenchymalen Stammzellen, die sich daraufhin in Chondroblasten weiterentwickeln. Die verdichteten mesenchymalen Zellen beginnen den Transkriptionsfaktor Sox9 zu exprimieren.¹⁴⁹ Sox9 ist im weiteren Verlauf der Knorpelentwicklung wichtig, da er die Progenitorzellen zur Produktion und Ausscheidung von extrazellulären Molekülen antreibt.

Dann kommt es bei den verdichteten Zellen zu einer Anzahl von morphologischen und physikalischen Veränderungen. Sie werden zunehmend steifer und rigide passend zur extrazellulären Matrix.

Die weitere Entwicklung der mittlerweile Chondrozyten führt beim Menschen zur Entwicklung von enchondraler Ossifikation. Die Chondrozyten wachsen weiter. Diese Hypertrophie führt zur Anreicherung der extrazellulären Matrix durch exprimiertes Kollagen X. Die extrazelluläre Matrix wird verringert und die mittlerweile hypertrophierten Chondrozyten werden apoptotisch. Durch den gerichteten Zelltod entwickeln sich Gewebsräume im Knorpel, die von einsprießenden Gefäßen ausgefüllt werden und die Durchblutung gewährleisten. Die fortgeführte Apoptose der Chondrozyten und Reduktion des extrazellulären Raums führt letztendlich zur zunehmenden Entwicklung der osteoblastischen Zellen und adultem Knochen.¹⁵⁰

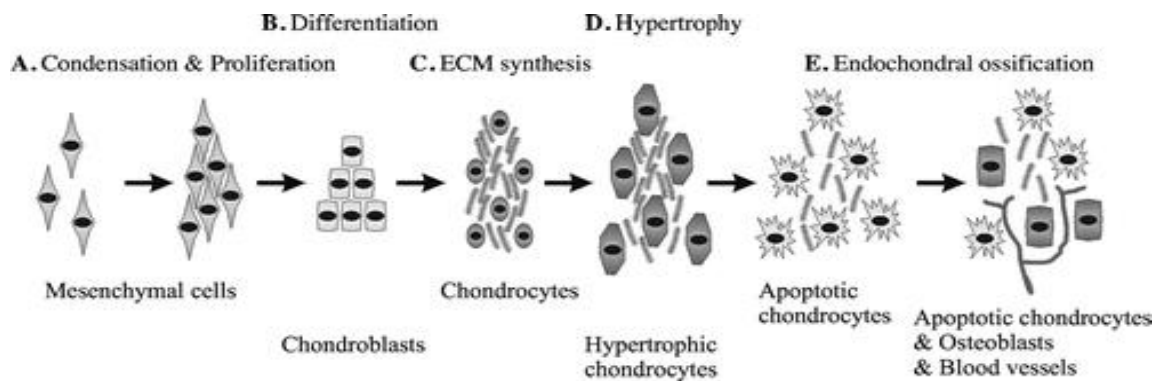


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Chondrogenese nach P. Quintana, C. Semino²²²

1.7 Stammzellen

Als Stammzelle wird im Allgemeinen diejenige Zelle eines Organismus bezeichnet, die die Fähigkeit besitzt, durch Zellteilung zwei Formen von Nachkommen zu bilden. Die erste Form stellt eine exakte Reproduktion der Mutterzelle in einer Tochterzelle dar. Sie ist ein identisches Abbild. Diesen Anteil an Reproduktion nennt man Selbsterneuerung. Die zweite Form der Tochterzellbildung zeigt die Tochterzelle als eine leicht veränderte (differenzierte) Zelle zur Mutterzelle. Durch die Differenzierung erlangt die Tochterzelle neue Fähigkeiten, die zur Ausbildung von spezifischen Geweben notwendig ist, verliert aber die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Die Selbsterneuerung und Differenzierungsfähigkeit sind bis heute die ausschlaggebenden Eigenschaften, welche allen Stammzellen gleich sind und diese definieren.²²³

1.7.1 Klassifikation

Eine weitere Unterteilung der Stammzellen zeigt sich in welchem Grad sie in der Lage sind, sich zu differenzieren. Dabei geht man von der befruchteten Eizelle aus. Nach der Befruchtung ist die sogenannte "Totipotenz" der Zellen bis maximal in das 8-Zell-Stadium erhalten. "Totipotenz" oder auch "Omnipotenz" beschreibt dabei den Zustand der späteren Differenzierungsfähigkeit in jeglichen möglichen Zelltyp. Die Entstehung eines Organismus ist aus diesen Zellen möglich. Als "pluripotene" Zellen bezeichnet man Stammzellen, die die Fähigkeit haben, sich in nahezu alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren zu können.

Ein Beispiel für "pluripotente" Stammzellen sind embryonale Stammzellen. In der Hierarchie folgen die "multipotenten" Zellen. Diese sind häufig auch in adulten Lebewesen vorzufinden. Diese Zellen sind in der Lage, sich in verschiedene Zelltypen innerhalb eines Gewebetyps zu differenzieren. Als Beispiel gelten die hämatopoetischen Stammzellen. Diese Stammzellen dienen zur Aufrechterhaltung des "SteadyState" in einem Organismus. "Oligo"- und "unipotente" Zellen sind in der Differenzierung weiter fortgeschrittene Zellen, die nur noch geringe Differenzierungsfähigkeit besitzen.²²⁴

1.7.2 Humane mesenchymale Stammzellen

Bei den Stammzellen unterscheidet man die Zellen der drei Keimblätter voneinander: das Ektoderm, das Endoderm und das Mesoderm. Mesenchymale, embryonale Stammzellen entspringen zum größten Teil aus dem Mesoderm, dem mittleren Keimblatt. Das Mesoderm ist entwicklungsgeschichtlich gesehen in der Lage, jegliche Form von Stütz- und Bindegewebe auszubilden. Mesenchym ist eine alte Begriffbeschreibung und deutet daraufhin, dass Zellen "aus der Mitte" des Keimblattes dem "Mesoderm" entstammen. Zellen mesodermaler Herkunft können durch Extraktion aus dem Knochenmark und heutzutage vermehrt aus Fettgewebe durch Liposuktion (adipogenen Zellen) gewonnen werden.

Neben der großen Gruppe der hämatopoetischen Stammzellen, die hier nicht weiter besprochen werden soll, beherbergt das Knochenmark noch weitere Stammzellen. Diese werden je nach Autor als mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells, msc), mesodermale Progenitorzellen (mesodermal progenitor cells, mpc), adulte Knochenmarkstrom-Stammzellen (bonemarrow stroma stem cells, bm-ssc) oder stromale Knochenmarkszellen (marrow stromal cells, msc) bezeichnet. Diese im weiteren Text als mesenchymale Stammzellen bezeichneten Zellen sind adhärent wachsende Zellen mit fibroblastenartigen Ausläufern (Abb.2). Mesenchymale Stammzellen können über Dichtegradienten-Zentrifugation aus Knochenmarksaspiraten gewonnen werden. Aufgrund ihrer adhärenen Fähigkeiten können mesenchymale Stammzellen durch Inkulturnahme von den hämatopoetischen Zellen getrennt werden und nach mehrwöchiger Kultivierung durch Färbung sowie RT-PCR (Polymerase-Kettenreaktion mit Reverser Transkriptase) verifiziert werden. Eine Differenzierung zu nicht mehr differenzierungsfähigen, fibroblastischen Zellen ist mikroskopisch-morphologisch nur schlecht möglich.

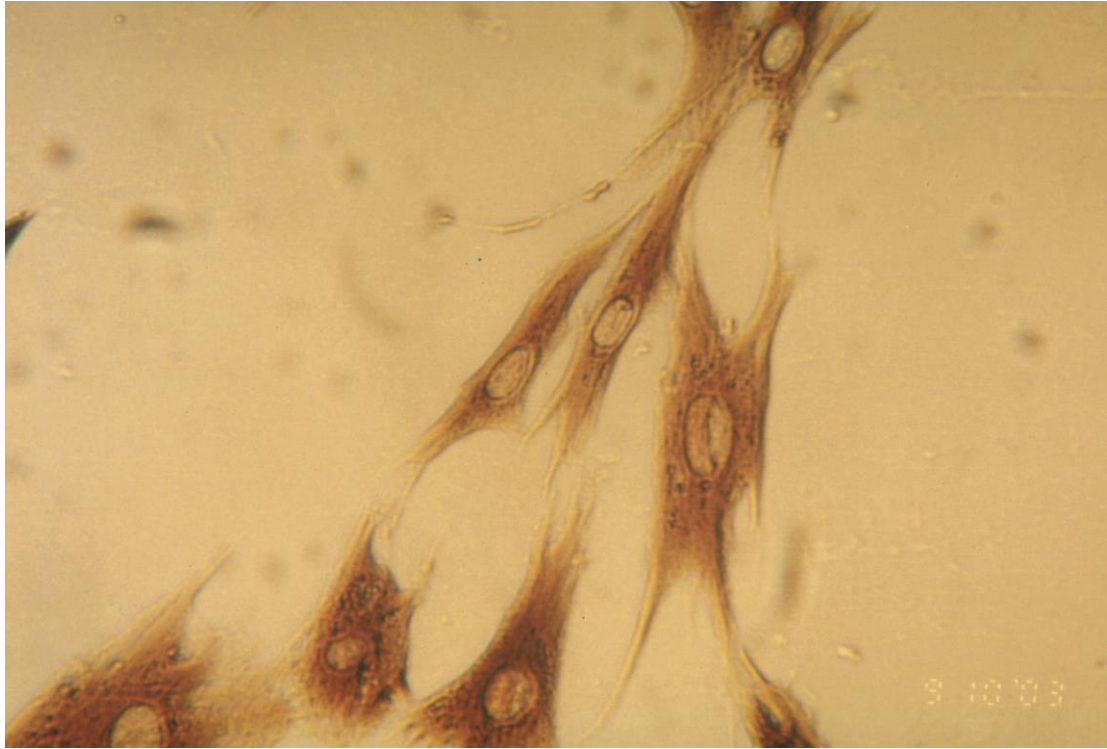


Abb. 2: Mesenchymale Stammzellen (in vitro-Kultur, 200fache Vergrößerung).

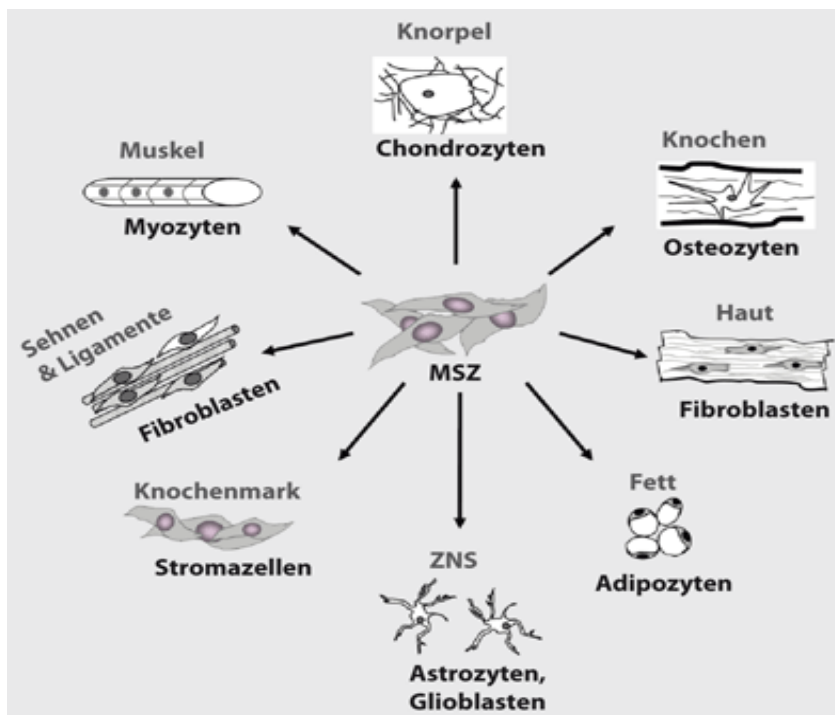


Abb. 3: Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen nach Grässel S u. Anders S

1.8 Signalproteine /Wachstumsfaktoren

1.8.1 Transforming Growth Faktor (TGF β -Superfamilie)

Die Superfamilie der Transforming Growth Faktoren (Zytokine) besteht aus mehr als 30 strukturell ähnlichen polypeptidartigen Wachstumsfaktoren. Sie beinhalten die TGF- β s (drei Typen), Activine (Typ A,B), Inhibine (A,B), die Gruppe der Bone Morphogenic Proteins (BMP 1-20), differenzierende Wachstumsfaktoren, wie Myostatin, Nodal, Leftys (1,2) und das Anti-Müller Hormon. Die TGF- β Superfamilie Proteine haben eine knotenartige Zystein-Struktur als Gemeinsamkeit und werden fast auf jeder Zelle des menschlichen Organismus exprimiert. Die Faktoren der Superfamilie fungieren als Regulatoren der embryonalen Entwicklung sowie des zellulären Gleichgewichts, welches das Wachstum, die Differenzierung, die Apoptose und das extrazelluläre Remodelling beinhaltet. Dies bezieht sich sowohl auf die Einzelzelle als auch einen Zellverband.

Veränderungen (Mutationen) in den Stoffwechselwegen der TGF- β Superfamilie führen gehäuft zu Keimzellveränderungen oder somatischen Mutationen in der Expression von nachfolgenden Stoffwechselprozessen. Dies führt vermehrt zu Erkrankungen wie beispielsweise embryonale Keimentwicklungsstörungen, Gefäßbildungsstörungen oder Tumoren.

Mit Hilfe der TGF- β Superfamilie werden von der Natur penibel ausbalancierte Stoffwechselgeschehen im Gleichgewicht gehalten.^{103, 225-231}

1.8.1.1 Signalwege der TGF- β Superfamilie

Wie bei vielen Proteinen beginnt auch bei TGF- β die Signalkaskade auf der Zelloberfläche. Hier finden sich die spezifischen Rezeptoren der Superfamilie. TGF- β besteht aus einem Bi-Dimer Rezeptor-Komplex, das bedeutet, dass er aus 2x2 Rezeptortypen besteht, Typ-I- und Typ II-Rezeptor. Zusätzlich gibt es einen weiteren 3. Rezeptor-Typ, der die von extrazellulär andockenden TGF- β Proteine den erstgenannten Rezeptortypen präsentiert. Bei den Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Threonin-/Serin-Kinasen. Insgesamt konnten bis jetzt sieben verschiedene Typ I- und fünf Typ II-Rezeptoren im Genom dargestellt werden. Diese werden für die verschiedenen TGF- β Superfamilien-Mitglieder individuell zusammengestellt. An die Typ I Rezeptoren sind GS-Proteine angelagert. Vor der Anlagerung

von TGF- β Protein wird der Rezeptorkomplex durch FKB BP12 im inaktiven Zustand gehalten. Wenn sich nun ein TGF-Protein extrazellulär anlagert und die Kaskade beginnt, phosphoryliert der Typ II-Rezeptor die Serin/Threonin-Anteile des Typ I Rezeptors. Durch die Phosphorylierung werden intrazellulär SMADs (Transkriptionsfaktoren, Wortschöpfung aus „mothers against decapentaplegia (MAD) und dem *Caenorhabditis elegans* Protein SMA“) in den aktiven Zustand versetzt. Es gibt insgesamt für die TGF- β Familie acht relevante SMADs. Die verschiedenen SMADs sprechen unterschiedlich auf die Proteine der Superfamilie an und haben verschiedene Funktionen. So gibt es die R-SMADs (Typ 1-3,5 und 8), welche über die Kaskade direkt über den

Rezeptor aktivierend reagieren. Es gibt einen Co-SMAD (Typ 4), welcher mit den R-SMADs interagiert und ebenfalls zu einer Aktivierung führt sowie die I-SMADs (Typ 6 und 7), welche inhibierend auf die vorgenannten Rezeptoren wirken. Für die TGF-Proteine im Rahmen der Superfamilie sind vor allem die SMADs 2 und 3 für die Aktivierung bzw. den Kaskadendurchlauf bestimmend, während bei den anderen Mitglieder der Familie andere SMADS im Vordergrund stehen. SMADs interagieren mit der Zellkernmembran. Dies tun Sie mit Hilfe ihrer MH1-Domäne. Weiterhin gibt es eine MH2 Domäne, die für Rezeptoraktivierung, Nucleoporin-Bindung für Translokationen oder

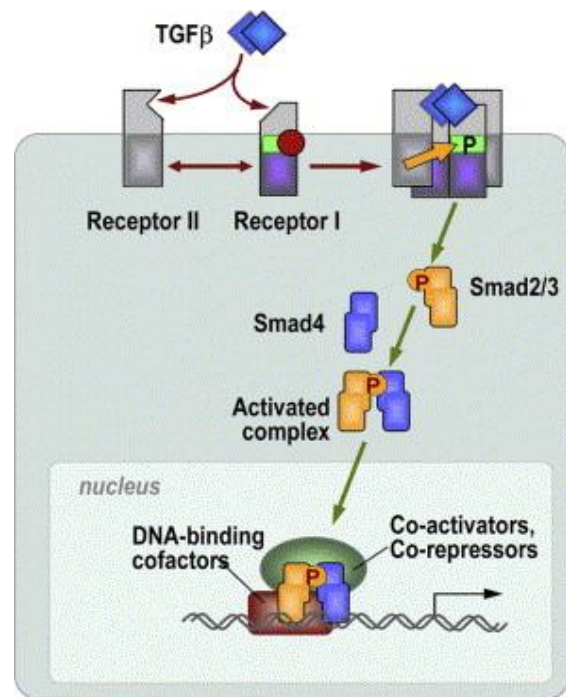


Abbildung 4: TGF- β Signalkaskade aus "The logic of TGF- β signaling" nach J.Massague/ R.Gomis

der Anbindung an Partner SMADs bestimmt ist. Durch die Phosphorylierung der SMADs und deren Einwanderung in den Zellkern ergibt sich abhängig von den angelagerten SMADs eine Aktivierung oder Hemmung der DNA-Transkription. Dies hat zur Folge, dass neben einer Wachstumsregulation auch eine Zell-Differenzierung stattfindet. Diese gegenläufige Funktion wird zu einem nicht unwesentlichen Teil von den in der Individualzelle vorliegenden Transkriptions-Cofaktoren (Aktivatoren, Repressoren; z. B.: FOX, HOX, RunX , E2F, AP1, CREB/ATF) mitbestimmt. Die Cofaktoren werden benötigt, da die Bindungsfähigkeit der SMADs, an den von ihnen bevorzugten GC-reichen DNA-Stellen in vivo für einen Transkriptionsvorgang nicht ausreicht.

Die Initiierung der Zelldifferenzierung durch TGF- β Proteine geschieht in der späten G1-Phase des Zellzyklus durch Hemmung des Zellzyklus über CDK oder c-myc, ein Transkriptionsfaktor, der Zellwachstum und -vermehrung unterstützt. TGF- β ist aber auch in der Lage, zu anderen Zellzyklus-Zeitpunkten eine Hemmung durchzuführen.^{104, 110}

Durch ihre wachstumshemmende Funktion kommt den TGF- β Proteinen auch bei Zellentartung (tumoröses Wachstum) eine wichtige Stellung zu. So konnten Veränderungen in der TGF- β Signalkaskade eindeutig Tumoren des Gastrointestinaltraktes¹⁰⁵, des Pankreas¹⁰⁶, der Mammae¹⁰⁷ sowie Glioblastome¹⁰⁸, aber auch Metastasenbildung¹⁰⁹ zugeordnet werden.

1.8.1.2 Transformierender Wachstumsfaktor β -1 (TGF- β 1)

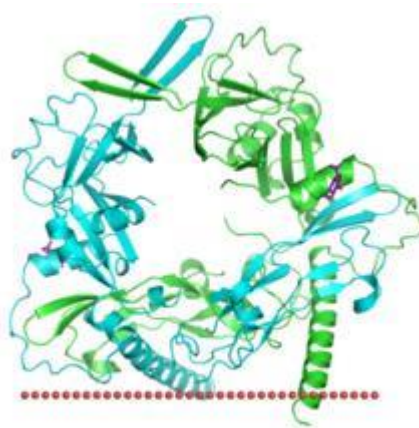


Abbildung 5: 3-D Darstellung des Transforming Growth Factors Beta 1

Der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β ist vor allem in die extrazellulären Abläufe der Chondrogenese eingebunden. Bis heute sind drei Isoformen des Wachstumsfaktors bekannt.



Abbildung 6: 3-D Struktur des TGF- β 1 Proteins

Diese drei Isoformen haben alle zwischen 60-80% Ähnlichkeit und werden durch verschiedene Gene codiert. Man geht davon aus, dass alle drei Isoformen über den gleichen

Signalweg ablaufen und ähnliche Funktionen in den verschiedenen Zelltypen haben. Hauptfunktion ist die schon angesprochene Hemmung der Proliferation (z.B. in epithelialen Zellen). In mesenchymalen Zellen wird allerdings das Wachstum verstärkt. Trotz der Tatsache, dass allen Isoformen ähnliche Funktionen zugesprochen werden, gibt es auch Differenzen. TGF- β 3 reduziert im Gegensatz zu den beiden anderen Isoformen die Bildung von Narben.

Bei dem genutzten rekombinaten Protein „humaner Transforming Growth Factor- β 1“ handelt es sich um ein aus CHO Zellen exprimiertes Protein. Hier liegt er in einem „Prodomänen-Komplex“ vor. Um die Aktivierung zu ermöglichen, muss ein Alpha-Integrin an eine RGD-Sequenz in der Prodomäne binden. Zusätzlich wird eine Kraft von den in der extrazellulär gelegenen Matrix transformierender Wachstumsfaktor Beta-bindenden Proteinen ausgeübt. Um die Dimer-Strukturen der Prodomäne Gruppe, welche als Abschirmung für andere Rezeptoren gedacht ist, zu lösen, müssen die Disulfid-Bindungen, die um die Monomere liegen, gelöst werden.

Speziell TGF- β 1 Stimulation ermöglicht es den R-SMADs sich mit dem Co-SMAD zu verbinden, um sich dann im weiteren Verlauf im Zellkern zu akkumulieren. Auch die inhibierenden SMADs binden an TGF- β 1. Dadurch werden die aktivierenden R-SMADs gehemmt. Durch die Induktion der I-SMADs ist TGF- β 1 auch als „Kontrollleur“ (negativer Feedback-Regulation) des eigenen ablaufenden TGF- β -Stoffwechselsweges zu verstehen. Neben den SMAD-abhängigen Stoffwechselwegen werden auch SMAD-unabhängige Wege mitbestimmt. So hat TGF- β 1 auch Einfluss auf die Stoffwechselwege der mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAPK und ERK1/2), der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und von p38.

Neben den extrazellulären Abläufen spielt TGF- β 1 auch bei der Transkription und Repression von Genen eine wichtige Rolle. So werden Gene, die für die zytoskeletale Organisation, die Matrixformierung, für Zell-Remodelling-Vorgänge wie auch Stoffwechsel- und Proteinbiosynthese als auch Wachstum, hochreguliert.

TGF- β 1 stellt somit ein potentes und bis zum heutigen Tag gut untersuchtes Protein dar, welches in Fragen der Proliferation und Zelldifferenzierung bezogen auf mesenchymale Zellen sehr geeignet für die Versuche in der vorgelegten Arbeit erscheint.¹¹¹

1.8.2 Hedgehog Protein-Familie

Das Sonic Hedgehog-Protein gehört zu einem von drei Homolog-Übergruppen, die in Wirbeltieren gefunden wurden. Die Hedgehog-Familie besteht aus den Übergruppen Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) und Indian Hedgehog (Ihh), die sich noch in weitere Untergruppen unterteilen. Von diesen ist Shh das aktuell am besten erforschte und somit auch bekannteste der drei Homologe.¹⁰⁰ Shh wird in der Chorda dorsalis des sich entwickelnden Embryos gebildet. Es ist ein wichtiges Protein, das vielfältige Funktionen im Leben des Organismus, in dem es gebildet wird, erfüllt.

1.8.2.1 Sonic Hedgehog Protein-Funktionen

In der dorsalen Region des Neuralrohr erhalten die spinalen Neurone Reize von sensorischen Neuronen. Die Motoneurone verbleiben in der ventralen Region. Während der embryonalen Entwicklung ist die dorsale Region abhängig von Reizen aus der Epidermis und die Entwicklung der ventralen Region ist abhängig von Reizen durch Proteine aus dem Neuralrohr. Während der Verminderung der Entwicklung der ventralen Region des Neuralrohres kommt die Funktion von Shh zum Tragen. Shh wird vom Neuralrohr ausgeschieden und es formt sich ein Shh-Gradient. In den verschiedenen Gradientenstufen von Shh entwickeln sich verschiedene Zellen im sich entwickelnden Embryo.¹⁰⁰

In der frühen Phase der Embryogenese hat Shh Einfluss auf die Ausrichtung der Links/Rechts- und Dorsalen/Ventralen-Achse des Embryos, zusätzlich werden durch die Induktion Myotome für die Skelett-Muskulatur und Sklerome für Knochen angelegt. Im Weiteren wird die Gliedmaßenentwicklung, Neuralleistenanlage, die Verästelung der Lunge die Nierenentwicklung und die Ausbildung des Innenohres vorangetrieben. Auch die glatte Muskulatur, die Thymusdrüse und die Gonadenentwicklung werden beeinflusst. Zuletzt werden auch das Wachstum, die Ausbildung des Kleinhirns und die Bildung sowie das Wachstum von Haarfollikeln angeschoben und verstärkt. Diese genannten Funktionen sind absehbar nur ein kleiner Ausschnitt aus dem tatsächlichen Wirkungsspektrum der Hedgehog-Kaskade wie viele aktuelle wissenschaftliche Experimente antizipieren. Wie sich hieraus leicht erkennen lässt, ist Shh für eine Vielzahl von Entwicklungen in der Morphogenese des sich entwickelnden Embryos mitverantwortlich. Die zeigt auch die Diversität des Proteins im Hinblick auf Tumorentwicklung über das natürliche Wachstum hinaus.

1.8.2.2 Sonic Hedgehog Protein

Das Sonic Hedgehog Protein hat den Namen des Haupt-Charakters eines populären Video-Spiels erhalten ("Sonic, the Hedgehog" von Sega). Das ursprüngliche Hedgehog-Gen wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und nach den spitzen, zahnartigen (die Igelstacheln ähneln) Fortsätzen benannt, die Embryonen der Fliege in Mutanten phenotypisch ausbildeten.



Abbildung 7: 3-D Struktur des Sonic Hedgehog Protein

Die ersten beiden Homologe (Indian, Desert) der Hedgehog-Protein-Gruppe wurden nach Igelarten benannt, während Sonic Hedgehog den Spielfigur-Namen erhielt. Sonic Hedgehog ist ein Morphogen und ein Mitogen. Die zytogenetische Positionierung ist bei 7q36. Somit liegt das Protein auf dem langen Arm von Chromosom 7. Bevor es in der Zelle in der sekretierten Form vorliegt, unterliegt Sonic Hedgehog Protein einigen Prozessierungsschritten. Das in der Zelle produzierte Sekret hat ein Molekulargewicht von 45 kDa und wird als Präprotein bezeichnet. Das sekretierte Protein hat eine kurze Signalsequenz am n-terminalen Ende. Diese wird von einem „Erkennungspartikel“ bei der Translokation in das endoplasmatische Retikulum abgelöst. Nach der Translokation wird das Signalpeptid von einer Peptidase im endoplasmatischen Retikulum entfernt. Hier erfolgt zusätzlich eine Autoprocessing, um den 20 kDa n-terminalen Signalanteil (Shh-N) und ein 25 kDa c-terminalen Anteil zu erhalten, der keinen Anteil an der Signalprozessierung hat. Die Teilung wird durch eine Protease im c-terminalen Anteil katalysiert. Zusätzlich wird an das Protein ein Cholesterol-Molekül an den c-terminalen Anteil angelagert. Es erfolgt zusätzlich

die Anlagerung von Palmitat. Dadurch kann die Potenz des Proteins zur Anlagerung um das 30fache gesteigert werden.

Genutzt wurde das Sonic Hedgehog Protein in der Zubereitung der Firma Merck, Darmstadt.

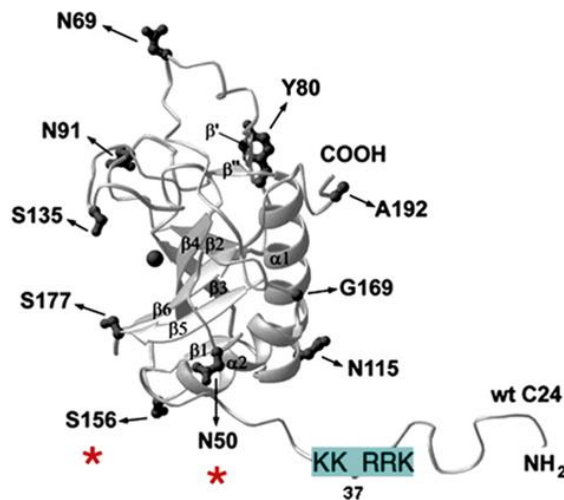


Abbildung 8: 3-D Darstellung des Sonic Hedgehog Proteins

1.8.2.3 Sonic Hedgehog Protein-Signalweg

Wenn sich ein extrazelluläres Hedgehog-Protein an rezeptor-präsentierenden Zellen binden will, so geschieht dies mit Hilfe der transmembranären Proteine Cdo und Boc. Diese bilden Fibronectin-Bindeeinheiten mit dem multi-transmembranären Rezeptor Patched (Ptc). Wenn es zum Start des Hedgehog-Signalweges kommt, werden die Proteine Cdo und Boc herunterreguliert.¹¹³ Dies funktioniert wie beim TGF- β auch über negative Feedback-Mechanismen. Ohne das extrazellulär angelagerte Hedgehog-Protein hemmt Ptc die Aktivität des 7-transmembranären rezeptorartigen Proteins Smoothened (Smo). Wenn nun das Hedgehog-Protein angelagert wird, kann der Signalweg weiter ablaufen. Die Aktivität des Signalweges ist proportional abhängig vom Anteil des nichtgebundenen Ptc. Bis heute konnten 2 Formen von Ptc nachgewiesen werden. Beim kompletten Fehlen der beiden Ptc-Rezeptoren führt dies zur unkontrollierten Aktivierung des Hedgehog-Signalweges. Beim Fehlen von Ptc2 kommt es unter anderem zu Alopezie, epidermaler Hypoplasie und erhöhter Tumorrates. Auch die Smo-Aktivität kann durch kleine Moleküle verändert werden. So sind z.B. die steroidalen Alkaloide Cyclopamin oder Jervine Antagonisten von Smo, da sie in

ihrer Struktur dem Smo-Rezeptor sehr ähnlich sind.^{114, 115} Auch dem Oxisterol und Vitamin D3-Derivaten konnten eine Smo-modulierende Funktion nachgewiesen werden. Wie auch die vorgenannten Rezeptoren kann Smo im aktiven und inaktiven Zustand vorliegen.

Intrazellulär inaktiviertes Smo liegt in einem nicht-phosphorylierten Zustand vor. Nicht-phosphoryliertes Smo wird durch Endozytose von der Zelloberfläche in Lysosomen abgebaut. Wenn ein Signal von der Zelloberfläche bei Smo ankommt, erfolgt eine Phosphorylierung. Diese führt zur Freisetzung von Smo. Smo wird dabei in mehrere Teile aufgespalten. Das C-terminale Ende lagert sich dem kinesin-like Protein an (Cos2). Durch Cos2 werden mehrere zytoplasmatische Komponenten angelagert, wie der aktivierende Transkriptionsfaktor Ci, der hemmende Transkriptionsfaktor CiA, eine multimere Serin-Threonin-Kinase, Fused (Fu) sowie multifunktionelle Kinasen wie PKA, GSK3 β , CKIalpha und CKIepsilon. Wenn nun das Sonic Hedgehog Protein von extrazellulär angelagert wird, wird das hyperphosphorylierte CiA von den Kinasen angebaut und kann mit dem Zellkern wechselwirken. Über einen Nucleasetransport kommt es zum aktiven Einschleusen des CiA in den Zellkern. Im Zellkern interagiert CiA mit den Promotor- und Enhancer-Regionen (z.B. GLI-1[Glioma associated oncogene homologue1]) zur Transkription der Hedgehog Zielgene. Auch hier ist ein negativer Feedback-Mechanismus bei ausreichender Produktion von Zielgenen vorhanden, der die Bindungsfähigkeit bei Expression von Ptc auf der Oberfläche reguliert. Von GLI gibt es drei bekannte Homologe. Alle sind Transkriptionsfaktoren.¹¹⁶ Sie besitzen Zink-Finger Domänen sowie Histidin-Cystein-Verbindungssequenz, die die Zink-Finger-Anteile verbinden. Wenn Sie aktiviert werden, können sie bei der Entwicklung von Onkogenen beteiligt sein oder mit SuFu (Supressor of Fused) interagieren, das die Anbindung des Proteins Fused reguliert.

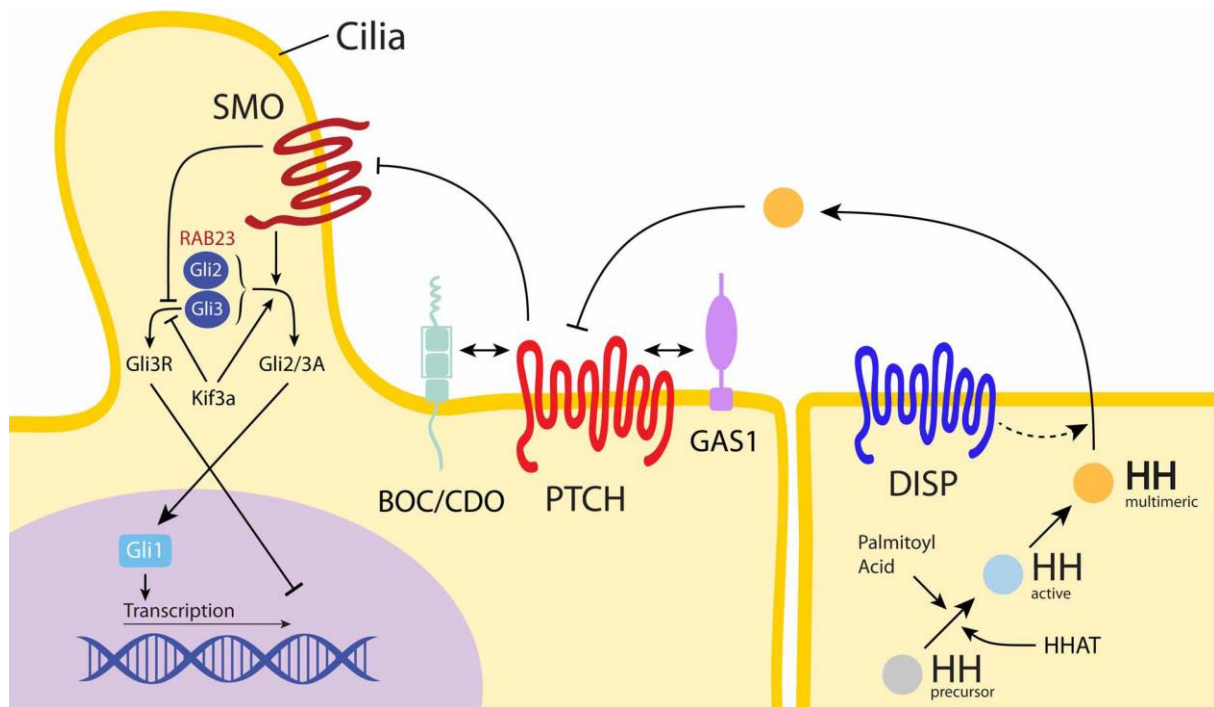


Abbildung 9: Hedgehog Signalkaskade von Pan A., Chang L.

1.8.2.4 Die morphogenen Eigenschaften von Sonic Hedgehog Protein

Die Signalwege der Hedgehog-Familie sind auffällig auf Erhaltung des Organismus angelegt. Die Effekte reichen von Wachstum über Selbsterneuerung zu Zellüberleben, aber auch Zelldifferenzierung und Zellwanderung. Während der Embryogenese wird der Hedgehog-Signalweg von einer Vielzahl an verschiedenen Zellen zur Induktion von Wachstumsprozessen genutzt. Die Fähigkeit von Sonic Hedgehog Protein als Morphogen fast jeden Teil eines menschlichen „Körperplans“ zu beeinflussen, wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die Reaktion auf Shh einer Zelle abhängig von der entsprechenden jeweils angesprochenen Zelle ist. Auf der molekularen Ebene werden die Antworten der verschiedenen Zellen durch die Induktion von unterschiedlichen Zielgenen beeinflusst. Durch Beeinflussung des Hedgehog-Signalweges werden Gene regulierter Zellgewebe zur Sekretion von Signalproteinen gebracht. Dies sind zum Beispiel BMP-4 (bone morphogenic protein), FGF-4 (fibroblast growth factor 4) und VEGF-A (vascular endothelial growth factor) sowie Transkriptionsfaktoren für Wachstum (z.B. N-myc).¹¹⁷ Bis zum heutigen Tag hat man nur einen Bruchteil der durch die Hedgehog-Kaskade beeinflussten Gene entdeckt. Aktuell werden weitere Unterformen von GLI intensiv beforscht. Durch die genannten Eigenschaften

kann Sonic Hedgehog bei der Embryogenese sowohl aktivierenden wie auch inhibierenden Eigenschaften am gleichen Zelltyp haben. Auch der Zeitpunkt und die Dosis sind für eine Antwort auf den Hedgehog-Signalweg wichtig. So kann die Entwicklung des Neuralrohres in der Embryogenese ganz speziell von einem Dosisgradienten, der durch Shh aufgebaut wird, die weitere Entwicklung beeinflussen. Auch der Zeitpunkt der Hedgehog-Protein Applikation ist entscheidend, da dies zu Fehlentwicklungen und Missbildungen im weiteren Verlauf der Entwicklung führen kann.

Durch die vielfältigen Rollen in der Embryogenese muss man sich in der Zukunft auch über die therapeutischen Möglichkeiten von Hedgehogs klar werden, denn Antagonisten der Protein-Familie können, wie beim Cyclopamin schon bekannt, zu den diversesten genetischen Veränderungen, Krankheiten und Missbildungen führen. Hier sind den zunächst positiven morphogenen Eigenschaften klare Grenzen gesetzt. Trotz und gerade wegen der auch gegenläufigen Eigenschaften des Proteins ist es als Forschungssubstanz höchst wertvoll und interessant.

1.8.2.5 Sonic Hedgehog und Erkrankungen

Der Verlust des Hedgehog-Stoffwechselweges während der Embryogenese führt zu schweren Entwicklungsstörungen wie Holoprosenzephalie, Polydaktylie oder kraniofazialen und skeletalen Veränderungen. Die Funktion der Zilienentwicklung steht in engem Zusammenhang mit Shh-Signalen. So findet man auch Veränderungen wie die Meckel'sche Erkrankung¹¹⁸, das Bardet-Biedl-Syndrom¹¹⁹, das Karthagener Syndrom¹²⁰ oder polyzystische Nieren¹²¹ als Folge von Signalweg-Störungen.

Fehlerhafte Aktivierung von Hedgehog Signalwegen kann auch zur Tumorentwicklung führen. Hier sind das Basalzellkarzinom²³², das Medulloblastom²³³, das Rhabdomyosarkom²³⁴ nachgewiesenermaßen zu nennen. Sie alle lassen sich auf Keimzellmutationen des Patched-Rezeptors(Ptc) zurückführen. Mittlerweile gibt es jede Menge tumoröse Veränderungen, bei denen ein Mitwirken von Shh vermutet wird oder gesichert ist. Neben den schon genannten Tumoren finden sich auch Hinweise bei Gliomen, Brust-²³⁵, Ösophagus-²³⁶, Magen-²³⁷, Pankreas-²³⁸, Prostata-²³⁹, Lunge-²⁴⁰, Gallenblasen²⁴¹- und Blasen-²⁴² sowie Knorpel- und Knochentumoren (Chondro- und Osteosarkome).

Aber auch bei der degenerativen Arthrose zeigt IHH, ein Homolog von SHH, bei Stimulation in Tierversuchen, ein verfrühtes Auftreten von Arthrose und eine Veränderung bzw. Zerstörung der Knorpelsubstanz. Für die Zukunft zeigt sich hier ein möglicher therapeutischer Ansatz. Allerdings müssen hier weitere Anstrengungen hinsichtlich der RNA Interferenz bzw. Ausschaltung von Genen und der Transfer über Liposomen oder Nanopartikel unternommen werden.²⁴³

1.9 Zielsetzung der Versuche

Diese Arbeit beschäftigt sich vor allem mit dem klinisch-therapeutischen Ansatzpunkt der Stimulation von undifferenzierten, teilungsaktiven Zellen, den Stammzellen, und deren Wachstum und Differenzierung zur möglichen, folgenden Implantation in betroffene und zerstörte Knorpelanteile oder deren kompletten Ersatz mit dreidimensional in vitro gebildeten Geweben.

Die wissenschaftlichen Fragestellungen lauten:

1. Führt Sonic Hedgehog Protein zu Wachstum von aus menschlichen Femurschäften gewonnenen HMSCs in einer invitro-Kultur?
2. Führt Sonic Hedgehog Protein zu chondrogener Differenzierung von aus menschlichen Femurschäften gewonnenen HMSCs in einer invitro-Kultur?
3. Wie ist das Wachstum und die Differenzierung von Sonic Hedgehog Protein im Vergleich zu dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β)?

Kapitel 2:

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)

Zuerst wurden Blutproben aus knochenmarkreichen Zonen entnommen (z.B. Beckenkamm oder proximaler Femur) und in heparinisierte Röhren gegeben. Die Blutmenge war zwischen wenigstens 2 ml und höchstens 10 ml. Die Patienten wurden im Vorfeld der Entnahme aufgeklärt und um ihr Einverständnis zur Entnahme gefragt. Dies wurde schriftlich fixiert und durch die betroffenen Patienten unterschrieben. Bevorzugte Patienten für die Entnahme waren Patienten, die an Hüftkopfarthrose (Coxarthrose) erkrankt und jüngeren Alters waren. Allerdings war dieses Vorhaben nur teilweise durchführbar gewesen und es wurden ebenfalls ältere und alte Patienten integriert. Die Patientendaten sind im Detail abfragbar und im Anhang in Datenbanken dokumentiert. Ebenso wurden relevante, aktuelle und teilweise chronische Erkrankungen der Patienten notiert. Die Entnahme wurde während der Operation durch den Operateur und Mithilfe der Operationsschwester oder des schreibenden Doktor-anten bei der Eröffnung des Femurschaftes entnommen. Dabei wurde nach Möglichkeit nur das nach direkter Eröffnung austretende Blut für das weitere Vorgehen entnommen. In Einzelfällen oder zur Probe wurde ebenfalls Blut, das nach dem Raspelungsschritt zur Anpassung der Schaft-Prothese aus dem Femurschaft gelaufen kam, zu weiteren Versuchen entnommen.

Die Blutproben wurden nach Möglichkeit noch am gleichen Tag weiterverarbeitet, um die Gefahr von Gerinnung und somit Verfälschung von Messergebnissen zu minimieren. Die Proben wurden im schlechtesten Fall am darauf folgenden Tag (12 Stunden nach Entnahme) verarbeitet. Die Röhren wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder für wenige Stunden in Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

Beginn der Weiterverarbeitung: Das heparinisierte Blut (2 ml) wurde mit Dulbecco's Phosphate Buffered saline (PBS) ohne Ca²⁺ und ohne Mg²⁺ (2 ml) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) in einem PP-Test-Röhren (greiner-bio-one/ Cellstar, DNase, RNase und Endotoxine frei, Zentrifugen-Röhren) gemischt. Diese 4 ml Blut-PBS-Gemische wurden in ein zweites Röhren mit 3 ml Ficoll-Paque™ Plus (Dichtegradient von Amersham Biosciences, endotoxin tested < 0,12 EU/ ml für Lymphozyten-Isolierung, steril)

überführt und aufgeschichtet. Dabei war zu beachten, dass Ficoll-Paque™ Plus am Grunde des PP-Test-Röhrchens weilte und das Blut-PBS-Gemisch vorsichtig ohne es mit dem Dichtegradienten zu vermischen aufgelagert wurde. Im Anschluss wurde bei 1400 U/min für 30 min ohne Bremse und bei 20°C zentrifugiert. (Gegengewicht!) Es bildete sich ein rot-schwarzer Niederschlag an der Basis aus Blutbestandteilen (Lymphozyten, Blutplättchen). Darüber lag eine durchsichtig-rote Fraktion mit Erythrozyten. In einer Zwischenschicht waren die von uns gesuchten determinierten mesenchymalen Stammzellen. Man konnte sie –meist undeutlich- als weißliche Schicht oberhalb der durchsichtigen Schicht und unterhalb einer deutlich-roten Schicht erkennen. Diese Zellen galt es mit Pipette zu extrahieren. Auf der deutlich roten Schicht, die ebenfalls mit Erythrozyten und Zellplasma angefüllt war, schwammen -mal mehr, mal weniger sichtbar- Fettzellen.

Zur Extraktion musste man die oberen beiden Schichten vorsichtig und sorgfältig abpipettieren. Der dann gewonnene Anteil an mesenchymalen Stammzellen aus der dritten Fraktion wurde erneut in ein PP-Test-Röhrchen (greiner-bio-one) gegeben und mindestens der 3-fachen Menge an PBS-Puffer aufgefüllt (Aufreinigung der Zellfraktion). Es erfolgt die Zentrifugation bei 400 U/min für 10 min mit Bremse und bei 20°C. Die gesuchten Zellen setzten sich in einer schlecht abgrenzbaren Fraktion an der Basis der PP-Test-Röhrchen (greiner-bio-one) ab. Man entnahm den untersten ca. 1 ml und transferiert nach dieser 2. Zentrifugation die Zellen in eine 50 ml Kulturflasche (greiner-bio-one/Cellstar, 25cm², DNase und RNase frei, steril) zusammen mit 8-10 ml Minimal Elektrolyt Medium + Earle`s Salz + 25 mM HEPES (MEM) (Gibco/ Invitrogen life technologies, steril), 20% fetalem Kalbsserum (FKS) (Gibco/ Invitrogen life technologies, EU gesicherter Ursprung, hitzeinaktiviert), 1% Streptomycin/Penicillin (10.000 Einheiten/ ml, Penicillin G und 10.000 Mikrogramm/ ml Streptomycin-Sulfat in 0,85% Salzlösung, von Gibco/ Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Germany) und 1% 200mM L-Glutamin (100x) (Gibco/Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Germany). Für 24 Stunden wurde die mit Stammzellen gefüllte kleine Zellkulturflasche (greiner-bio-one/Cellstar, 25cm², DNase und RNase frei, steril) in einem Brutschrank inkubiert. Das Klima in dem Brutschrank beträgt 37°C und 5% CO₂. Nach einem Tag wurde das MEM-Medium mit Zusätzen gewechselt.

Für eine Woche wurde die kleine Zellflasche zur Bebrütung bei 37°C und 5% CO₂ in einen Brutschrank gelegt. Dann wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert.

Bei genügend sichtbaren Zellen wurden diese in eine große Zellkulturflasche eingebracht. Dazu wurden die Zellen nach Entnahme des Nährmediums mit PBS-Puffer (PAA

Laboratories GmbH, Pasching, Austria) gespült und mit Trypsin-EDTA-Lösung (1-2 ml) (Verhältnis 0,05 %/ 0,02 % (W/V) in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) beschickt. Durch das Hinzugeben des PBS-Puffers (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) wurde das Lösen der Zellen durch Trypsin-EDTA-Lösung (Verhältnis 0,05 %/ 0,02 % (W/V) in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) deutlich beschleunigt. Wenn die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle zu wenigstens 80-90% sich bei Bewegen der Flasche ebenfalls bewegen und schwimmen, d.h. abgelöst hatten, konnten durch Zugabe von MEM-Medium die Zellen in die große Zellflasche mit 250 ml (greiner-bio-one/Cellstar, 75 cm², DNase und RNase frei, steril) transferiert werden. Dann wurden sie wieder zu den oben schon genannten Konditionen für eine weitere Woche in den Brutschrank gelegt.

Mikroskopisch wurde kontrolliert, ob sich ein einigermaßen dichter Zellrasen gebildet hatte (Zell-Konfluenz etwa 90%). Daraufhin wurde das Medium abgeschüttet und mit PBS-Puffer gespült und 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom, Germany) zum Lösen der Zellen in die große Kulturflasche (greiner-bio-one/Cellstar, 75 cm², DNase und RNase frei, steril) gegeben. In der Folge wurde einige Minuten inkubiert und unter erneuter mikroskopischer Sicht kontrolliert, ob sich die Zellen zu wenigstens 80 % abgelöst haben. Wenn das der Fall war, wurde zu den schon vorhandenen 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Biochrom, Germany) 8 ml MEM mit den oben genannten Zusätzen mit fötalem Kalbsserum in die Kulturflasche gegeben (insgesamt 10 ml in der Flasche). Bei den mesenchymalen Stammzellen wurden wiederholt Immunfärbungen mit Anti-Aggregan durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den Stammzellen um die angesprochenen mesenchymalen Zellen handelt.

2.1.2. Lösen und Passagieren bzw. Aufteilen von Zellen aus Zellflaschen mit Trypsin-EDTA

Zuerst wurden die Zellkulturflaschen entweder 50 ml (greiner-bio-one/Cellstar, 25 cm², DNase und RNase frei, steril) oder 250 ml (greiner-bio-one/Cellstar, 75 cm², DNase und RNase frei, steril) per mikroskopischer Aufsicht darauf kontrolliert, ob die Konfluenz der bebrüteten Zellen wenigstens 70% war. Das alte Kulturmedium wurde mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. - In ganz seltenen Fällen wurden zu Kontrollzwecken oder bei nicht adhären Zellen, die alten Medien nicht verworfen und wieder in neue Zellkulturflaschen zur weiteren Bebrütung gegeben. - Im Anschluss wurden die Zellen 1-2x mit 7-10 ml PBS

(Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gespült. Dabei ist es von Vorteil, wenn man die Zellkulturflasche ein wenig schwenkt, um sicher zu gehen, dass man alle Zellen erreicht. Das PBS wurde wieder abgesaugt und man gab bei den 25 cm² Zellkulturflaschen insgesamt 2 ml Trypsin-EDTA (Verhältnis 0,05 %/ 0,02 % (W/V) in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und bei den 75 cm² Zellkulturflaschen 4 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen. Danach wurde die Zellkulturflasche verschlossen und für 5-10 min in den Brutschrank zur Inkubation gestellt. Nach Ablauf der Zeit nahm man die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank und kontrollierte die ungefähre Menge der abgelösten Zellen. Für den Fall, dass sich mindestens 70-80 % der Zellen vom Boden abgelöst hatten, konnten die Zellen zur weiteren Verarbeitung genutzt werden. Wenn sich noch nicht 80 % der Zellen gelöst hatten, wurden die Zellen für weitere Minuten in den Brutschrank zurückgestellt. Ablösung der Zellen konnte durch Schwimmen der abgekugelten Zellen in der Flüssigkeit im Mikroskop (Leica DM IL von Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Germany) gesehen werden. Für den Fall, dass sich Zellen nur sehr schlecht gelöst haben, konnte man ebenfalls die Zellkulturflaschen mit leichter Kraft auf einen Tische oder eine Kante schlagen. Häufig lösten sich die Zellen dann doch ohne längere Inkubation relativ gut. In die mit Trypsin-gelösten Zellen wurden die vorbereiteten frischen Medien gegeben. Das Trypsin-EDTA wurde durch die hinzu gegebenen Medien neutralisiert und war für die Zellen somit nicht mehr schädlich oder anderweitig beeinflussend. Die Zellen konnten wieder über längere Zeit in den Brutschrank zum erneuten Wachstum gegeben werden. Das Klima im Brutschrank betrug 37°C und 5% CO₂. Für den Fall, dass man die Zellzahl, der jetzt in den Zellkulturflaschen vorhandenen Zellen, wissen wollte, musste man ein Zentrifugenröhrchen mit einer bestimmten Volumenmenge füllen (z. B. 1 ml). Jetzt konnte man die Zellen per Neubauer-Zählkammer (LO LaborOptik, Friedrichsdorf, Germany, 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz ohne Federkammer von Marienfeld mit 0,1 mm Tiefe und doppeltem Teilnetz) auszählen. Das Procedere wird im Einzelnen noch besprochen.

2.1.3. Einfrieren von Zellen bei -80°C

Um auf bestimmte Zellreihen immer wieder zurückgreifen zu können, wurden von den frühen Passagen oder Teilungen (Zellsplits) Zellen abgezweigt und eingefroren. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurde wie beim Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Phosphate Buffered saline (PBS) ohne Ca²⁺ und ohne Mg²⁺

(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Verhältnis 0,05 %/ 0,02 % (W/V) in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) inkubiert. Die gelösten Zellen wurden mit einem bestimmten Volumen in ein steriles PP-Test-Röhrchen (greiner-bio-one/Cellstar) oder ein Einfrier- bzw. Cryo-Röhrchen gegeben (ebenfalls greiner-bio-one/Cellstar). Es wurden entweder nur die Zellen mit dem Trypsin-EDTA oder wahlweise zu dem Trypsin-EDTA vor der Auszählung Medium gegeben. Es ergaben sich bei Überprüfungen keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Vorgehensweisen. Entscheidend in diesem Fall war die bestimmte Volumenmenge. Als nächstes wurde die Neubauer Zählkammer (LO LaborOptik, Friedrichsdorf, Germany, 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz ohne Federkammer od. Marienfeld 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz) vorbereitet. Man gab dann einen Tropfen des Zellmediums an den Rand der Glasplatten und zählte bei entsprechender Vergrößerung (meist 100x) unter dem Lichtmikroskop (Leica DM IL von Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Germany) aus. Für das spätere Einfrieren war es von Bedeutung, dass insgesamt wenigstens 6-7x 10⁶ Zellen in dem Mediumvolumen vorhanden waren, damit später die Wahrscheinlichkeit vergrößert wurde, beim Wiederauftauen der Zellen erneutes Wachstum zu erreichen. Die ermittelte Zellzahl beim Auszählen wurde notiert. In der Folge wurde das komplette Zell-Medium-Volumen in ein PP-Test-Röhrchen gegeben und bei 500 U/min und 20°C für 5 Minuten zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen. Eine war eher fest, die andere war eher flüssig. Die obere Schicht ist die, in der sich das Medium befand, die Untere, in der sich die Zellen befanden. Die obere Phase wurde abpipettiert und verworfen. Die untere wurde weiterverwendet. Zu den jetzt sich noch im PP-Test-Röhrchen befindenden Zellen wurde Einfriermedium gegeben. Es bestand aus MEM-Medium mit Glutamin (Gibco/ Invitrogen life technologies, steril), 20% fetalem Kalbsserum (FKS) (Gibco/ Invitrogen life technologies, EU gesicherter Ursprung, hitzeinaktiviert), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck KGaA, Germany, Reinheit > 95%). Mit dem Medium wurden die Zellen resuspeniert. Die Suspension wurde in 1, 2 oder 5 ml Cryo-Röhrchen gegeben und in den Kühlschrank bei + 4°C gestellt. Nach 10-15 Minuten wurden die Cryo-Röhrchen vom Kühlschrank in die Gefriertruhe bei -20°C gestellt. Nach weiteren 25-30 Minuten wurden die Zellen zur Langzeiteinfrierung in die -80°C Gefriertruhe gestellt und verpackt. Um sicherzustellen, dass die eingefrorenen Zellen nach Wiederauftauen auch erneut wachsen, wurden zu Beginn der Versuchsreihen immer wieder eingefrorene Zellen aufgetaut und auf Wachstum kontrolliert.

2.1.4. Auszählen der Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops und Zählkammer

Um sich einen Eindruck über die Zellmenge zu verschaffen, wurden Zellen aus Zellflaschen oder 6-Loch-Platten mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DM IL von Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Germany) und einer Neubauer-Zählkammer (LO LaborOptik, Friedrichsdorf, Germany, 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz ohne Federkammer od. Marienfeld 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz) ausgezählt. Dazu wurden die Zellen zuerst nach beschriebenem Verfahren mit Trypsin-EDTA (Verhältnis 0,05 %/ 0,02 % (W/V) in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) abgelöst und 1 ml der Zellsuspension aus dem Gefäß entnommen. Von diesem Milliliter wurden etwa 20 µl auf die Enden der Neubauer-Zählkammer gegeben. Diese wurde zuvor mit einem Glasplättchen verschlossen, welches sich durch destilliertes Wasser an die Oberfläche der Zählkammer presste. Bei 100facher Vergrößerung wurden die Zellen ausgewertet. Dabei wurden immer mindestens 4 große Felder ausgezählt.

2.1.5. Auszählen der Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops (computergestützt)

Die Zellen wurden nach den verschiedenen Verfahren (zum Beispiel mit BrdU) gefärbt. Die Zellen wurden in den Lochplatten oder auf den Objektträgern belassen, in denen sie kultiviert und fixiert wurden. Mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Carl Zeiss, AG, Deutschland) und der dazu gehörenden Software, wurden die Zellen mit einer Kamera auf den Bildschirm eines Personal Computers abgebildet. Es wurden mindestens 3 Gesichtsfelder ausgezählt, häufig sogar 10 Gesichtsfelder, um die Verlässlichkeit der Werte zu erhöhen. Um eine weitere Verbesserung der Zahlenwerte zu ermitteln, wurden die Zellen einzeln mit farbigen Punkten markiert und somit nicht überflüssig zu viel oder zu wenig gezählt. Es wurden immer die gefärbten gegen die nicht-gefärbten aufgetragen und als Quotient verrechnet.

2.1.6. Anlegen einer Wachstumskurve mit 6-Loch-Platte

Um eine Wachstumskurve zu erstellen, wurden zu Beginn aus einer großen Zellflasche, die mit Trypsin-EDTA (Verhältnis 0,05 %/ 0,02 % (W/V) in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gelösten mesenchymalen Stammzellen entnommen und mit einer Neubauer-Zählkammer (LO LaborOptik, Friedrichsdorf, Germany, 0,1 mm Tiefe mit

doppeltem Teilnetz ohne Federkammer oder Marienfeld 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz, Germany) unter dem Mikroskop (Leica DM IL von Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Germany) manuell ausgezählt. Die Vorgehensweisen wurden schon früher ausführlich besprochen. Eine vorgegebene Zellzahl wurde in die verschiedenen Löcher der Lochplatten gegeben. Es wurde dabei von einer absoluten Zahl an Zellen ausgegangen, weil es später einfacher war, die tatsächlichen Zellzahlen zu ermitteln. Es wurden im Normalfall mindestens drei Löcher mit Medium und Zellen gefüllt, um die Möglichkeit einer Fehlerbalken-Rechnung zu haben. Als Medium wurde MEM-Medium mit Glutamin (steril, Gibco/ Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Germany) mit Zusätzen genutzt, die nach Versuchsvorgabe in ihrer Zusammensetzung variieren konnten. Die Lochplatte wurde dann für eine entsprechende Anzahl an Tagen in den Brutschrank (37°C und 5% CO₂) gestellt. Nach wenigen Tagen wurden die Zellen auf mindestens 70% Konfluenz unter dem Mikroskop kontrolliert. Wenn das der Fall war, wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA von der Lochoberfläche gelöst und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde notiert und verhältnismäßig verdünnt. Die gelösten Zellen wurden mit Medium verdünnt und von den ersten in die zweiten Löcher transferiert. Es wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben und erneut inkubiert. Die Verdünnungsfaktoren wurden ebenfalls notiert, um später eine entsprechende Auswertung vornehmen zu können. Die Wachstumskurven wurden so über einen Zeitraum von 2 oder 3 Wochen erstellt.

2.1.7. Anlegen eines Wachstums-Assays mit einer 6-Loch Platte

Am Tag 0 werden in eine 12-Well-Platte initial 10.000 Zellen pro Loch gegeben. In unserem Fall waren es adulte, humane mesenchymale Stammzellen. Sie wurden für 24 h in MEM-Medium mit Glutamin sowie 20% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. Es folgt die Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ für 24 Stunden. In der Folge müssen die Zellen "hungern". Dies geschieht durch die Zugabe von MEM-Medium mit 0,5 % fötalem Kalbsserum. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der eigentliche Wachstums-Assay begonnen. Zu den mesenchymalen Stammzellen wurden die verschiedenen Medien mit den Proteinen oder Kontrolllösungen gegeben. Die Zellen werden für wenigstens 60 h, aber maximal 72 h, inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einer Zählkammer per Mikroskop ausgezählt.

Folgende Medien wurden als Beispiel für die aktuellen Versuche verwendet:

Medium: MEM + 0,5% FKS + Glutamin + 1% Streptomycin/Penicillin (Wells 1,5,9)

MEM + 0,5% FKS + Glutamin + 1% Streptomycin/Penicillin + 1 ng/ml TGF- β (Wells 2,6,10)

MEM + 0,5% FKS + Glutamin + 1% Streptomycin/Penicillin + 100 ng/ml SHH (Wells 3,7, 11)

MEM + 20% FKS + Glutamin + 1% Streptomycin/Penicillin (Wells 4,8,12)

2.1.8. Färbung mit Alzianblau nach Mowry²⁴⁴

Bevor mit der Färbung begonnen werden kann, muss zuerst der Farbstoff angerichtet werden. Dazu wurde 1g Alzianblau in 100 ml 3%iger Essigsäure gelöst. Es sollte darauf geachtet werden, dass der pH-Wert auf 2,5 eingestellt war. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch zusätzlich steril filtriert. Als Gegenfärbung wurde eine Kernecht-Lösung vorbereitet. Sie bestand aus 0,1 g Kernechtrot und 100 ml 5% wässrige Aluminiumsulfat-Lösung. Die Lösung sollte nach Möglichkeit warm bis heiß sein, damit eine bessere Durchmischung gewährleistet war. Auch hier wurde wiederum steril filtriert.

Wenn die Färbelösungen vorbereitet waren, wurde zu Beginn das Medium abgesaugt. Es folgte 3 mal 10 minütiges Waschen mit Xylol. Dann wurde eine Alkoholreihe angeschlossen. Dabei wurde in absteigender Reihenfolge zuerst 98%, 96%, 90%, 80%, 70% Ethylalkohol für 5 Minuten auf die Zellen gegeben. Als Abschluss der Alkoholreihe wurde mit destilliertem Wasser für 5 Minuten gespült. Danach gab man für 3 Minuten 3%ige Essigsäure auf die Zellen. Es folgte der erste Färbeschritt mit Alzianblau. Danach wurde erneut 3%ige Essigsäure zum Spülen auf die Zellen gegeben. Schon eine kleine Menge des Färbemittels reichte aus, um die Zellen deutlich zu färben, der Rest des Farbstoffs wurde durch Spülen mit Leitungswasser aus den Zellen gelöst. Dies geschah etwa für 2 Minuten. Es folgte der zweite Färbeschritt mit Kernecht-rot. Die Färbung verblieb für 5 Minuten auf den Zellen. Danach wurde der Farbstoff wieder aus den Zellen gespült. Zum Abschluss wurden die Zellen noch einmal mit 96%igem und 100%igem Ethylalkohol und Xylol gespült, um das Wasser aus den Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden mit Entellan eingedeckelt. Somit waren sie fixiert und konnten gelagert werden.

2.1.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei dieser Färbung wurden die Zellen zuerst für 4-8 min in eine vorgefertigte Hämalaun-Lösung (nach Mayer) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), die zuvor steril filtriert wurde, gegeben. Danach gab man für 2 Minuten destilliertes Wasser hinzu, um den Farbstoff zu lösen. Für den seltenen Fall, dass die gefärbten Zellen differenziert werden sollten, wurde für einen Augenblick eine 0,75 %ige Salzsäure-Alkohol-Lösung (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany, steril, filtriert) hinzugegeben. Da viele Zellen auch durch die kurze Behandlung mit der Lösung zersetzt wurden, wurde dieser Schritt häufig ausgelassen. Das Weglassen hatte auch keine Folgen für das weitere Procedere der Färbung. Dann wurde der überflüssige Rest des Hämalauns mit fließendem Wasser für 10 Minuten ausgewaschen. Nun folgte die Gegenfärbung mit Eosin G-Lösung 0,5% wässrig (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) für 3-5 Minuten. Danach wurde eine Alkoholreihe angeschlossen. Es wurde mit 70%igem Ethanol (AppliChem) begonnen, dann 80%iger Ethanol (J.J. Baker, Deventer, Holland), dann 96 %iger Ethanol (J.J. Baker) und zum Schluss 99%iger Ethanol. Bis auf den 99%igen Ethanol werden alle Zellen nur kurz mit den Ethylalkoholen abgespült, da sich Eosin schnell von den Zytoplasmen löst. Der 99%ige Ethanol wird für 2 x 2 Minuten auf die Zellen gegeben. Als letztes wird Xylol die 2 x 2 Minuten auf die Zellen gegeben. Falls die Zellen abgedeckt und versiegelt werden sollen, wird mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) eingedeckelt. Nach der Färbung können die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Dabei ist der Kern bläulich, das Zytoplasma ist rötlich.

2.1.10 Färbung mit Trypanblau

Vor Beginn der Färbung musste eine Trypanblau-Lösung (0,2 Gew.-%) in PBS-Puffer hergestellt werden. Dann wurden 450 µl Trypanblau-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Zu der Lösung wurde 50 µl der Zellsuspension hinzugegeben. Verdünnung 1:10. Nach Möglichkeit sollte die Zellsuspension eine Zellmenge von etwa 10^6 Zellen/ml enthalten, um entsprechend valide auszählen zu können. Eine Neubauer-Zählkammer (LO LaborOptik, Friedrichsdorf, Germany, 0,1 mm Tiefe mit doppeltem Teilnetz ohne Federkammer) wurde vorbereitet. Die Zellsuspension wurde an die Ränder des Deckglases gegeben und durch Kapillarwirkung unter das Glas gezogen. Nun wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DM IL von Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Germany) die Eckquadrate ausgezählt. Die

durch Trypanblau-Lösung gefärbten, abgestorbenen Zellen wurden gezählt, ebenso wie die ungefärbten, lebendigen Zellen.

Zur Berechnung des Quotienten zwischen lebenden und toten Zellen wurde folgende Gleichung genutzt:

Gezählte lebende Zellen

----- = Zellzahl/ ml

Anzahl der gezählten Eckquadrate x 10^4 (Kammerfaktor) x 10 (Verdünnung)

Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurde mit folgender Gleichung gearbeitet:

Vitalität in % = gezählte, lebende Zellen x 100/ Gesamtzellzahl (lebende und abgestorbene Zellen)

Diese Färbung und Berechnung wurde standardmäßig bei allen Zellen durchgeführt.

2.1.11 Immunhistochemische Färbung gegen Aggrecan

Bei dem hier beschriebenen Verfahren handelte es sich um eine Färbung, die auf dem Prinzip der Bindung von Antigen und Antikörper basiert. Im Einzelnen wurde Folgendes durchgeführt.

Zu Beginn wurde die endogene Peroxidase der Zellen blockiert, um spätere Interaktionen mit der hinzugegebenen Peroxidase zu vermeiden. Dazu wurden 300 µl Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in 20 ml Methanol gelöst und für 10 Minuten auf die Zellen gegeben. Darauf wurden die Zellen für 3 x 10 Minuten mit 0,02 M Phosphat- gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Es folgte ein Inkubationsschritt, bei dem für 30 Minuten normales Pferde-Serum (NHS, Gibco/ Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Germany) auf die Zellen gegeben wurde, das in PBS/Triton (Verhältnis 1:20 von NHS zu PBS/Triton) gelöst wurde. Das Mischungsverhältnis von PBS zu Triton (Triton X-100, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) war 3 ml Triton auf 1000 ml 0,02 m PBS-Puffer. Nun wurde der 1. Antikörper, das Anti-Aggrecan (DPC Biermann, Bad Nauheim, Germany, IgG1 aus Kaninchen) auf die Zellen pipettiert. Der Anti-Körper wurde mit PBS/Triton verdünnt. Dabei wurde eine Konzentration von 1:10 benutzt. Der 1. Antikörper verblieb über Nacht bei Raumtemperatur auf den Zellen, um mit ihnen zu reagieren. Falls es nicht möglich war am folgenden Tag die Färbung fortzusetzen, wurden die Reaktionsgefäße mit den Zellen für maximal 3 Tage im Kühlschrank bei + 4°C gelagert.

Am folgenden Tag wurde das Inkubationsmedium von den Zellen abpipettiert und die Zellen erneut 3 x 10 Minuten mit 0,02 M PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde der 2. Antikörper, ein Anti-Kaninchen-IgG-Biotin-Konjugat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), welcher im Verhältnis 1:100 mit PBS/Triton-Lösung gemischt wurde, für 60 Minuten auf die Zellen gegeben. Es folgte erneut dreifache Spülung mit 0,02 M PBS-Puffer. An den 2. Antikörper wurde nun das Enzym Peroxidase gebunden, welches an ExtraAvidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) gebunden war. Mischungsverhältnis zwischen ExtraAvidin-Peroxidase und PBS/Triton-Lösung war 1:100. Das ExtraAvidin wurde für mindestens 60 Minuten auf den Zellen belassen. Nach dem Inkubationsschritt wurden die Zellen noch einmal 2 x 10 Minuten mit 0,02 M PBS-Puffer und für 1 x 10 Minuten 0,05 M Tris-Puffer gespült. Dann wurde 0,1 g 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in 200 ml Tris-Puffer lichtgeschützt gelöst. DAB war eine Substanz, die mit dem Enzym Peroxidase reagierte und eine Farbveränderung in den Zellen von durchsichtig klar zu braun vollführte.

Die Reaktion mit den Zellen wurde durch Zugabe von 200 µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gestartet. Das DAB wurde für 3-5 Minuten auf den Zellen belassen. Da DAB eine kanzerogene Substanz war, wurde sie im Anschluss an die Färbung mit Natriumhypochlorid-Lösung neutralisiert. Zum Abschluss der Färbung wurden die gefärbten Zellen einmal für 10 Minuten mit Tris-Puffer gespült. Am Ende der Färbung konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop (Leica DM IL von Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Germany) betrachtet werden. Falls die Zellen konserviert werden sollen, werden sie mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) oder KAISER's Glyceringelatine (Merck KGaA) und einem Objektglas (Coverslips) verschlossen.

Zum Abschluss der Beschreibung soll darauf hingewiesen werden, dass alle Puffer, bevor sie verwendet wurden, auf pH 7,40 eingestellt wurden, um den Zellen ein möglichst physiologisches Klima zu gewährleisten.

2.1.12 Immunhistochemische Färbung gegen 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)

Es handelt sich bei dem Verfahren um den Nachweis von inkorporiertem 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in Zellen. Die Wirkweise von BrdU wurde schon an früherer Stelle erklärt und soll hier nicht mehr ausgeführt werden. Es wurden die Zellen aus den Wachstumskurven oder Wachstums-Assays verwendet. Die Zellen waren in 6- oder 12-Lochplatten (greiner-bio-one/Cellstar, Frickenhausen, Germany) angewachsen und wurden mit verschiedenen Medien inkubiert. Nun musste in einem Schritt vor der eigentlichen Immun-Färbung dem BrdU eine Einwirkzeit gegeben werden. Bei den Wachstums-Assays waren das die letzten 2 Stunden am Ende der Wachstumsphasen von 72 Stunden. Das BrdU wurde in einem Verhältnis von 1:250 in die verschiedenen Kulturmedien hinzugefügt. Als die 2 Stunden verstrichen waren, wurde mit der Färbung begonnen.

Zuerst mussten die Zellen fixiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und verworfen. Auf die Zellen wurde für 10 Minuten 4%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) gegeben. In der Folge spülte man mit 0,1 molarem Phosphat-Puffer 1-2 mal. Um die Zellwand durchlässiger werden zu lassen, wurden die Zellen mit 2 normaler HCL-Lösung, ein Gemisch aus 50 ml 25% HCL (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) und 150 ml Aqua ad injectabilis, für eine Stunde inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurden die Zellen mit 0,02 molarer Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) zweimal für 10 Minuten gespült. Als nächster Schritt folgte eine

0,015 molare Kombinations-Lösung aus 20 ml Methanol und 300 µl Wasserstoffperoxid für wiederum 10 Minuten. Bevor die Zellen mit Serum vom Pferd (Gibco/ Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Germany) inkubiert wurden, wurden sie noch dreimal für 10 Minuten mit PBS gespült. Das Serum wurde im Verhältnis 1:20 mit PBS/Triton-Lösung ((0,02 M PBS-Lösung, Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany); es wurden 3 ml Triton auf 1000 ml 0,02 molaren PBS-Puffer gegeben) verdünnt. Inkubationszeit für das Pferdeserum waren 30 Minuten. Ohne weiteren Spülschritt folgte nun die Inkubation mit dem ersten Antikörper gegen BrdU. Dieser wurde aus Mäusen gewonnen. Der Antikörper wurde 1:100 mit PBS/Triton verdünnt und zu der Lösung wurden ebenfalls 5% Serumalbumin vom Ochsen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) gegeben. Der 1. Antikörper wurde über Nacht bei Zimmertemperatur auf einem Rüttelgerät gelagert und hatte durch die ständige Bewegung die Chance, auf alle Zellen einzuwirken. Für den Fall, dass die Versuche nicht am folgenden Tag fortgesetzt werden konnten, wurden die Zellen im Kühlschrank bei 4°C für maximal 3 Tage gelagert und spätestens danach weiterverarbeitet. Nach der Einwirkzeit über Nacht wurden die Zellen wieder mit PBS-Puffer gespült. Insgesamt wurde dreimal für 10 Minuten gespült. Dann folgte der 2. Antikörper. Es war ein IgG-Antikörper gegen Mäuseserum. An den Antikörper war Biotin konjugiert. Auch dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1:100 mit PBS/Triton verdünnt. Er wurde für 60 Minuten auf den Zellen belassen. Es folgte erneut eine dreifache Spülung mit PBS-Puffer. Als nächster Schritt folgte die Inkubation mit Extra-Avidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Auch diese wurde für 60 Minuten auf den Zellen belassen und im Verhältnis 1:100 mit PBS/Triton-Lösung verdünnt.

Es folgte ein weiterer Spülschritt. Zweimal 10 Minuten wurde PBS-Puffer auf die Zellen gegeben. Dann wurde die Reaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) vorbereitet. Dazu wurde zuerst einmal mit 0,05 molarem Tris-Puffer für 10 Minuten gespült. DAB musste lichtgeschützt gelöst werden, da es sich bei längerer UV-Exposition entfärbte. DAB wurde in einer Konzentration von 0,005 molar auf die Zellen gegeben. Um die Reaktion mit den Zellen zu starten, wurde eine kleine Menge Wasserstoffperoxid zur DAB-Lösung gegeben. Hierbei war zu beachten, dass der Einwirkzeitraum zwischen 3 und 5 Minuten lag, da die Reaktion relativ schnell und deutlich ausfiel. Da DAB kanzerogene Eigenschaften besaß, wurde nach Starten der Reaktion die übrige Lösung mit Natriumhypochlorid bzw. Chlorbleichlauge verdünnt und gesondert entsorgt. Nach der Einwirkzeit von DAB wurden die Zellen ein letztes Mal mit Tris-Puffer abgespült und im Mikroskop auf Farbreaktion geprüft. Die Zellen konnten danach zum

Beispiel mit Entellan eingedeckelt werden. Zum Abschluss der Beschreibung soll darauf hingewiesen werden, dass alle Puffer, bevor sie verwendet wurden, auf pH 7,40 eingestellt wurden, um den Zellen ein möglichst physiologisches Klima zu gewährleisten.

2.1.13 Reverse Transkriptase Poly-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Isolierung der RNA

Es wurde die Ribonukleinsäure von humanen mesenchymalen Stammzellen benutzt, die zum einen ohne Zusätze, mit TGF- β und Sonic Hedgehog Protein für 21 Tage inkubiert wurden. Die gesamte RNA wurde komplett aus den Zell-Pellets mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Als Positiv-Kontrolle wurden humane Chondrozyten benutzt. (Dank gilt Sven Schmitt, Orthopädische Klinik, Offenbach, Deutschland). Die Intaktheit der RNA wurde durch Gel Elektrophorese überprüft. (Dank für die Zusammenarbeit gebührt Stefan Göttig, Blutspendedienst Hessen/Baden-Württemberg; Frankfurt/Main, Deutschland).

Reverse Transkriptase-Polyketten-Reaktion (RT-PCR)

Der Nachweis von humanen Chondrozyten-spezifischen Transkripten wurde mit Reverse Transkriptase-Polyketten-Reaktion (RT-PCR) durchgeführt. 1 μ g RNA an intaktem Versuchsmaterial wurde mit dem Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Vorgaben des Anbieters revers transkribiert. Reverse Transkription wurde zunächst bei 42° für 50 Minuten durchgeführt. Folgende PCR Primer (Biospring, Frankfurt, Deutschland) wurden benutzt: Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gleichsinnig (sense), 5'-GAAGGT-GAA-GGT-CGG-AGT C-3', gegensinnig (antisense), 5'-GGAAGC-CCA-TCA-CCA-TCT-TC-3'; Aggrecan (AGC) gleichsinnig (sense), 5'-GGG-TCA-ACA-GTG-CCT-ATC-AG-3', gegensinnig (antisense), 5'-GGG-TGT-AGC-GTG-TAG-AGA-TG-3'; Kollagen Typ II (COL2A1) gleichsinnig (sense), 5'-TGG-CCTGAG-ACA-GCA-TGA C-3'; gegensinnig (antisense), 5'-AGTGTT-GGG-AGC-CAG-ATT-GT-3'; Kollagen Typ X (COL10A1) gleichsinnig (sense), 5'-GCA-ACT-AAG-GGC-CTCAAT-GG-3'; gegensinnig (antisense), 5'-GAG-CCA-CTA-GGAATC-CTG-AG-3'; Sox9 gleichsinnig (sense), 5'-AGA-CCT-TTGGGC-TGC-CTT-AT-3', gegensinnig (antisense), 5'-

TAG-CCT-CCCTCA-CTC-CAA-GA-3' und Chondrozyten exprimierendes Protein-68 (CEP-68).

Nach der initialen Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten folgten 35 thermische Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden, bei 56°C für 45 Sekunden und 72°C für 50 Sekunden. Die Reaktionsprodukte wurden durch Elektrophorese auf einem 2% Agarose Gel gelöst und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2.1.14 Anlegen der Mikro-Pellet Kultur

Wie in den vorangegangenen Versuchen werden auch hier die mesenchymalen Stammzellen während der Eröffnung des Femurschafts gewonnen. Die Stammzellen werden in Kulturflaschen mit MEM-Medium (+20% FKS + Streptomycin+ Penicillin und Glutamin) beschickt und, nachdem konfluentes Wachstum auftritt, gezählt. Die Zellen werden mit dem Medium zentrifugiert (1400 U/ min, 20°C, 15 min., mit Bremse). Das Medium wird nach der Zentrifugation bis auf etwa 2 ml abgesaugt und für eine Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Es bildet sich ein weißes Sphäroid.

Am nächsten Tag wird das Medium bis auf einen kleinen Rest um das Sphäroid abgesaugt und das Medium von MEM zu D-MEM (0,5 ml) gewechselt. In das DMEM werden neben einer Kontrolle zusätzlich Proben mit den Proteinen TGF-β (5 ng/ml) und Shh (100 ng/ml) bebrütet. Somit handelt es sich um 3 Ansätze. Die Medien werden alle 3 bzw. 4 Tage gewechselt. Nach 21 Tagen Bebrütung werden die Medien komplett aus dem Zentrifugen-Röhrchen entfernt und die verbleibenden Sphäroide werden zur Fixierung in Formalien gegeben und an die Pathologie zum Schneiden gegeben und zur Beurteilung vorbereitet.

Konzentrationen der Medien:

Kontrolle: DMEM + 50 mg/ ml ITS + 10⁷ M Dexamethason + 50 µg/ ml Ascorbat-2-phosphat + 40 µg/ ml Prolin + 100 µg/ ml Pyruvat

TGF-β (5 ng/ml): DMEM + 50 mg/ ml ITS + 10⁷ M Dexamethason + TGF-β1 (auf 50 ml kommen 5 ml mit 50 ml/ ng) + 50 µg/ ml Ascorbat-2-Phosphat + 40 µg/ ml Prolin + 100 µg/ ml Pyruvat

Shh (100 ng/ml): DMEM + 50 mg/ ml ITS + 10⁷ M Dexamethason + Shh (auf 50 ml kommt 1 ml mit 5 µg/ ml) + 50 µg/ml Ascorbat-2-Phosphat + 40 µg/ ml Prolin + 100 µg/ ml Pyruvat..

Ergebnisdarstellung:

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einer deskriptiven Form in Tabellen und Graphiken. In den Tabellen werden der zeitliche Verlauf (x- Achse, Abszisse) gegen die Wachstumsrate der Zellen (y-Achse, Ordinate) in Beziehung gesetzt.

Die Graphiken und Fotodokumentation zeigen die Morphologie, Quantität und Färbereigenschaften der unterschiedlich stark differenzierten Zellen.

Kapitel 3:

Ergebnisse

3. Resultate

3.1 Trypanblau-Färbung

Die Färbemethode wurde zur Zellviabilitätsmessung aller in den Wachstums- und chondralen Differenzierungsversuchen genutzten Zellen gebraucht. Der Nachweis für „lebendige Zellen“ in den primären Kulturen konnte in nahezu 100% der Proben für 100% der Zellen geführt werden.

Im zeitlichen Verlauf der Kultivierung von Primärkulturen war es nach vielfacher „Umbettung“ von Zellen nach dem zehnten, teilweise zwanzigsten Umbettungsvorgang zu einer Verschlechterung der prinzipiell hohen Zellviabilität gekommen. Diese Zellen wurden für keine weiteren Versuche genutzt und verworfen. Der Viabilitätsnachweis stellte die Basis für alle weiteren Versuche dar.

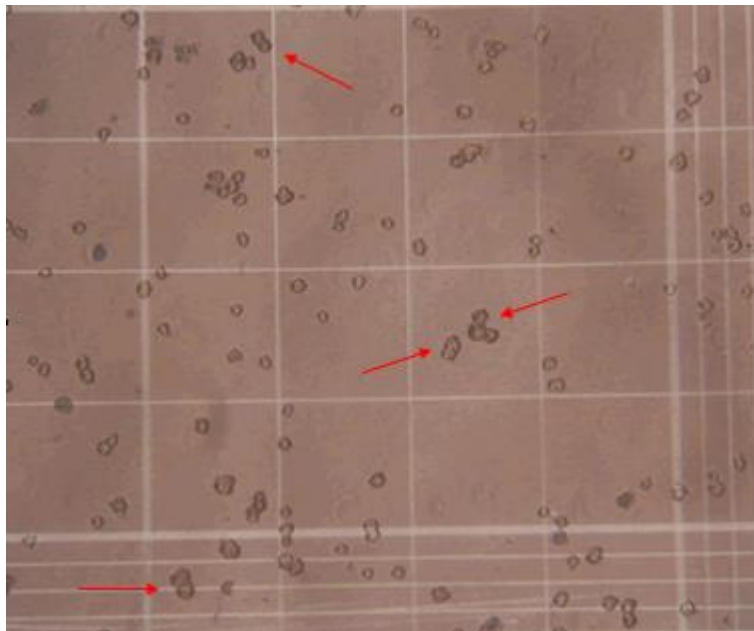


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Darstellung der Zell-Viabilitätsmessung von humanen mesenchymalen Stammzellen in Zellkammer mit Trypanblau. Die roten Pfeile zeigen Beispiele für lebende Zellen. Blaugefärbte Zellen sind abgestorben.

3.2 Qualifizierung der humanen mesenchymalen Stammzellen

Die im austretenden Blut aus den proximalen Femurschäften gewonnenen Zellen bestehen nicht nur aus den gewünschten Stammzellen, wenn auch davon auszugehen ist, dass die

mesenchymalen (Stamm-)Zellen in deutlich vermehrter Häufigkeit gerade dort vorliegen. Mit freundlicher Unterstützung des in Frankfurt ansässigen Blutspendedienstes Hessen/Baden-Württemberg konnten wir die gewonnenen Knochenmarkszellen mit verschiedenen Zellmarkern, wie CEP-68, COL 10, COL2A1, AGC und SOX-9 mittels PCR (Poly-Ketten-Reaktion) auf deren Zell-Expression zu Beginn der Wachstumskurven und am Ende der Versuchszeiträume testen. Die genannten Zellmarker konnten alle bereits in Beziehung mit der Differenzierung zu humanen mesenchymalen Stammzellen gebracht werden. CEP-68 wird zum Beispiel von mesenchymalen Stammzellen nicht exprimiert, während es von Chondrozyten exprimiert wird.¹⁴² COL 10, COL 2A1, Aggrecan und Sox9 gelten in Kombination als Differenzierungs-Cluster für chondrogene Differenzierung bei humanen mesenchymalen Stammzellen.¹⁴³ Wie in der Abbildung 13 zu erkennen ist, sind die verschiedenen chondrogenen Marker aufgetragen. Zusätzlich werden Kontrollen in Form des GAPDH (Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein ubiquitär in den Zellen vorkommendes Enzym, das unter anderem in der Glykolyse und Gluconeogenese seinen Stoffwechsel betreibt und eine Kontrolle „ctrl“ aufgetragen, um mögliche Fehlerquellen zu erkennen.

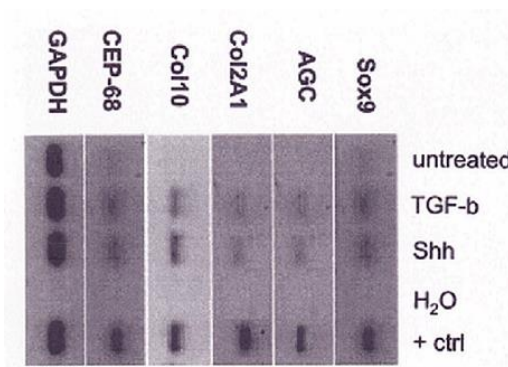


Abbildung 11: RT-PCR (Poly-Ketten-Reaktion)

Die Ergebnisse zu Beginn der Wachstumskulturen zeigen in der PCR für alle chondrogenen Marker eine nur leichte Ausprägung. Dies gilt sowohl für die mit TGF- β 1 als auch für die mit Shh substituierten Zellen. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass alle Zellen mesenchymalen Ursprungs sind und die überwiegende Zahl an Zellen in der jeweiligen Kultur humane mesenchymale Stammzellen sind. Zellkulturen, die diesem initialen Anforderungsprofil nicht entsprachen, wurden nicht in die folgenden Versuchsreihen eingeschlossen.

3.3 Zeit- und Dosis-/Wirkungsprofil von rekombinantem n-terminalem Sonic Hedgehog Protein

r-Shh (ng/ml)	72 h		96 h		120 h	
	Zellzählung (x1000)	Wachstum (%)	Zellzählung (x1000)	Wachstum (%)	Zellzählung (x1000)	Wachstum (%)
0	21,7 +/-7,7	0	25,0 +/-2,7	0	22,1 +/-2,6	0
1	22,2 +/-5,0	2,3	26,3 +/-3,1	5,2	25,4 +/-2,6	14,9
50	27,9 +/-5,0	28,6	28,3 +/-1,2	13,2	30,4 +/-2,1	37,6
100	26,3 +/-5,1	21,2	29,6 +/-2,1	18,4	30,0 +/-3,1	35,7

Tabelle 1: Zeit- und Dosis-/Wirkungsprofil von rekombinantem, n-terminalem Sonic Hedgehog Protein. Werte wurden mit +/- mittlere Standardabweichung aufgetragen. Die initial ausgesäte Zellmenge waren 10.000 Zellen/Well. Die Wachstums%-Zahlen wurden in direkter Beziehung zur Kontrolle gesetzt.

Die Auswertung der Tabelle zeigt, dass die optimale Dosis von r-Shh bezogen auf das Wachstum von mesenchymalen, adulten Stammzellen nach 3 Tagen Bebrütung zunächst offenbar um oder größer 50 ng/ml liegt. Nach 4-5 Tagen gleichen sich die Dosis-Wirkungskurven von 50 ng/ml und 100 ng/ml an.

Für die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Versuche wurde die Dosis 100 ng/ml entschieden. Von anderen Autoren und Artikeln lässt sich entnehmen, dass die Bandbreite der Dosis-Gaben von Sonic Hedgehog Protein durchaus sehr groß ist. Sie erstreckt sich von 10 ng/ml¹⁰¹ bis zu 500 ng/ml¹⁰² für verschiedene Gewebstypen, Wachstum und Differenzierung. Somit liegt die genutzte Versuchsdosis im Rahmen der zuvor bereits genutzten Dosismengen und ist, anhand der Versuche erkennbar, die aus unserer Sicht „optimale“ Dosis für die untersuchten mesenchymalen Stammzellen.

3.4 Versuchsreihen/Wachstumskurven mit TGF-β und Sonic Hedgehog Protein in 6-Well für mindestens 21 Tage

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

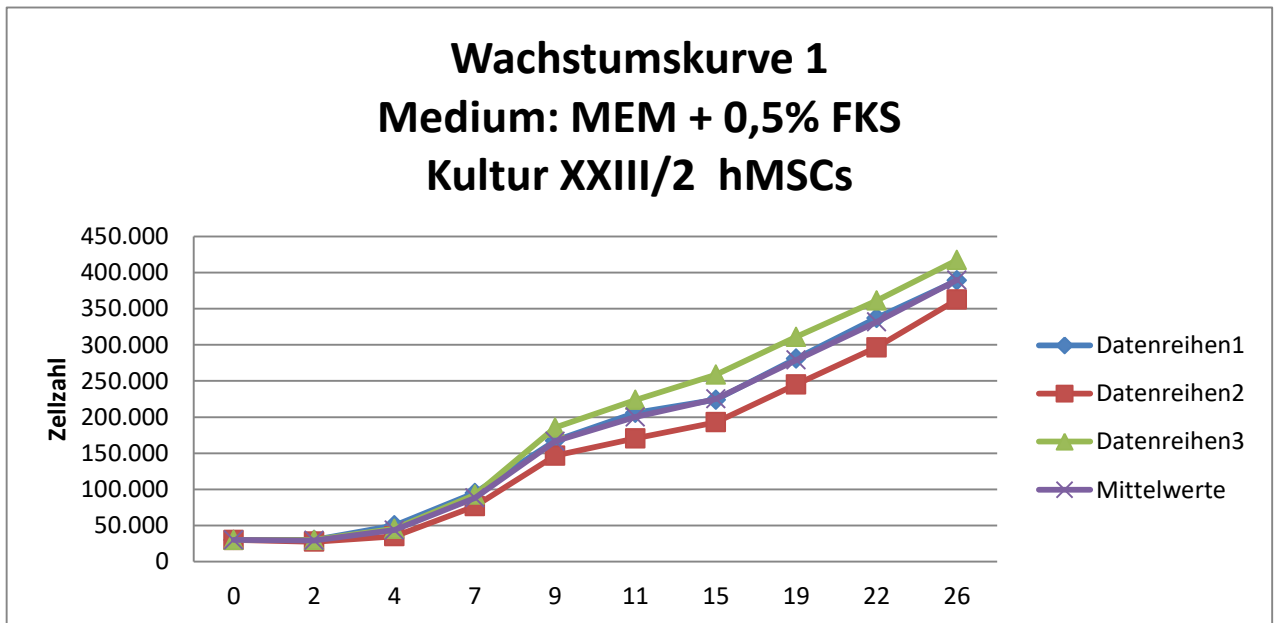


Diagramm-Nr. 1: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

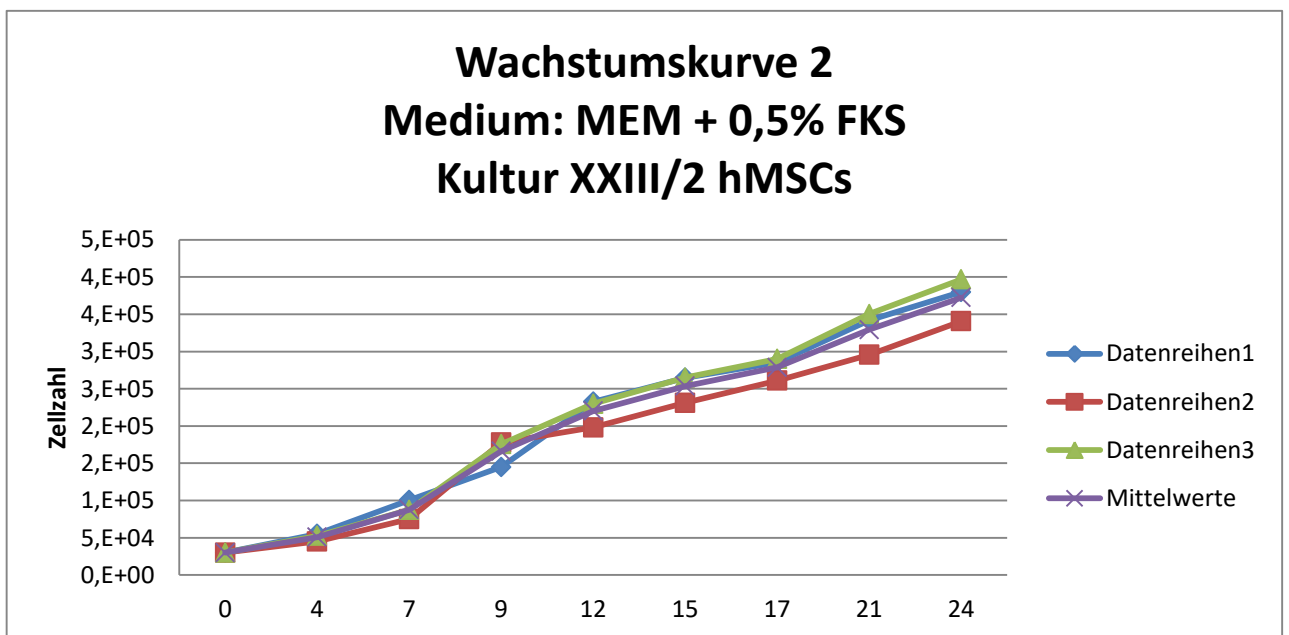


Diagramm-Nr. 2: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

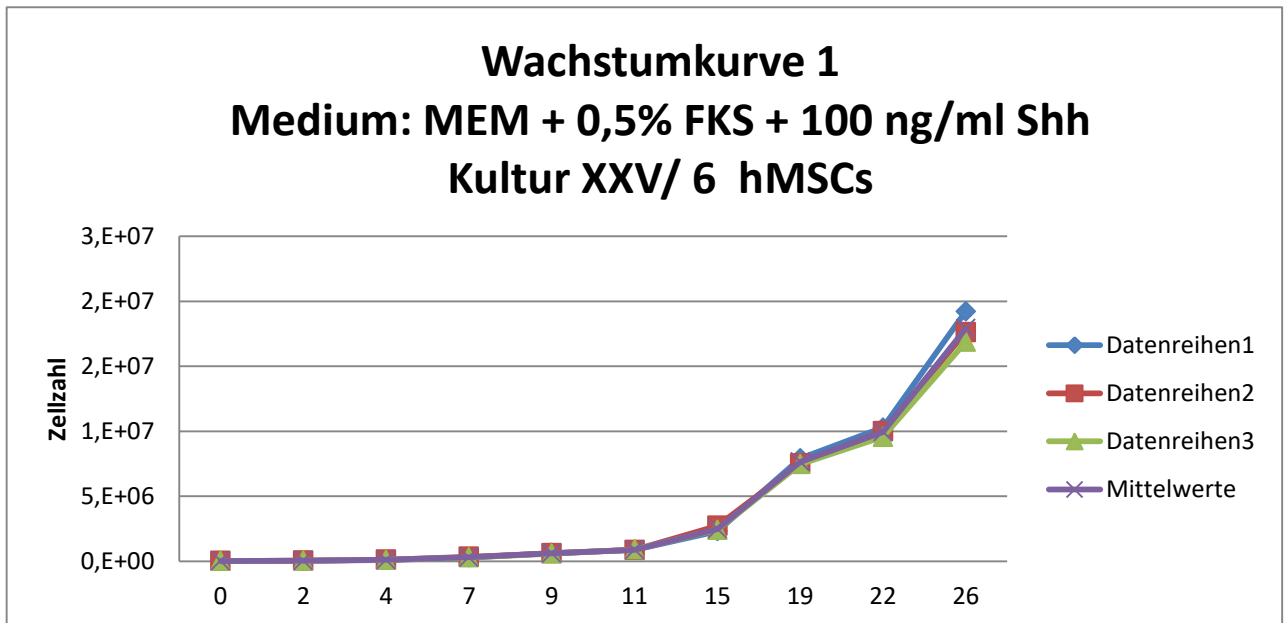


Diagramm-Nr. 3: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

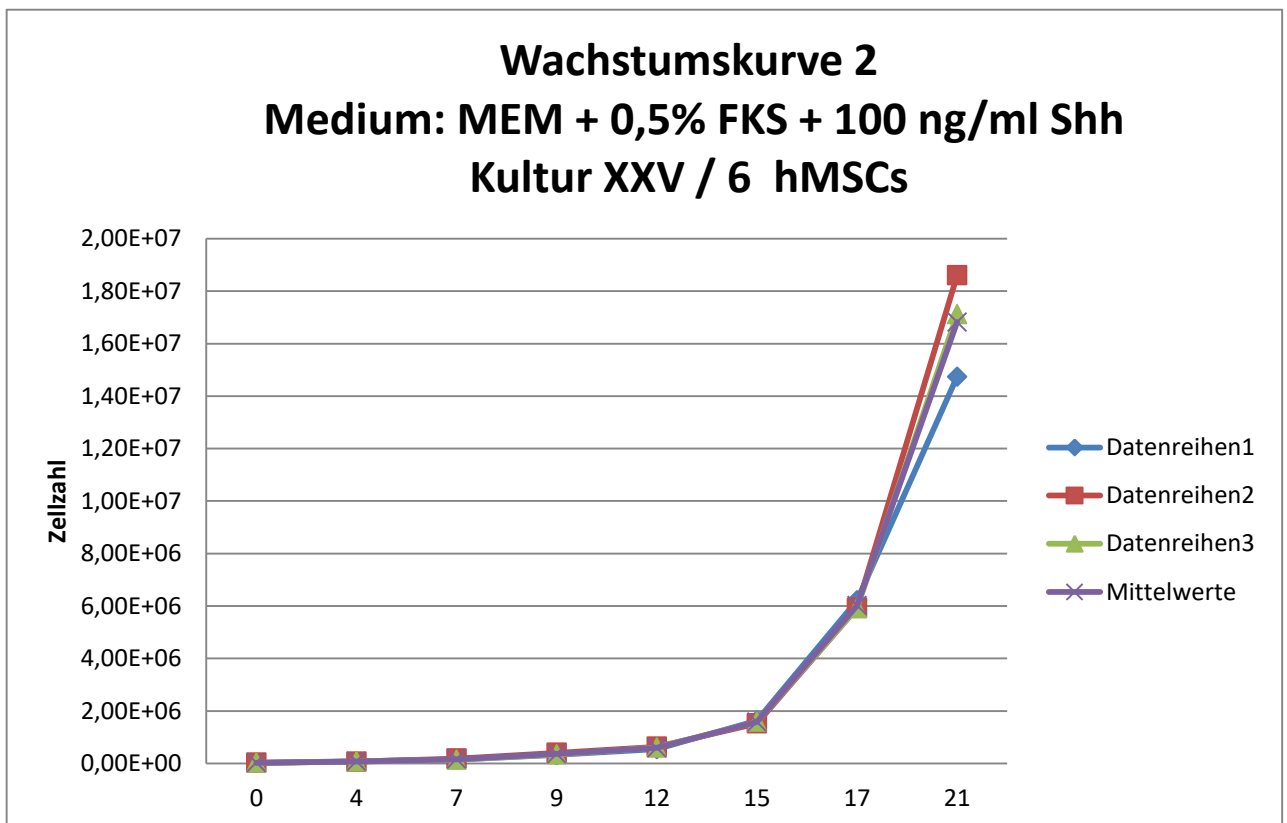


Diagramm-Nr. 4: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF- β 1+ 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

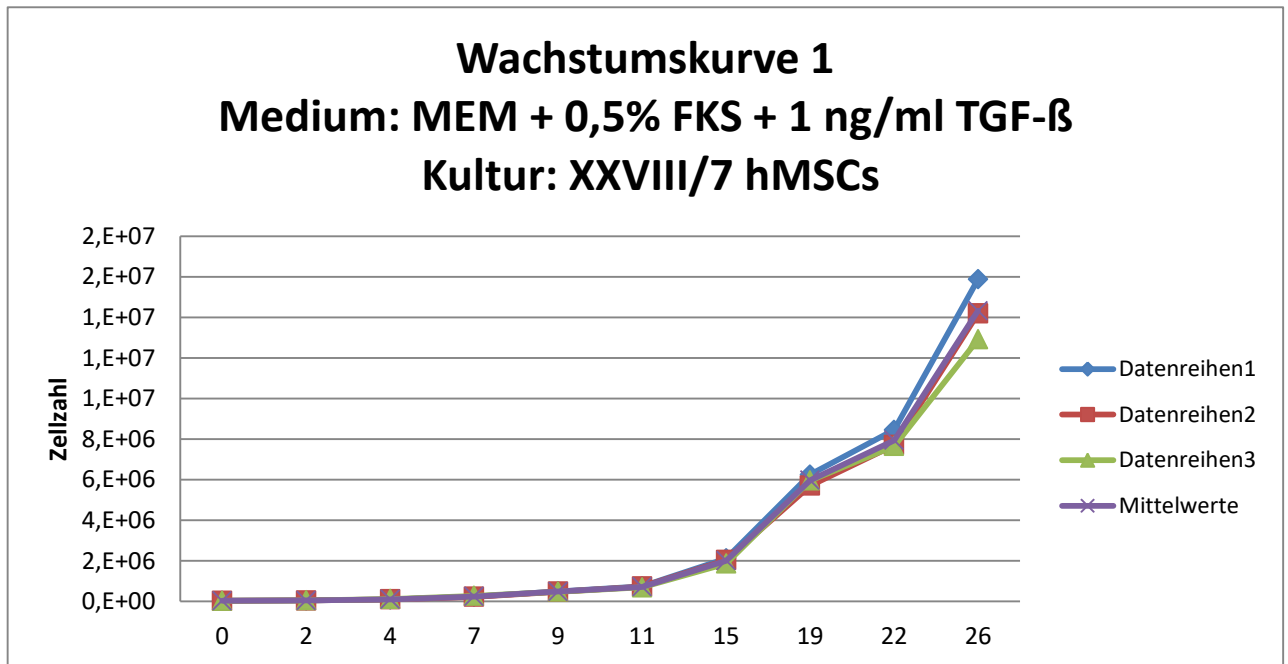


Diagramm-Nr. 5: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

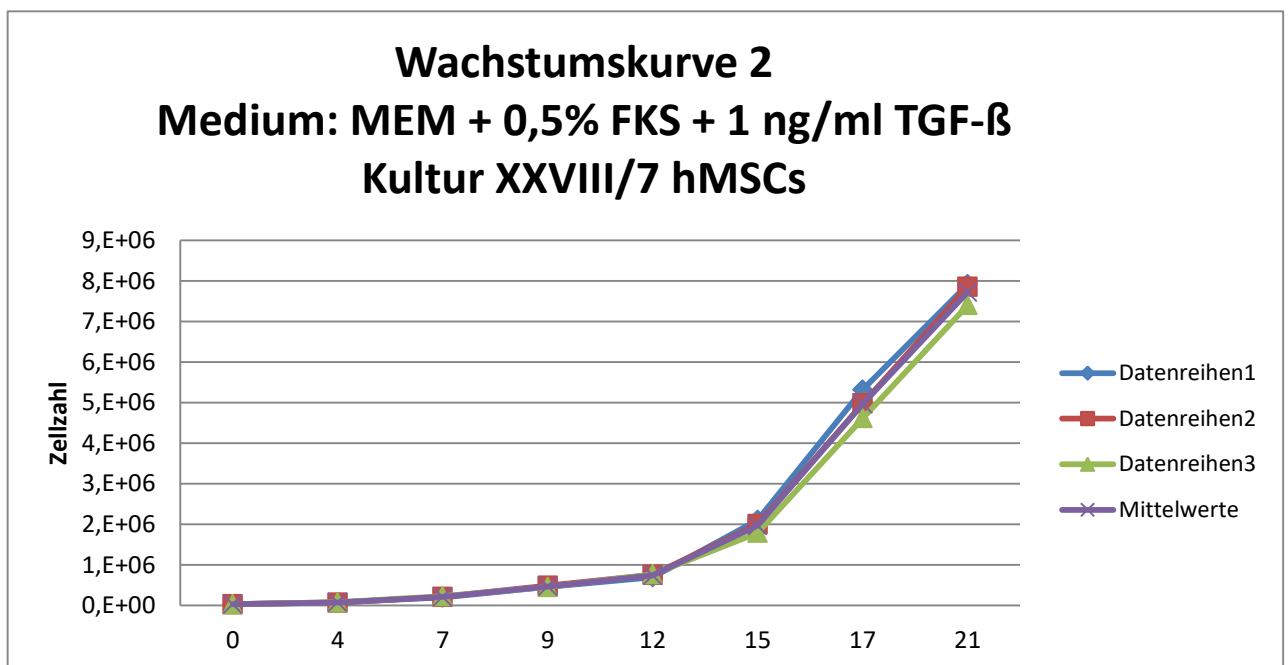


Diagramm-Nr. 6: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 20% FKS + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

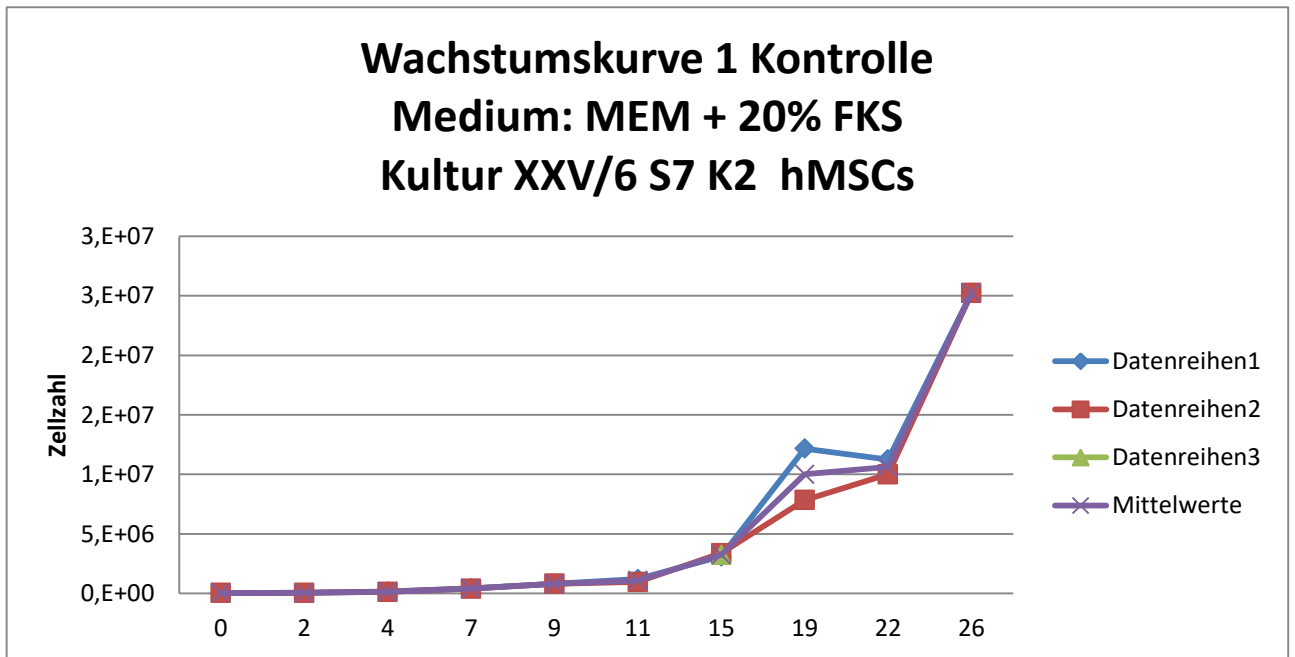


Diagramm-Nr. 7: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

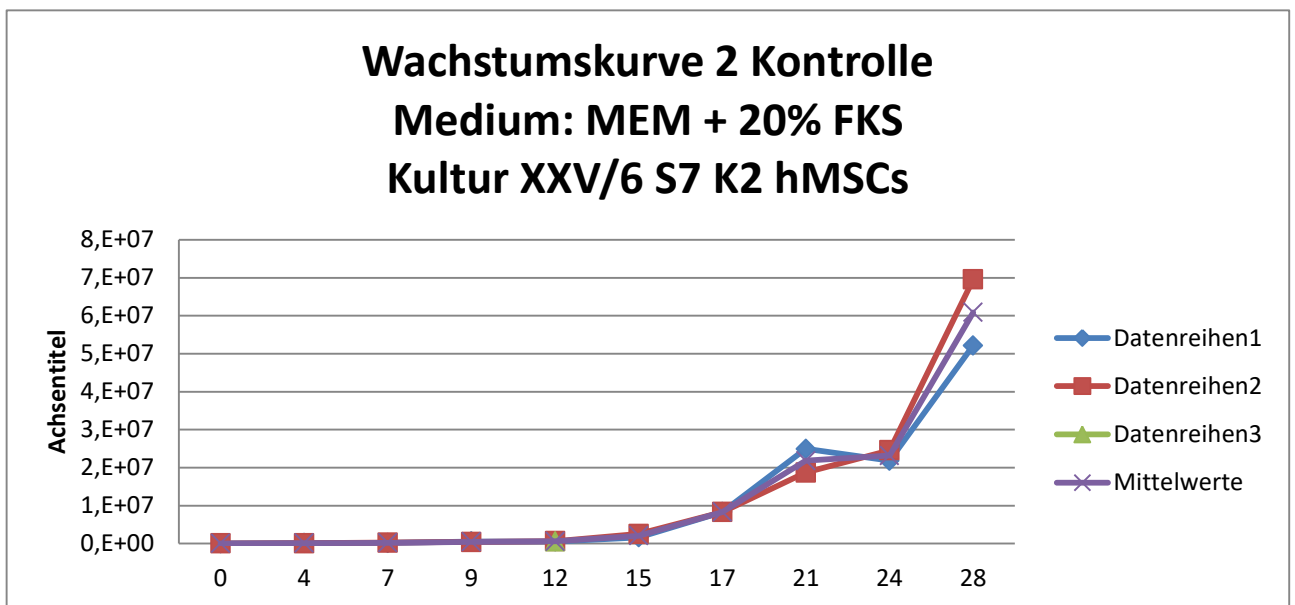


Diagramm-Nr. 8: x-Achse: [d] = Tage, Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Werte Tabelle Wachstumskurven 21 Tage							
				mittlere Werte		Vergleich zur Kontrolle	
MEM + 0,5% FKS	331.576	329.238	330.407			1,96%	
MEM + 0,5% FKS + Shh	16.819.933	9.948.790	13.384.362			79,18%	
MEM + 0,5% FKS + TGF-β	7.937.791	7.723.395	7.830.593			46,32%	
MEM + 20% FKS	10.621.052	23.186.370	16.903.711			100%	

Tabelle 2: Die mittleren Werte aus den Wachstumskurven und das prozentuale Wachstum gemessen an der Kontrollkultur mit Zusatz von 20% FKS.

3.5 Wachstums-Assays mit TGF-β und Sonic Hedgehog Protein in 6-Wells für 3 Tage

Zusätzlich zu den 21 Tage Wachstumskulturen wurden 72 Stunden-Kulturen angelegt. Hier sollte ein möglicher zusätzlicher, kurzfristiger Effekt dargestellt werden.

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

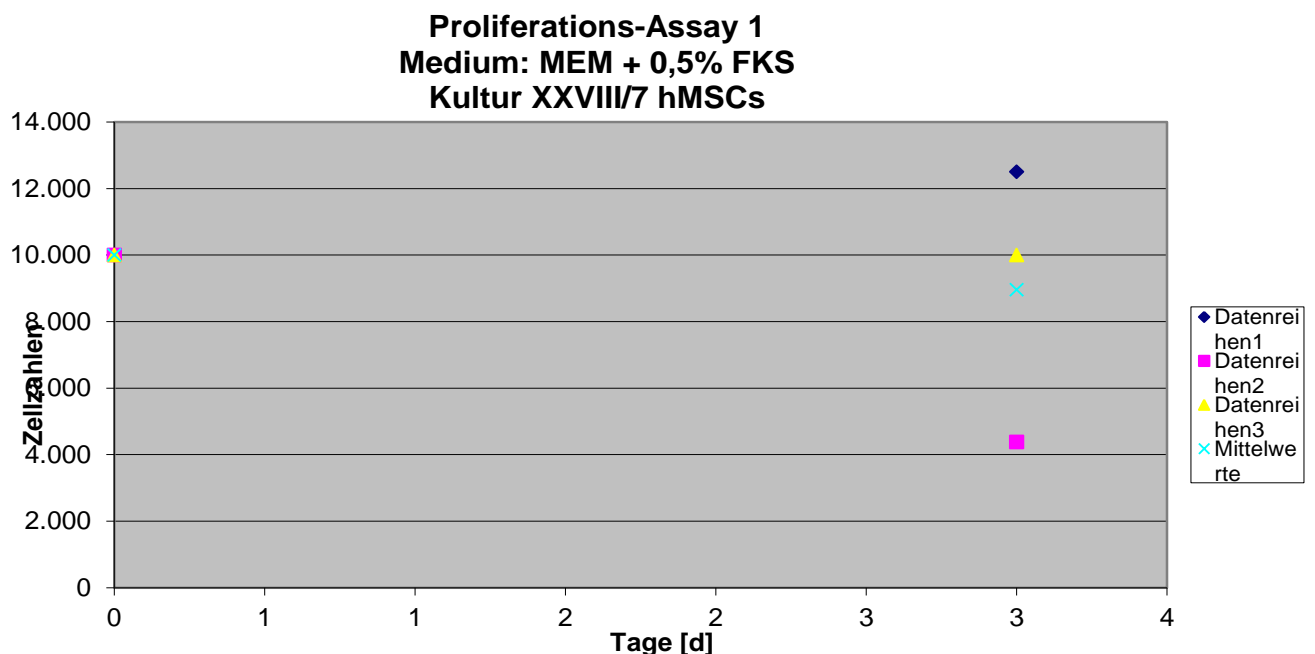


Diagramm Nr. 9: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

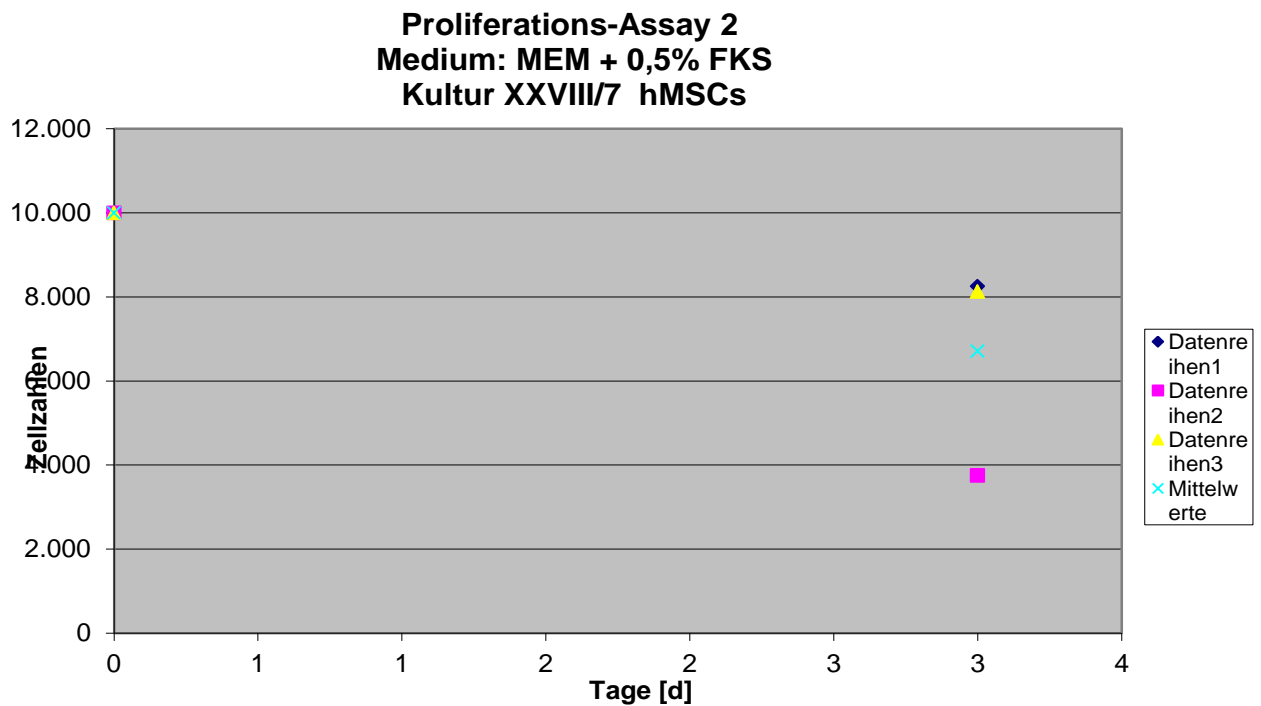


Diagramm Nr. 10: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

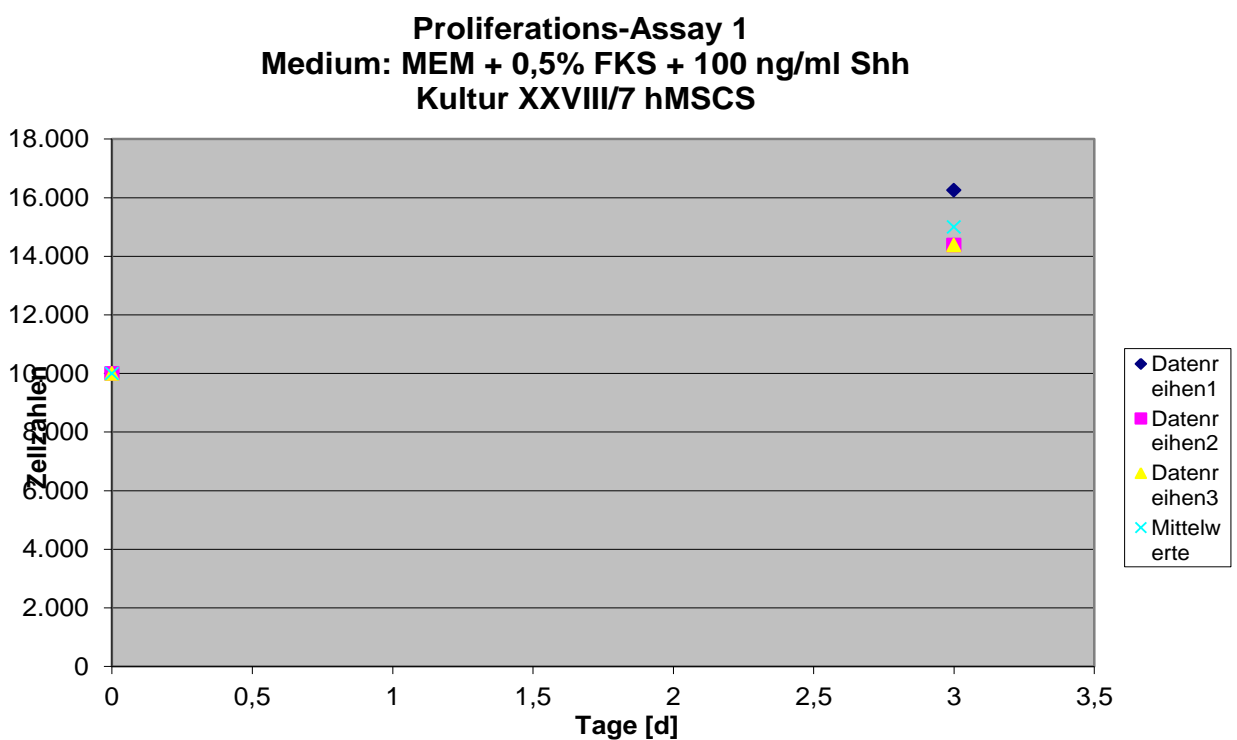


Diagramm Nr. 11: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

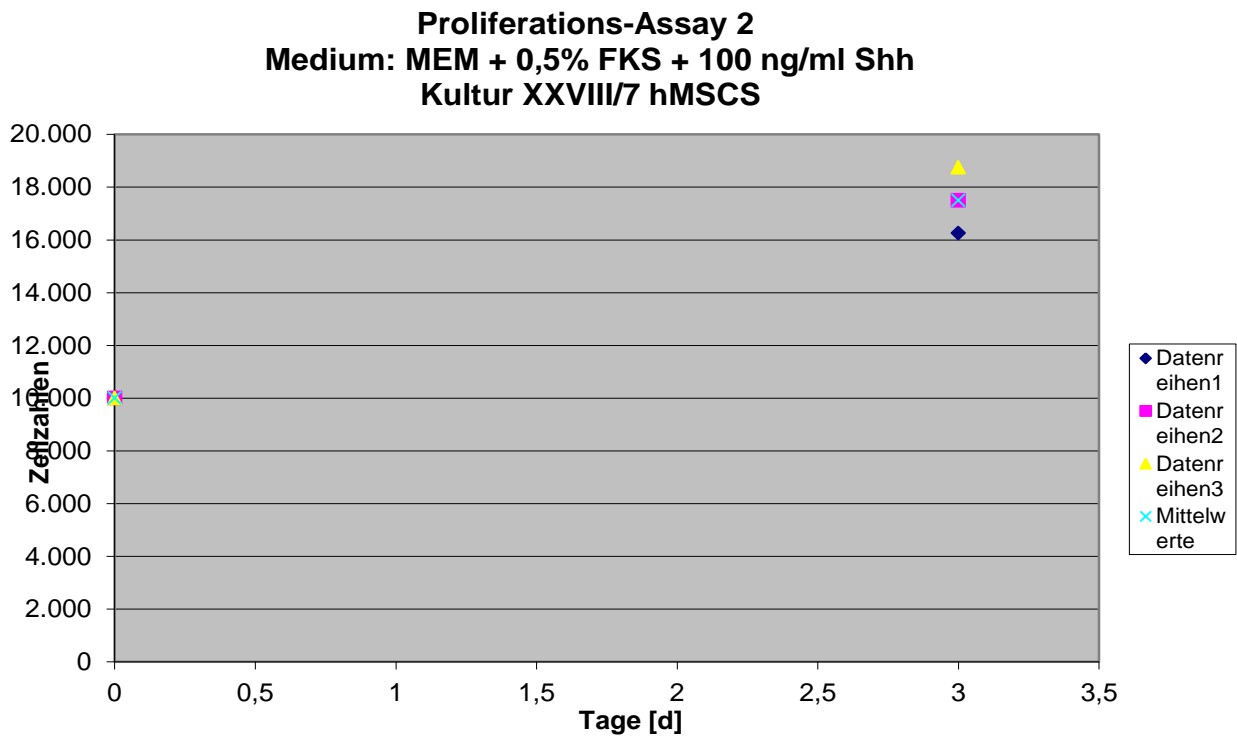


Diagramm Nr. 12: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF- β 1 + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

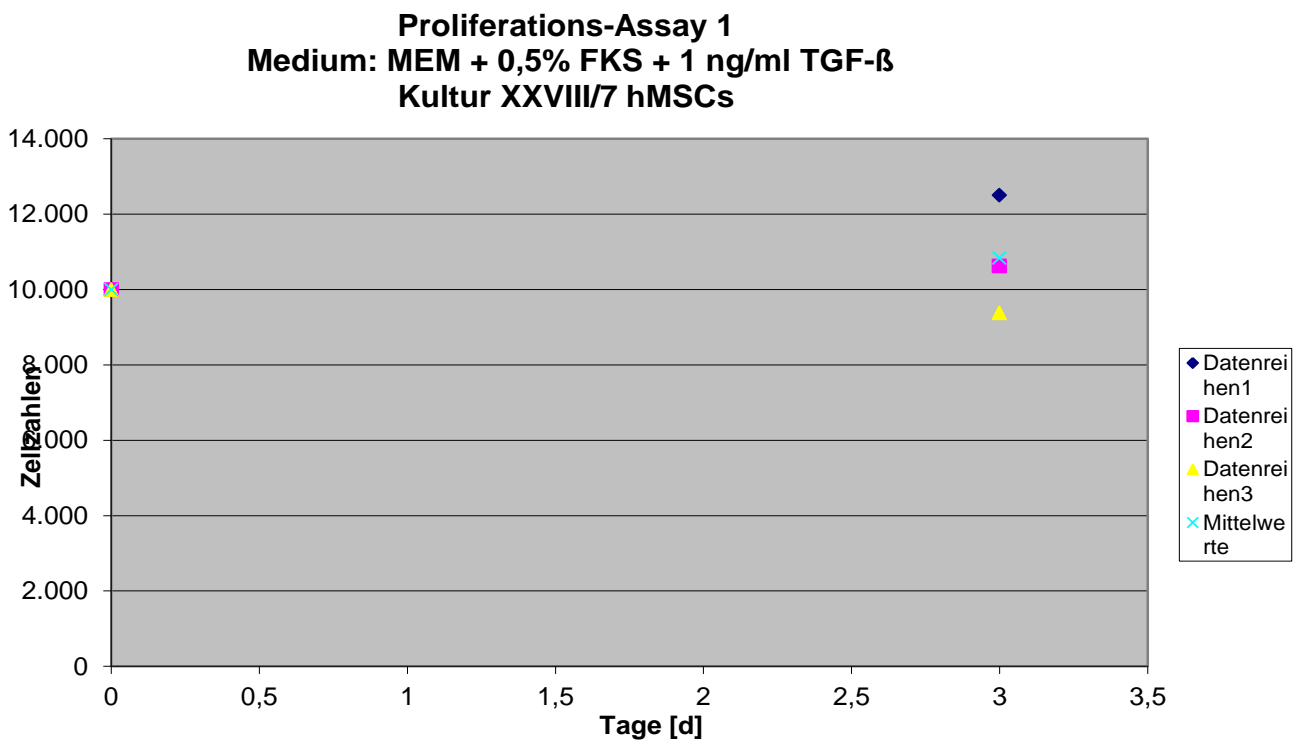


Diagramm Nr. 13: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

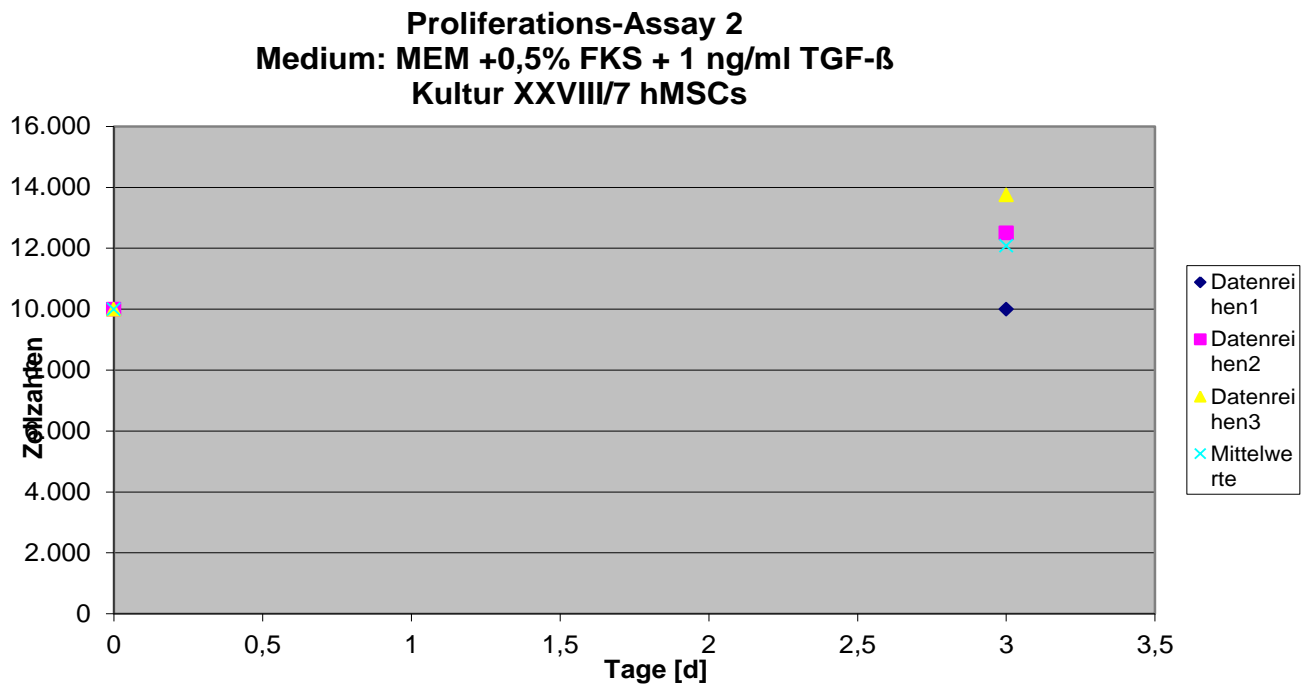


Diagramm Nr. 14: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Wachstumskurve 1+2: hMSCs (MEM + 20% FKS + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin)

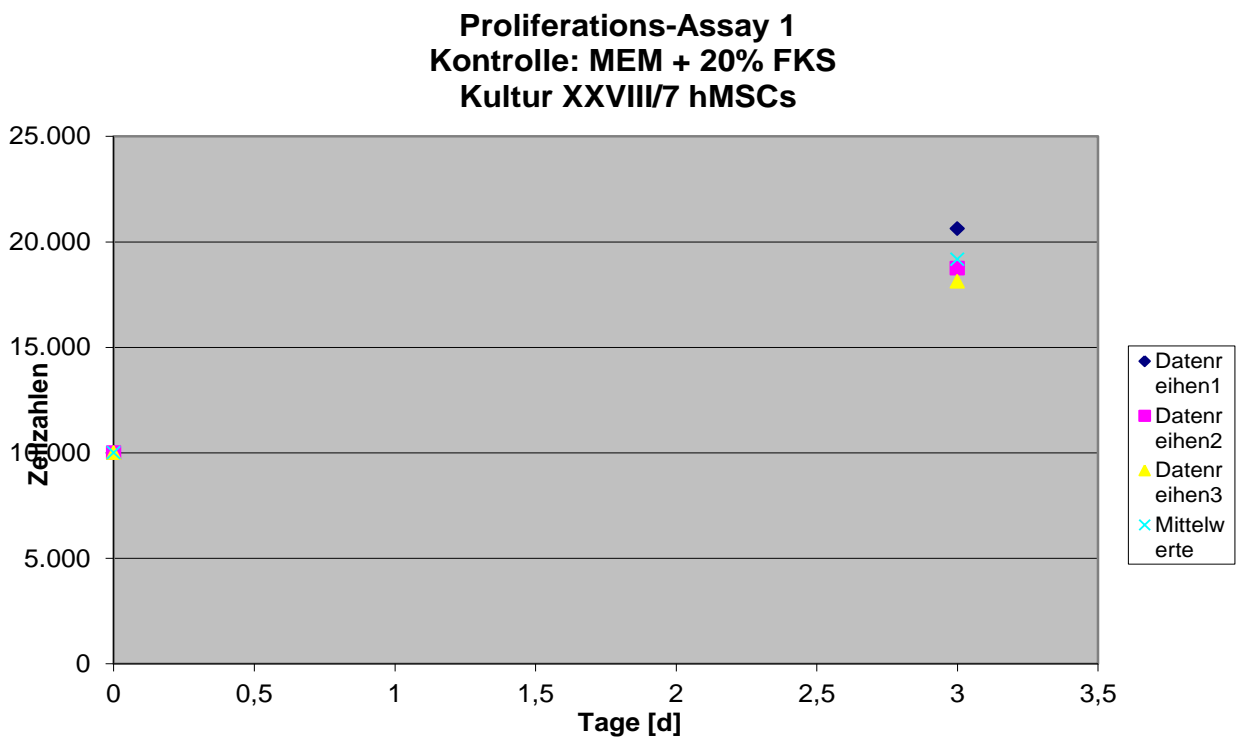


Diagramm Nr. 15: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

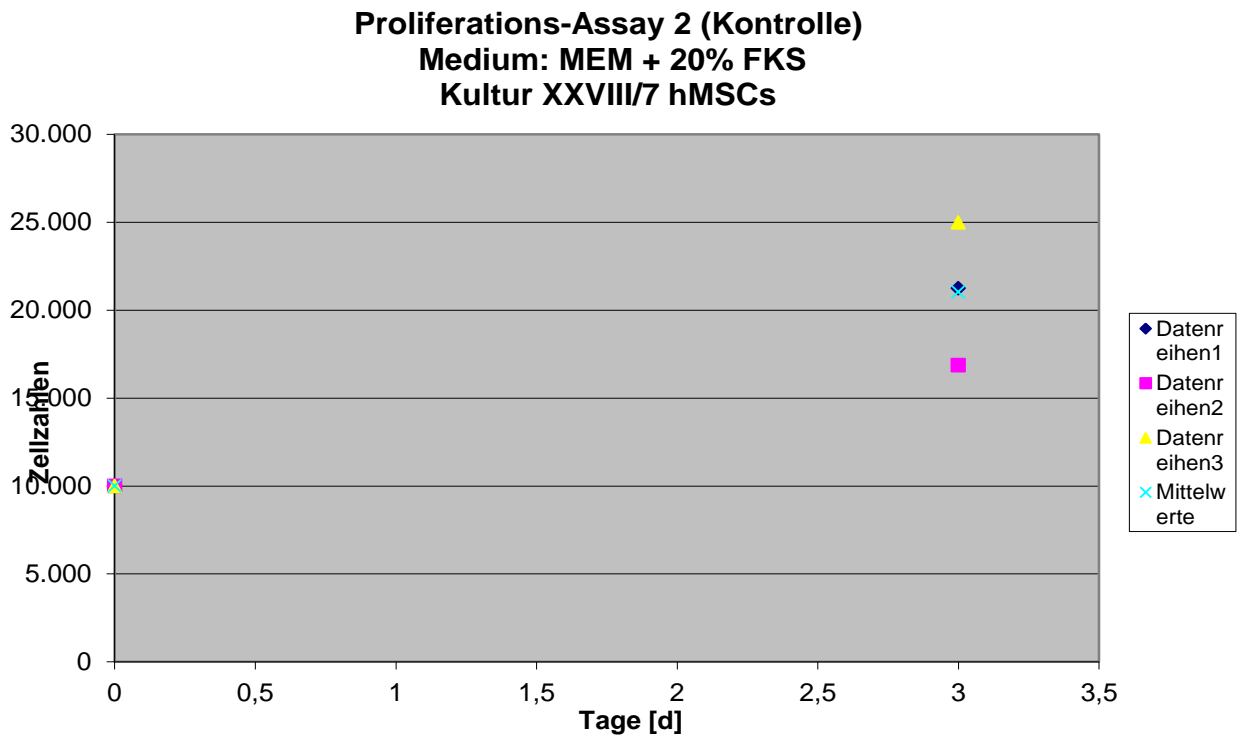


Diagramm Nr. 16: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

Proliferations-Assays: Mittelwerte

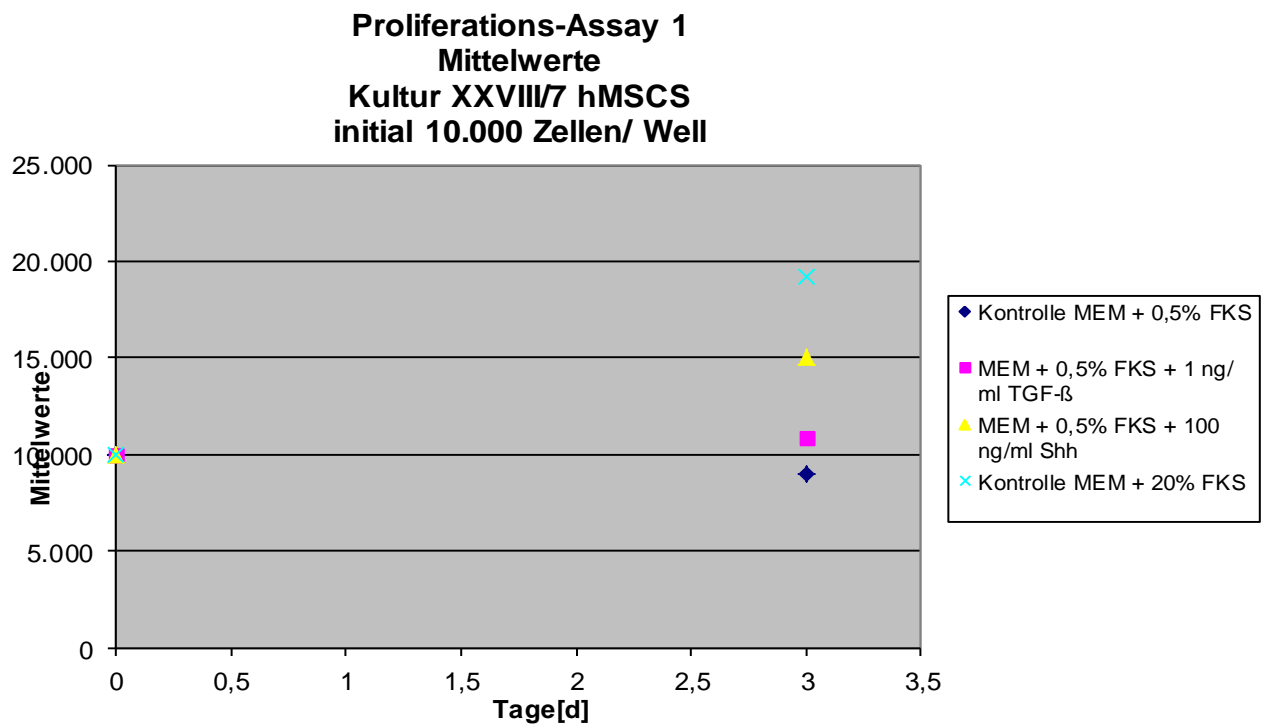


Diagramm Nr. 17: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

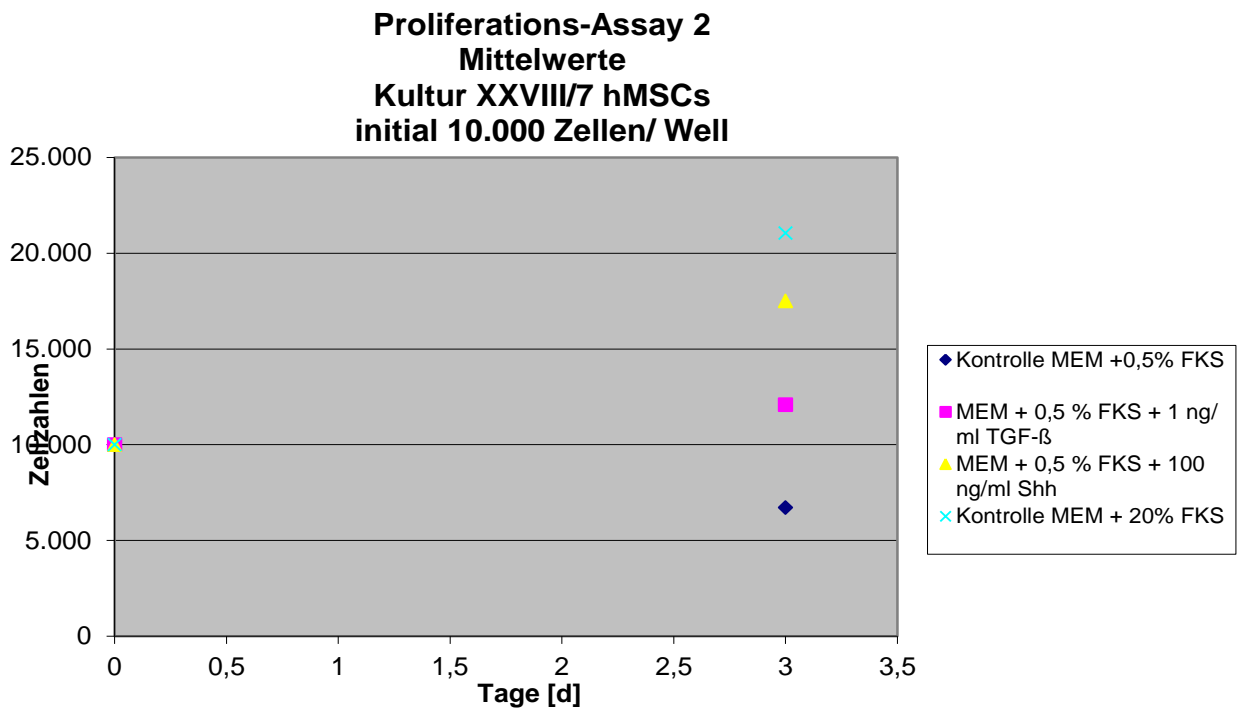


Diagramm Nr. 18: Datensätze: siehe Kapitel 6.2

3.6 Wachstumsnachweis und Färbung mit 5-Bromo-2`-deoxyuridin (BrdU)

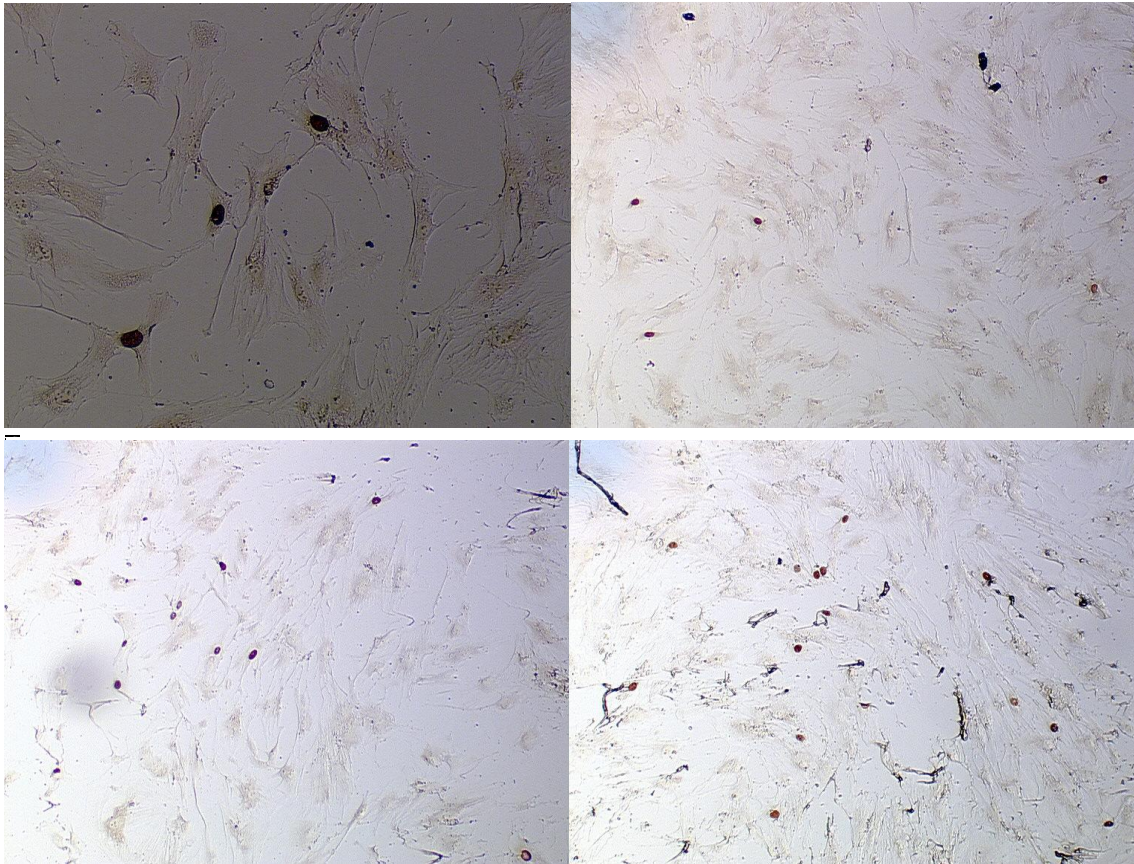


Abbildung 12-15: Färbung mit BrdU, Gesichtfelder aus den unterschiedlich kultivierten Zellen. Zu erkennen sind die rot-braun gefärbten Zellkerne der teilungsaktiven Zellen, die sich um Zeitpunkt der Färbung geteilt haben.

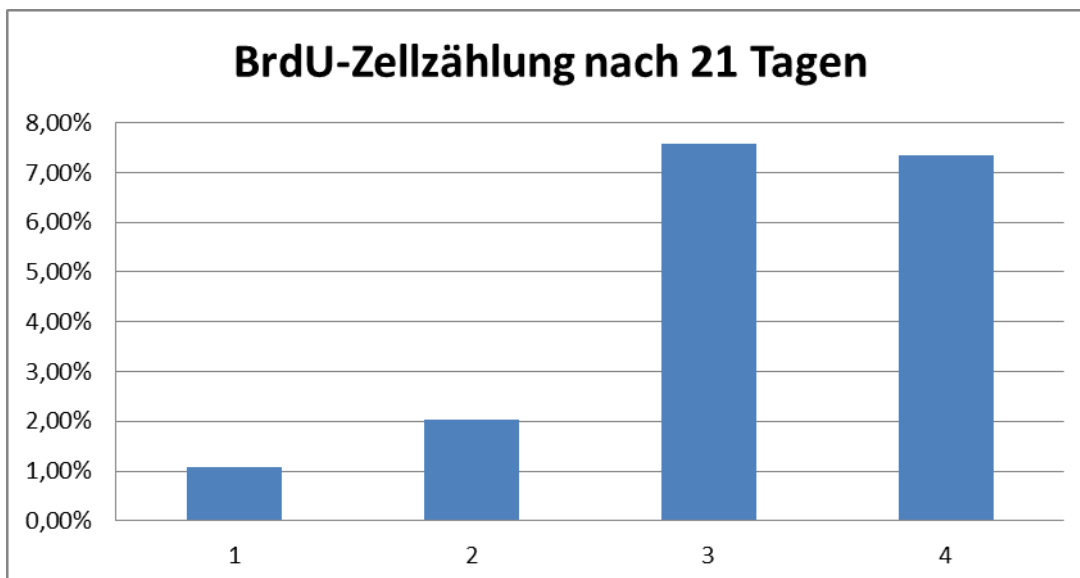


Tabelle 3: 1: x-Achse: 1: MEM + 0,5% FKS; 2: MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF- β 1;
3: MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh; 4: MEM + 20% FKS.



Abbildung 16: Native humane mesenchymale Stammzellen, 40fache Vergrößerung

Färbungen zum Nachweis chondrogenen Wachstums

3.7 Färbungen mit Alzian-Blau

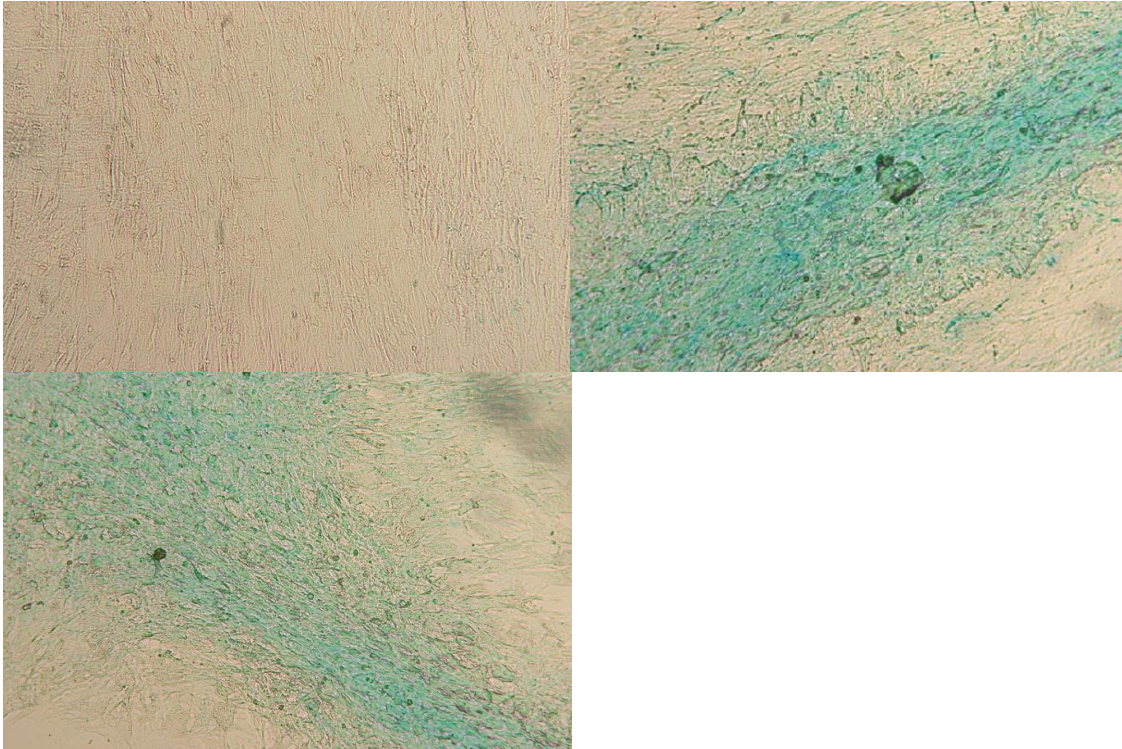
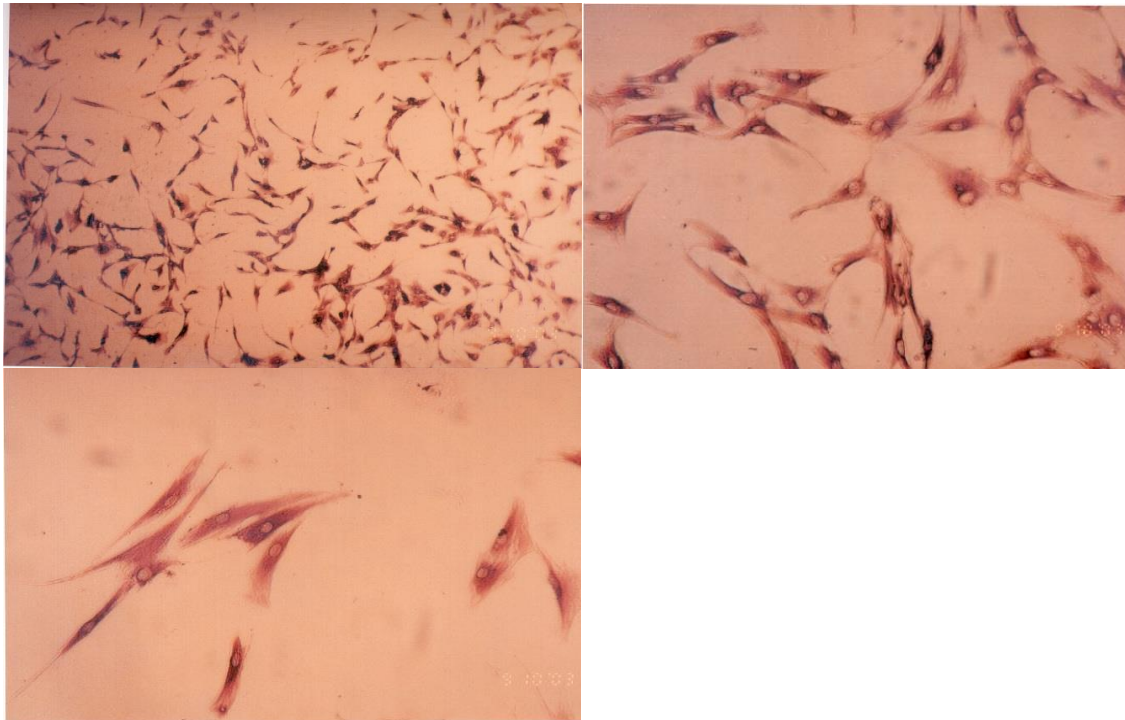


Abbildung 17-20: Mesenchymale Stammzellkulturen nach 3 Wochen: Abb. 19: MEM+ 20% FKS; Abb. 20: MEM + 20% FKS + 100 ng/ml SHH; Abb. 21: MEM + 20% FKS + 1 ng/ml TGF-β;

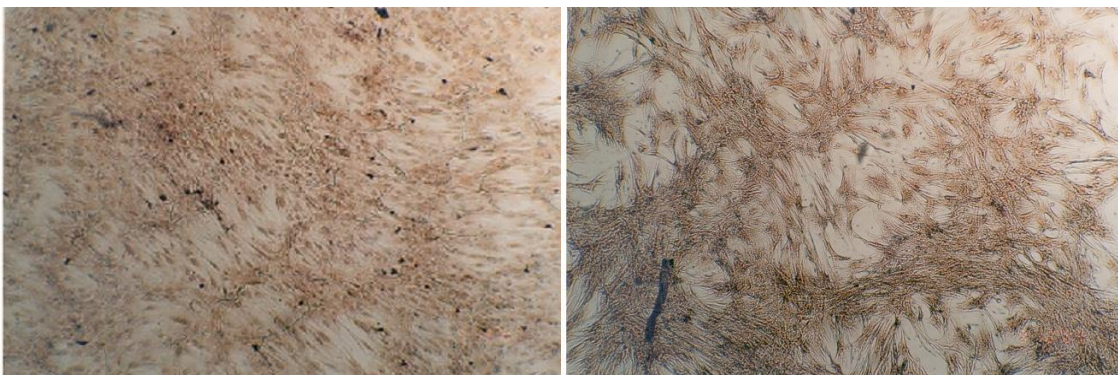
3.8 Färbungen mit Anti-Aggrecan

Chondrogen differenzierte mesenchymale Stammzellen mit MEM + 0,5% FKS



Abbildungen 21-23: Lichtmikroskopische Darstellung von cytosolisch Aggrecan-bindenden mesenchymalen Zellen. Vergrößerung in 40x, 100x und 200x.

Chondrogen differenzierte mesenchymale Stammzellen mit MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF- β 1



Abbildungen 24-25: Lichtmikroskopische Darstellung von cytosolisch Aggrecan-bindenden mesenchymalen Zellen. Vergrößerung in 40x, 100x.

Chondrogen differenzierte mesenchymale Stammzellen mit MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml

Shh

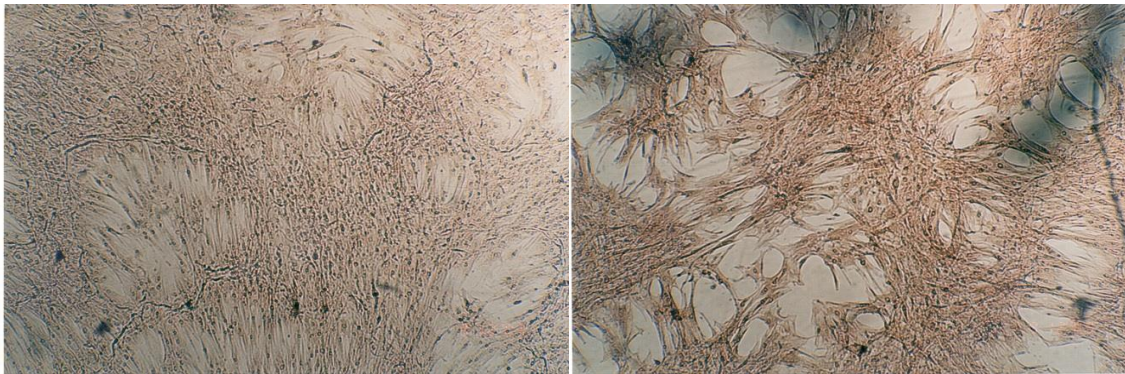


Abbildung 26-27: Lichtmikroskopische Darstellung von cytosolisch Aggrecan-bindenden mesenchymalen Zellen. Vergrößerung in 40x, 100x.

Chondrogen differenzierte mesenchymale Stammzellen mit MEM + 20% FKS

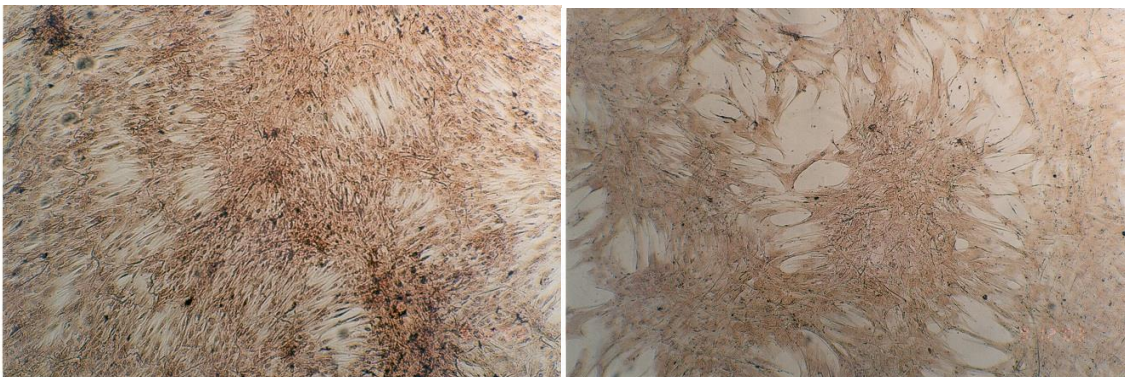


Abbildung 28-29: Lichtmikroskopische Darstellung von cytosolisch Aggrecan-bindenden mesenchymalen Zellen. Vergrößerung in 40x, 100x.

3.9 Qualifizierung des chondrogenen Wachstums mit RT-PCR

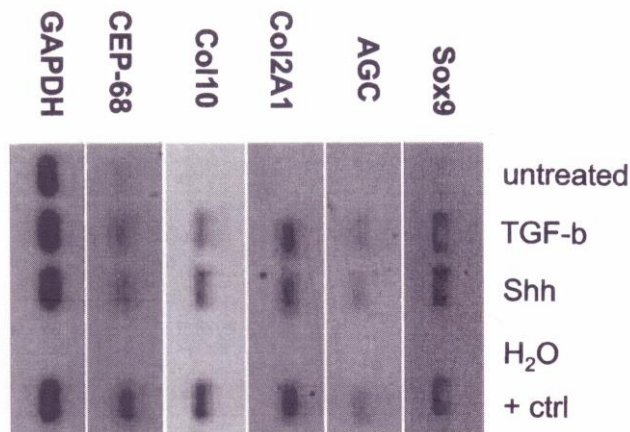


Abbildung 30: RT-PCR nach 3 Wochen Inkubation

Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte enzymatische Aktivität hinsichtlich chondrogener Entwicklung hin. Dies gilt sowohl für TGF- β als auch für Shh. Eine weitere Abgrenzung, ob entweder TGF- β oder SHH eine bessere chondrogene Differenzierung ermöglichen oder nicht, ist objektiv nicht vorzunehmen.

3.10 Mikropellet-Kulturen:

Warzecha et al konnten ein dreidimensionales Sphäroid aus einer zweidimensionalen Zellkultur entwickeln, welches zusätzlich histopathologisch- und immunmorphologische chondrogene Eigenschaften besaß.

Ziel der Anlage der Mikropellet-Kulturen war nicht der Transfer von einer zwei- zu einer dreidimensionalen Kultur, sondern zunächst der erneute Versuch den Nachweis von chondrogener Differenzierung in dreidimensionalen Zellverbänden zu zeigen. Hier wurden nach Zellviabilitätstestung aufwendige Kulturen angelegt und ein Labelling mit Aggrecan als Marker für chondrogene Differenzierung genutzt. Bei den verschiedenen genutzten humanen mesenchymalem Stammzellen handelte es sich durchweg um Zellen mit gutem bis sehr gutem Zellwachstum.

In den durchgeführten Versuchen wurden Zellen mit Kontrollmedium, TGF- β 1 und Sonic Hedgehog Protein bebrütet. Das Zeitintervall der Bebrütung war zwischen 14-21 Tage.

Eine klinisch morphologische Untersuchung auf die Konsistenz der 3-dimensionalen Sphäroide brachte weder für die Kontrollgruppe noch für die mit den Proteinen behandelten Zellen ein einheitliches Bild. Die Konsistenz konnte von weich, bröckelig bis elastisch sein

ohne sichere Zuordnung zu einer der 3 Vergleichsgruppen (siehe hierzu auch Anhang Tabellen 5-7 Mikropellet Kulturen s. 116-118). Mit den durchgeführten Versuchsaufbauten und -reihen konnte eine weitere Untermauerung der durch Warzecha et al gefundenen Ergebnisse nicht erbracht werden.

Auch die immunhistochemische Testung mit Aggrecan erbrachte den sicheren Nachweis auf eine chondrogene Differenzierung nicht. Aggrecan hätte hier nach dem Labelling zu einer hell- oder dunkelbraunen Färbung der Sphäroide führen sollen (siehe Ergebnisse Aggrecan-Färbung im Anhang). Dies konnte nicht sicher nachgewiesen werden.

Auch histologische Probeschnitte, welche im Pathologischen Institut der Universität Frankfurt am Main (Prof. Hansmann) durchgeführt wurden, konnten bei schlechter Konsistenz und daraus folgend schlechter Präparation keinen weiteren Beweis für chondrogene Differenzierung erbringen. Aufgrund der gegebenen Tatsachen wurde auf die weitere Präparation durch das Pathologische Institut verzichtet und keine weiteren Versuchsreihen mit dem genannten Versuchsaufbau durchgeführt.

Kapitel 4:

Diskussion

4. Diskussion

Mit der vorgelegten Arbeit sind wir nach unserem Wissen die ersten, die einen nachvollziehbaren Zusammenhang bezüglich der Rolle von Sonic Hedgehog Protein auf das Wachstum und der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen erbringen konnten. (Originalartikel: Sonic Hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro, Warzecha et al, J. Orthop Sci 2006,11: pp. 491-496)

Grundlage für die hier vorgelegte Arbeit waren Vorversuche der Arbeitsgruppe um Professor (Datenschutz), die zumindest einmal den Nachweis von 3-dimensionalen, histologisch gesichteten, chondroiden, kugeligen Formationen im Rahmen von Inkubation mit Sonic Hedgehog Protein in 6-Wells ergeben hatten. (Postertitel: "Three dimensional cartilage formation in mesenchymal stem cells under the influence of SHH-protein"; Warzecha, Brüning, Zambon-Bertoja, Lucarelli, Kurth)

Zunächst wurde versucht, die Ergebnisse der Versuchsreihe zu wiederholen und erneut 3-dimensionales Wachstum mit Hilfe von Sonic Hedgehog Protein zu erzielen. Trotz wiederholten Versuchen konnte das einmal erzielte Ergebnis nicht wiederholt werden. Die tatsächliche Erklärung konnte bis heute nicht gefunden werden. Vermutet wird eine Mutation im Erbgut der in den damaligen Versuchen genutzten Zellen, die nicht aufgedeckt wurde.

Im Rahmen der Versuche wurden verschiedentliche Wachstums- und Differenzierungsversuche sowie -methoden durchgeführt.

Die erzielten Ergebnisse sind die Grundlage für die vorgelegte Arbeit.

Die Basis der Versuche bildet die Entnahme eines Blut-/Zellgemisches bei der Eröffnung von proximalen Femurschäften bei Patienten mit ausnahmslos vorbestehender manifester, operabler Coxarthrose im Alter zwischen 30 und 81 Jahren. Insgesamt wurde bei 28 Patienten das schriftliche Einverständnis nach Aufklärung eingeholt sowie die Proben entnommen. Eingeschlossen in die Versuchsreihen wurden allerdings nur 23 Patienten (davon 13 Männer, 10 Frauen).

Gründe für die Reduktion der Personenzahl waren die Einarbeitungszeit und die Proliferationsfähigkeit der Zellen; zusätzlich zeigten nicht alle Probanden-Zellen die gewünschten Wachstumsraten und Zelleigenschaften im Nachweis durch die PCR. (Patientendaten unter Kapitel 7: Anhang).

Mesenchymale Stammzellen sind schon seit geraumer Zeit im Fokus multidisziplinärer Forschung.

Beispiele hierfür sind die renale Regeneration durch Faktoren wie HGF, VEGF oder IGF-1¹²² oder EGF als Faktor in der osteogenen Differenzierung in Bezug auf MSCs.¹²³ Auch die Rolle des als Kontrollsubstrat genutzten TGF- β auf Wachstum und Differenzierung wurde bereits ausgiebig beforscht.¹²⁴

PDGF konnte in Bezug auf MSCs mit Gefäßneubildung assoziiert werden.¹²⁵ PTH und IGF zeigen Osteoblastenbildung im Zusammenhang mit MSCs.¹²⁶ Eine interessante Gruppe von Proteinen sind die BMPs, welche sich sowohl in der chondrogenen, aber auch osteogenen Differenzierung in Bezug auf MSCs als wirksam erwiesen haben. Als hochpotenter Zelltyp eignen sich somit MSCs sehr gut für die in der Arbeit vorgelegten Versuchsreihen.

4.1 Ergebnis-Interpretation

Zunächst ist zu bemerken, daß sowohl eine Wachstumssteigerung sowie Differenzierung in Richtung chondrogenes Gewebe bei den untersuchten mesenchymalen Stammzellen unter Einfluss von rekombinantem Sonic Hedgehog Protein als auch Transforming growth factor Beta nachgewiesen werden konnte.

4.1.1 Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung 1: Führt Sonic Hedgehog Protein zu Wachstum von aus menschlichen Femurschäften gewonnenen HMSCs in einer invitro-Kultur?

Es wurden Wachstumskulturen mit humanen mesenchymalen Stammzellen und in unterschiedlichen Wachstumszeiträumen angelegt, welche im Ergebnisteil dargestellt sind. Zunächst wurden die 21 Tage-Wachstumskulturen, danach die 3 Tage-Wachstumskulturen aufgelistet. In den Kurven werden immer die Wachstumstage (Abszisse, x-Achse) gegen die Zellzahl (Ordinate, y-Achse) aufgetragen.

Die Ergebnisse der Wachstumsdiagramme 1 + 2 zeigten ein mäßiges lineares Wachstum der Zellen unter Einfluss des Grundmediums und einer minimalen Anzahl an Wachstumszusätzen. Die Zellenzahl wuchs also um etwas mehr als den Faktor 10 von 30.000 auf 350.000 Zellen.

Die Wachstumskurven 3+4, die mit dem Sonic Hedgehog Protein substituiert wurden, zeigten im Vergleich zu den ersten beiden Kulturen einen deutlich sprunghafteren Anstieg der Zellzahlen ab dem etwa 14. Bebrütungstag. Hier zeigt sich ein exponentielles Wachstum der Zellen bzw. Wachstumskurven. Die Wachstumskurve der Mittelwertauftragung zeigt ein Wachstum mit dem Faktor 578,8.

Auch bei den Wachstumskurven 5 + 6 mit Substitution des zweiten Proteins, Transforming Growth Factor Beta 1, ist ein sprunghaftes, exponentielles Wachstum zu erkennen. Im Vergleich zu den Wachstumskulturen mit dem Grundmedium zeigte sich ein deutlich erhöhtes Wachstum. Es zeigte sich ein Zellwachstum der Mittelwertkurve mit dem Faktor 367,5. Im Vergleich der beiden Proteine Sonic Hedgehog und Transforming Growth Faktor $\beta 1$ ließ sich nach 21 Tagen ein erhöhtes Wachstum der humanen mesenchymalen Stammzellen bei Sonic Hedgehog ausmachen.

Die Wachstumskurven mit 20% fötalen Kälberserum und ohne Proteinen-Zugaben zeigten beide sehr gutes, exponentielles Wachstum. Man konnte sie, wie vorgesehen, als Kontroll-Kurven verstehen. In den Wachstumskurven mit 20% Kälberserum lagen nahezu alle Nährstoffe in hochkonzentrierter Form vor, die die Zellen zu hervorragendem Wachstum benötigten. Das Wachstum der Zellen mit 20% FKS war gegenüber den Wachstumskulturen mit Proteinen deutlich erkennbar erhöht. Insgesamt erhöhte sich die Zellzahl zum Ausgangswert von 30.000 Zellen etwa um den Faktor 1434,6.

Die durchgeführten Proliferations-Assays, welche lediglich über 3 Tage Wachstumszeit verliefen, sollten über kurzfristige Besonderheiten Aufschluss geben.

In den beiden ersten Kontroll-Kurven mit nur einem Minimum an Serum-Zusatz zeigten sich eher rückläufige Wachstumswahlen. Die Medienzusammensetzung war auf das Notwendigste für das Zellüberleben begrenzt. Der Ausgangswert von 10.000 Zellen fiel um 21,7%.

Mit dem Wachstumsprotein Shh konnte innerhalb von 3 Tagen ein Anstieg des Zellwachstums von 62,5% erreicht werden. Dies entsprach in etwa auch der Wachstumsrate der 21 Tage-Wachstumskulturen.

Mit dem Wachstumsprotein TGF- $\beta 1$ konnte innerhalb von 3 Tagen ein Anstieg des Zellwachstums von 14,6% erzielt werden. Im Vergleich zu Shh war dies ein deutlich geringerer Anstieg und eine Differenz von 47,9%.

Die besten Proliferationsraten sowohl in den 3 Tage- wie auch in den 21 Tage-Wachstumskulturen zeigten die Kulturen mit dem 20%igen Zusatz an fötalem Kälberserum.

Im Mittel war die Zellzahl in den 3 Tagen um etwas mehr als 100% angestiegen. Die beiden letzten Diagramme mit den Mittelwerten veranschaulichen das unterschiedliche Wachstumsausmaß sehr gut. In der Reihenfolge von weniger bis mehr Wachstum zeigen sich die Zellen nur mit Grundmedium, dann mit Zusatz von TGF- β 1, des Weiteren Shh und am besten mit 20% fötalem Kälberserum.

Um eine weitere Quantifizierung der Proliferationsrate zu erzielen, wurden Versuche mit dem sich in den Zellkern-integrierenden und unter DAB-Markierung braun färbenden BrdU durchgeführt. BrdU wird als DNA-Bau-Einheit in den Kern von teilungsaktiven Zellen integriert. Die spätere Antigen-Antikörper Reaktion mit DAB führt zur Anfärbung und Darstellung der Zellen. In den Auszählungen wurden je 5 Gesichtsfelder von insgesamt 3 mesenchymalen Zelllinien ausgezählt. Die unter den Ergebnissen aufgeführte Tabelle verdeutlicht die Proliferationsrate in % nach 21 Tagen.

Hier konnten wir durch eine BrdU Inkorporation zeigen, dass das Wachstum von mesenchymalen Stammzellen unter Einfluss von Sonic Hedgehog gegenüber Transforming Growth Factor Beta 1 erhöht ist, obwohl wir in den 21 Tage Wachstumskurven einen vergleichbaren Anstieg der beiden Substrate dargestellt hatten.

Neben der Vermutung, dass es sich um ein Einzelphänomen handelt, kommen hier noch weitere Erklärungsversuche in Betracht.

Nicht jede Blutprobe hat nachgewiesenermaßen die prozentual gleiche Menge an mesenchymalen Stammzellen in der Blutkultur. Es handelt sich also um Mischzellkulturen. Aufgrund der hohen Teilungsaktivität unter guten Wachstumsbedingungen setzen sich die mesenchymalen Stammzellen verhältnismäßig im Verlauf gegenüber anderen Zellen durch. Abhängig vom Wachstumsfaktor könnte dieser Effekt zusätzlich beschleunigt werden. Wie wir in den 3 Tage Wachstumskulturen nachweisen konnten, hat Sonic Hedgehog Protein auch einen initial schnellen Wachstumsreiz. Dies könnte sich auf ein höheres Wachstum und die folgende BrdU Inkorporation niedergeschlagen haben.

Eine weitere Überlegung zum besseren BrdU-Inkorporation der mit Sonic Hedgehog Protein inkubierten Zellen ist, dass die Teilungsaktivität so hoch bleibt, weil eine Differenzierung der Zellen in Richtung spezifischer Zelltypen nicht so ausgeprägt wie unter Transforming growth Factor β 1 stattfindet. Da die Teilungsaktivität von differenzierten, spezialisierten Zellen vergleichsweise zurückgeht, würde die Wachstumssteigerung im Diagramm und die darstellbare BrdU-Inkorporation in der Folge bei Transforming growth factor β 1 abfallen.

Die Ergebnisse der Versuche zur Proliferation stimmen mit den in der Literatur gefundenen Ergebnissen gerade im Bezug auf Sonic Hedgehog Protein (SHH) in überragender Weise überein. In den vergangenen Jahren hat sich SHH zu einem der gut untersuchten Protein entwickelt, dem in einer Vielzahl von Geweben, sowohl benigner als auch maligner Natur, Wachstumseigenschaften zugesprochen werden konnten.

Dies konnte in Bezug auf mesenchymale Zellen bereits durch viele Autoren nachgewiesen werden. (Lee 2004, Murtaugh 1999, Pittenger MF 2000, Enomoto-Iwamoto 2000, Johnstone B, 1998, Sekiya J, 2002, Bosnakovski 2004, Kellner 2002.)

Lee und Pittenger, beispielsweise, beschreiben die Isolation von nicht-haematopoetischen Zellen und die folgende Differenzierungsfähigkeit der gewonnenen Zellen in verschiedene mesenchymale Zelltypen wie Fett-, Muskel- und chondro- oder osteogene Zellen.

Auch Murtaugh konnte bereits 1999 einen Zusammenhang zwischen Sonic Hedgehog Protein, somitischen, mesenchymalen Zellen und das SHH-Zusammenspiel mit BMP auf diese Vorläuferzellen im Sinne einer On-Off-Induktion zeigen.

Zusätzlich konnten Einflüsse von SHH oder deren Signalwege auf die Proliferation von Prostatagewebe¹²⁷, des Os palatinum¹²⁸, des Pankreas¹²⁹, der Lunge¹³⁰, der Mammæ¹³¹, der Haut¹³², des Blut- und Gefäßsystem^{133, 134} und des Ösophagus bzw. Magen-Darm-Trakt¹³⁵ nachgewiesen werden.

Bei der Aufzählung der unterschiedlichen Gewebetypen zeigt sich die Spanne der Wachstumsbeeinflussung durch Sonic Hedgehog Protein. Hierbei von ubiquitärem Vorkommen zu sprechen, ist sicherlich verfrüht, aber weitere Arbeiten könnten genau dies vor allem im embryogenetischen Bereich bestätigen.

Im Umkehrschluss können Fehlfunktionen von SHH und seinen Signalwegen auch embryonale Fehlentwicklung nach sich ziehen, wie zum Beispiel Ösophagusatresie, tracheoösophageale Fisteln, ein Pankreas anulare, Fehlrotation des mittleren Darmanteils oder Duodenal-oder Anlatresie.¹³⁶

Zunehmend kann auch das Auftreten von malignen Veränderungen in Zusammenhang mit SHH-Signalbeeinflussung gebracht werden. So hat eine Mutation in Patched-Rezeptor des SHH-Signalweges einen Einfluss auf die Entstehung von Medulloblastomen¹³⁷, die Deregulierung von epidermalen Keratinozyten über den SHH-Stoffwechselweg, die Entstehung von Basal-Zell-Karzinomen¹³⁸, eine Up-Regulation der Rezeptoren Patched und

Smoh zeigt sich bei hyperplastischen Polypen, Adenome und Adenokarzinome des Dickdarms¹³⁹, Magens¹⁴⁰, Pankreas Tumore und Pankreatitis¹²⁹, Brust¹⁴¹, Rhabdomyosarkome sowie Osteo- und Chondrosarkome (Poster 2006, Kurth et al.)

4.1.2 Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung 2: Führt Sonic Hedgehog Protein zu chondrogener Differenzierung von aus menschlichen Femurschäften gewonnenen HMSCs in einer invitro-Kultur?

Um diese Fragestellung zu klären, wurden die schon weiter oben ausführlich besprochenen Wachstumskulturen angelegt. Die Dokumentation der wachsenden Zellen wurde zu Beginn des Wachstumsintervalls und am Ende (nach 21 Tagen) mittels Fotografie durchgeführt. Die Zellzahlen in den 6-Wellen lagen zu Beginn zwischen 10.-30.000 Zellen pro Well. Es zeigte sich ein weitestgehend einheitliches, homogenes Bild der ausgesäten Zellen.

Auf die wachsenden Zellen wurden für chondrogene Differenzierung spezifische cytosolische Moleküle (Aggrecan und Alzian-Blau) in Antigen-Antikörper-Reaktion in den Zellen über Antigen-Antikörper-Reaktion gebunden. Die Menge der Aufnahme an Molekülen und somit farbliche Veränderung der Zellen gab ein quantitatives, nur bedingt qualitatives Bild über die vermehrt chondrogenen Eigenschaften der Zellen.

Aus den gefundenen Ergebnisse der Färbungen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, die nur das MEM-Medium und 20% FKS bebrütet wurde, die chondrogene Differenzierung sowohl mit 1 ng/ml TGF- β als auch mit 100 ng/ml SHH verstärkt wurde. Eine klare quantitative Differenzierung zwischen den beiden zusätzlichen Ingredienzen lässt sich mit Alzian-Blau nicht nachvollziehen.

In der Zusammenschau der aufgeführten Abbildungen zur chondrogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Bezug auf die genutzten Ingredienzen mittels Aggrecan-Färbung lässt sich festhalten, dass alle Zellen, ob Kontroll- oder Versuchsgruppe, eine chondrogene Differenzierung zeigen. Auch hier ist eine weitere Quantifizierung (wie beim Alzian-Blau) zwischen den verschiedenen Gruppen nicht möglich.

Zusätzlich zeigen sich auch interessante morphologische Unterschiede der Zellen unter dem verschiedenartigen Einfluss der Substrate TGF- β 1 und SHH im Untersuchungszeitraum. Dies

erscheint bei Inkubation mit zwei verschiedenen Substraten als erwartungsgemäß. Eine weitere histomorphologische Aufarbeitung wurde allerdings nicht im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen.

Chondrogene Differenzierung konnte bereits von obengenannten Autoren wie Pittenger und Lee bei mesenchymalen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. In Bezug auf mesenchymale Zellen und Sonic Hedgehog Protein wurden hier bisher allerdings keine differenzierten Aussagen vorgenommen.

Durch die in der Arbeit vorgelegten Ergebnisse konnten wir zeigen, dass humane mesenchymale Stammzellen unter Einfluss des Sonic Hedgehog-Proteins neben einem deutlichen Zellwachstum zu chondrogener (knorpelartiger) Differenzierung neigen.

Tuli und Tuan konnten bereits in der Vergangenheit Transforming growth factor Beta 1 (TGF β 1) als Schlüsselprotein bei chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen und deren Wachstum einordnen. Hier wird durch die Aktivierung von TGF β 1 die MAP-Kinase- oder p38-Kaskade gestartet, welche wiederum die chondrogen spezifischen Gene Expression einleiten.¹⁴⁴ Worster und Nixon konnten zeigen, dass TGF β 1 und die folgende Gabe von Insulin like Growth-Faktor bei mesenchymalen Pferde-Zellen zu einer deutlichen Expression von chondrogenen Markern, aber auch Proteoglykanen oder Procollagen Typ 2 führte.¹⁴⁵

4.1.3 Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellung 3: Wie ist das Wachstum und die Differenzierung von Sonic Hedgehog Protein im Vergleich zu dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β)?

Eine Differenzierung, ob es entweder Sonic Hedgehog Protein oder Transforming Growth Faktor zu mehr chondrogener Differenzierung führt, konnten wir nicht eindeutig klären. In der Literatur findet sich bis zum heutigen Tag kein weiterer, direkter Vergleich in der chondrogenen Differenzierung der beiden Wachstumsfaktoren.

Sicher ist, beide Wachstumsfaktoren haben bei der eigentlichen Proliferation und ebenfalls chondrogenen Differenzierung wichtige Schlüsselfunktionen, die sich sowohl auf benigne wie

maligne¹⁴⁶ Zellen beziehen. Somit sind die Ergebnisse der Gewebefärbungen mit Alzian-Blau in Bezug auf chondrogene Differenzierung mit den sonst in der Literatur proklamierten übereinstimmend.

Anhand der auf den letzten Seiten gezeigten Abbildungen (Aggrecan, Alzianblau) zeigt sich sowohl bei den mit SHH- als auch mit TGF- β inkubierten mesenchymalen Zellen gutes chondrogenes Wachstum. Anhand der aufgenommenen Fotos ist eine weitere Differenzierung, ob SHH oder TGF- β eine gewichtigere chondrogene Differenzierung zeigt, nicht auszumachen. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Methoden können den Beweis nicht erbringen.

Die initial und abschliessend durchgeführten RT-PCR- Untersuchungen konnten anhand der im Ergebnis-Teil gezeigten Abbildungen bei den mit SHH- als auch mit TGF- β inkubierten mesenchymalen Zellen gutes chondrogenes Wachstum zeigen. Anhand der aufgenommenen Fotos ist eine weitere Differenzierung, ob SHH oder TGF- β eine gewichtigere chondrogene Differenzierung zeigt, nicht auszumachen. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Methoden können den Beweis nicht erbringen.

4.2 Fehleranalyse in der Gewebsgewinnung und Präparation

Gewebe und mesenchymale Stammzellen, welche aus humanen Femurschäften gewonnen wurden, zeigten sich bezüglich ihrer Verarbeitung bereits ab dem ersten Tag eingeschränkt, weil die Proben während operativer Eingriffe entnommen wurden und es trotz Hinweises an die Operierenden zu Verzögerung beim Transfer von Blut in die heparinisierten Röhrchen kommen konnte. Das gewonnene Blut-/Zellgemisch wurde aufgrund von besserer Praktikabilität zuerst in einem metallernen Schälchen (ohne Heparin) aufgefangen und dann häufig erst nach wenigen Minuten in die Röhrchen transferiert (Blutkoagulation). Das koagulierte Blut ließ sich in den folgenden Sedimentationsschritten schlechter aus der Fraktion entfernen.

Weiterhin wurden Blut/Zell-Proben ohne Verarbeitung (Zeit- oder Kommunikationsmangel) mit bis zu 12 Stunden Verzögerung bei Raumtemperatur oder im Brutschrank aufbewahrt, soweit dies praktikabel war. Der Ausschluss der Einzelprobe wurde vorgenommen, wenn die

Präparationsschritte bis zur fertigen Zellkultur einen definitiven Mangel erkennen ließen und dieser nicht mehr korrigierbar war.

4.3 Mikropelett-Kulturen und 3-D Wachstum

In den durch uns durchgeführten Mikro-Pellet Kulturen und dem Versuch, Wachstum und chondrogene Differenzierung unter SHH und TGF- β 1 auch bei 3D Kulturen nachzuweisen, müssen im Rahmen dieser Versuchsreihen als komplett gescheitert angesehen werden, und das obwohl es in der Literatur bereits eine Vielzahl an gut beschriebenen, scheinbar sicheren Methodiken diesbezüglich gibt.¹⁵¹ Hier sind in der Zukunft weitere Versuchsreihen notwendig, um weiteren Einblick in die chondrogenen und proliferativen Eigenschaften der beiden Substrate zu gewinnen.

Kapitel 5:

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Stammzellen (sowohl embryonale als auch adulte) sind schon seit längerem stark in den Fokus der wissenschaftlichen Bemühungen gerückt, da man nachweisen konnte, dass sie höchst potent für Wachstum und Differenzierung im menschlichen Organismus sind. Mittlerweile sind die Möglichkeiten in Forschung und Wissenschaft fortgeschritten und auch therapeutische Anwendungen und Ansätze haben sich ergeben.

Auch adulte mesenchymale Stammzellen erfreuen sich intensiver Beforschung und so ist die vorgelegte Arbeit ein kleiner Baustein, um das tatsächliche Ausmaß der Möglichkeiten mit diesen potenten Zellen zu erkennen.

Einen noch weniger beforschten, „neuen“ Signalweg stellt die Hedgehog-Kaskade dar. Ihr Hauptbotenstoff und Initiator ist das Sonic Hedgehog Protein. Mit der Kaskade verbinden sich Wachstum und Proliferation; sowohl benignes als auch malignes.

In der vorgelegten Arbeit konnten wir den Nachweis erbringen, dass adulte mesenchymale Stammzellen in Kultur über 3 Wochen unter Einfluss von Shh-Protein sowohl eine Proliferationssteigerung gegenüber einem etablierten Wachstumsfaktor wie dem Transformierenden Wachstumsfaktor Beta (TGF- β 1) als auch chondrogene Differenzierung zeigen.

Dargestellt und durchgeführt wurde dies mit Proliferations-Tests von 3 Tagen und 3 Wochen und Übertragung in Wachstumskurven sowie Viabilitätstestung mit Trypanblau und der Inkorporation von DNS-Bestandteilen (BrdU) in sich teilende Zellen.

Die Darstellung von knorpeliger Differenzierung der Zellen wurde mit Aggrecan- und AlcianBlau-Färbung vorgenommen. Unterstützt wurden die Ergebnisse durch RT-PCR vor und nach der Bebrütungszeit und die damit verbundene veränderte Genexpression.

Englische Zusammenfassung:

Background: Sonic Hedgehog (Shh) protein is known to be an important signaling protein in early embryogenic development. Also, Shh is involved in the induction of early cartilaginous differentiation of mesenchymal cells in the limb and in the spine.

Methods: The impact of Shh on adult stem cells, human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs), was tested. The MSCs were treated either with recombinant Sonic hedgehog protein (r-Shh) or with transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) as a positive control in vitro for 3 weeks. The effects on cartilaginous differentiation and proliferation were assayed.

Results: MSCs when treated with either Shh or TGF- β 1 showed expression of cartilage markers aggrecan, SOX9, CEP-68, and collagen type II und X within 3 weeks. Only r-Shh-treated cells showed a very strong cell proliferation and much higher BrdU incorporation in cell assay systems.

Conclusion: These are the first data that indicate an important role of Shh for induction of cartilage production by MSCs in vitro.

Kapitel 6:

Quellen-

Verzeichnis

6. Quellenverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

1. Wessinghage, D. [Themistocles Gluck, 100 years artificial joint replacement] Z. Orth. Ihre Grenzgeb. 1991, 129(5), pp. 383-388. .
2. Murphy JB, Arthroplasty for intraarticular bony and fibrous ankylosis of the temporomandibular articulation, J Am Med. Assoc. 1914: 62:1783
3. Putti, V.: Arthroplasty of the knee joint. J. Bone Joint Surg. 1920, 2: p.530.
4. Schiebler, Schmidt, Zilles 7. Auflage Lehrbuch für Anatomie, Springer 1997, pp. 62-65.
5. Lippert, Anatomie, 4. Auflage Lehrbuch für Anatomie, Urban&Schwarzenberg 1996, pp. 36-39
6. Bucher, Wartenberg; Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie, 11. Auflage, Hans Huber Verlag 1989. pp. 175-183.
7. Niethard, Pfeil: Orthopädie, 4. Auflage, Thieme 2003, pp. 175-209.
8. Krämer: Orthopädie 5. Auflage, Springer 1998, pp. 188-208.
9. Howell DS, Pathogenesis of osteoarthritis. Am J Med. 1986;80, Issue 4, supplement 2 pp. 24-28.
10. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheuma 2000; 43; pp. 1916-26.
11. Lee P, Rooney P., Sturrock R., Kennedy A., Dick W., The etiology and pathogenesis of osteoarthritis: a review. Semin Arthritis Rheum 1974; 3, pp. 189-218.
12. Chang R, Falconer J, Stulberg S, Arnold W, Manheim L, Dyer, A. A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum 1993; 36; pp. 289-96.
13. Moseley J, Wray N, Kuykendall D, Willis K, Landon G. Arthroscopic treatment of osteoarthritis of the knee: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. Results of a pilot study. Am J Sport Med 1996; 24; pp. 28-34.
14. Livesley P, Doherty M, Needoff M, Moulton A. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. J Bone Joint Surg Br 1991; 73: pp. 922-6.
15. Ike R, Arnold W. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. J Bone Joint Surg Br 1992; 74; pp. 788-9.

-
17. Ogilvie-Harris D, Jackson R. the arthroscopic treatment od chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg* 1984; 66B; pp. 660-5.
 18. Setton LA, Zhu WB, Mow VC. The biphasic poroviscoelastic behavior of articular cartilage - role of the surface zone on governing the compressive behavior. *J Biomech* 1993; 26; pp. 581-92.
 19. Mow VC, Ateshian GA, Spilker RL, Biomechanics of diarthroidal joints - a review of 20 years of progress. *J Biomech Eng* 1993; 115: pp. 460-7.
 20. Clark JM, Norman AG, Kaab MJ, Notzli HP. The surface contour of articular cartilage in an intact, loaded joint. *J Anat* 1999; 195: pp. 45-56.
 21. Kim HKW, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion - an experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg* 1991;73A; pp. 1301-15.
 22. Hunziker EB, Quinn TM. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A Suppl 2: pp. 85-92.
 23. Tew S, Kwan APL, Hann A, Thomson B, Archer CW. The reactions of articular to experimental wounding: the role of apoptosis. *Arthritis Rheum* 2000, 43: pp. 215-25.
 24. McLaren AC, Blokker CP, Fowler PJ, Roth JN, Rock MG, Arthroscopic debridement of the knee for osteoarthritis. *Can J Surg* 1991; 34: pp. 595-8.
 25. Messner H, Fahlgren A, Ross I, Andersson B. Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cart* 2000; 8; pp. 197-206.
 26. Messner H, Fahlgren A, Persliden J, Andersson B. Radiographic joint space narrowing and histologic changes in a rabbit meniscectomy model of early knee osteoarthrosis. *Am J Sports Med* 2001; 29; pp. 151-60.
 27. Rangger C, Klestil T, Gloetzer W, Kemmler G, Benedetto K. Osteoarthritis after arthroscopic partial meniscectomy. *Am J Sports Med* 1995; 23, pp. 240-4.
 28. Neyret P, Donell S, Dejour H. Osteoarthritis of the knee following meniscectomy. *Br J Rheumatol* 1994; 33: pp. 267-8.
 29. Wei N, Delauter S, Erlichman M. The holmium YAG laser in office based arthroscopy of the knee: comparison with standard interventional instruments in patients with arthritis. *J Rheumatol* 1997; 24: pp. 1806-8.
 30. Zangger P, Gerebr B. Use of laser in arthroscopy of the ankle. Indications, method, first results. *Orthopäde* 1996, 25: pp. 73-8.

-
34. Altman R, Kates J, Chun L, Dean D, Eyre D. Preliminary observation of chondral abrasion in a canine model, *Ann Rheum Dis* 1992; 51: pp. 1056-62.
 35. Chen, F, Frenkel S, Di CP, Repair of articular cartilage defects: part II. Treatment options, *Am J Orthop* 1999, 28, pp. 88-96.
 36. Singh S, Lee C, Tay B. Results of arthroscopic abrasion arthroplasty in osteoarthritis of the knee joint. *Singapore Med J* 1991; 32; pp. 34-7.
 37. Haspl M, Pecina M. Treatment of gonarthrosis with arthroscopic abrasion. *Lijec Vjesn* 1995: 117; pp. 236-40.
 38. Akizuki S, Yasukawa Y, Takizawa T. Does arthroscopic abrasion arthroplasty promotes cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone, *Arthroscopy* 1997; 13; pp. 9-17.
 39. Steadman J, Rodkey W, Briggs K, Rodrigo J. The microfracture technic in the management of the complete cartilage defeats in the knee joint. *Orthopäde* 1999; 28: pp. 26-32.
 40. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthopedic Res.* 1991; 9: pp. 641-50.
 41. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone-marrow differentiate in-vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 251: pp. 3-11.
 42. Pittenger M, Mosca J, McIntosh K. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251: pp. 3-11.
 43. Pedersen M, Moghaddam A, Bak K, Koch J. The effect of bone drilling on pain in gonarthrosis. *Int Orthop* 1995; 19: pp. 12-15.
 44. Schmidt H, Hasse E. Arthroscopic surgical treatment of circumscribed cartilage damage with spongiolization or Pridie Drilling. *Beitr Orthop Traumatol* 1989; 36: pp. 35-37.
 45. Lonner JH, Siliski JM, Lotke PA. Simultaneous femoral osteotomy an total knee arthroplasty for treatment of osteoarthritis associated with severe extra-articular deformity. *J Bone Joint Surg* 2000; 82A: pp. 342-48.
 46. Billings A, Scott DF, Camargo MP, Hofmann AA. High tibial osteotomy with a calibrated osteotomy guide, rigid internal fixation, and early motion- long-term follow up. *J Bone Joint Surg* 2000; 82 A: pp. 70-79.
 47. Goldman RT, Scuderi GR, Kelly MA. Arthroscopic treatment of the degenerative knee in older athletes. *Clin Sports Med.* 1997; 16: pp. 51-68.
 48. Coventry M. Proximal tibial varus osteotomy for osteoarthritis of the lateral

-
- compartment of the knee. *J Bone Joint Surg* 1987; 69A: pp. 32-38.
49. Coventry M, Ilstrup D, Wallrichs S. Proximal tibial osteotomy. A critical long-term study of eight-seven cases. *J Bone Joint Surg* 1993; 75A: pp. 196-201.
 50. Coventry M. Upper tibia osteotomy. *Clin Orthop* 1984; 182: pp. 46-52.
 51. Aydogdu S, Sur H. High tibial osteotomy for varus deformity of more than 20 degrees. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1997; 84: pp. 439-46.
 52. Insall J, Joseph D, Msika C. High tibial osteotomy for varus gonarthrosis. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg* 1984; 66A: pp. 1040-48.
 53. Reigstad A, Gronmark T. Osteoarthritis of the hip treated by intertrochanteric osteotomy. A long-term follow-up. *J Bone Joint Surg* 1984; 66A: pp. 1-6.
 54. Dearborn J, Eakin C, Skinner H. Medial compartment arthrosis of the knee. *Am J Orthop* 1996; 25: pp. 18-26.
 55. Odenbring S, Egund N, Lindstrand A, Lohmander LS, Willen H. Cartilage regeneration after proximal tibial osteotomy for medial gonarthrosis - an arthroscopic, roentgenographic, and histologic study. *Clin Orthop* 1992; 277: pp. 210-16.
 56. Specchiulli F, Laforgia R, Solarino G. Tibial osteotomy in the treatment of varus osteoarthritic knee. *Ital J Orthop Traumatol* 1990; 16: pp. 507-14.
 57. Weisel H. Intertrochanteric osteotomy for osteoarthritis. A long-term follow-up. *J Bone and Joint Surg* 1980; 62B: pp. 37-42.
 58. van Valburg AA, van Roermund PM, Marijnissen ACA, Wenting MLG, Verbout AJ, Lafeber FPJG, et al. Joint distraction in treatment of osteoarthritis – (II): effects on Cartilage in a canine model. *Osteoarthritis Cart* 2000; 8: pp. 1-8.
 59. J.C. Fernandes Lopez und A. Ruano-Ravina. Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid in the treatment of hip osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2006. 14; 12: pp. 1306-11.
 60. Haebler C. Experimentelle Untersuchung über die Regeneration des Gelenkknorpels. *Klin Chir* 1925. 134: pp. 602-40.
 61. Cohen JLD. Bone and cartilage formation by periosteum. *J Bone Joint Surg* 1955; 37A: pp. 717-30.
 62. Engkvist O, Wilander E. Formation of cartilage from rib perichondrium grafted to an articular defect in the femur condyle of the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1979; 13: pp. 371-76.
 63. Ohlsen L. Cartilage formation from free perichondrial grafts: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg* 1976; 29: pp. 262-67.

-
64. Skoog T, Ohlsen L, Sohn SA. Perichondral potential for cartilaginous regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1972; 6: pp. 123-25.
 65. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AL. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in-Vivo. *J Orthop Res* 1991; 9: pp. 465-76.
 66. Miura Y, Fitzsimmons JS, Commisso CN, Gally SH, Odriscoll SW. Enhancement of periosteal chondrogenesis in-vitro – dose-response for transforming growth factor beta (TGF-beta 1). *Clin Orthop* 1994; 301: pp. 271-80.
 67. Mukherjee N, Saris D, Schultz F, Berglund L, An K, O`Driscoll S. The enhancement of periosteal chondrogenesis in organ culture by dynamic fluid pressure. *J Orthop Res* 2001; 19: pp. 524-30.
 68. O`Driscoll SW, Recklies AD, Poole AR. Chondrogenesis in periosteal explants – an organ culture model for in-vitro study. *J Bone Joint Surg* 1994; 76 A: pp. 1042-51.
 69. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg* 1990; 72B: pp. 1003-7.
 70. Korkala O, Kuokkanen H. Autogenous osteoperiosteal grafts in the reconstruction of full-thickness joint surface defects. *Int Orthop* 1991; 15: pp. 233-37.
 71. Bouwmeester S, Beckers J, Kuijer R, Bulstra S. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop* 1997; 21: pp. 313-17.
 72. Hoikka VE, Jaroma HJ, Ritsila VA. Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand* 1990; 61: pp. 36-39.
 73. Brent B. Auricular repair with autogenous rib cartilage grafts – two decades of experience with 600 cases. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: pp. 355-74.
 74. Hangody L, Kish G, Modis L, Szerb I, Gaspar L, Dioszegi Z, et al. Mosaicplasty for the treatment of osteochondritis dissecans of the talus: two to seven year results in 36 patients. *Foot Ankle Int* 2001; 22: pp. 552-28.
 75. Bobic V. Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions. *Orthopäde* 1999; 28: pp. 19-25.
 76. Girdler NM. Repair of articular defects with autologous mandibular condylar cartilage. *J Bone Joint Surg* 1993; 75A: pp. 710-14.
 77. Bakay A, Csonge L, Papp G, Fekete L. Osteochondral resurfacing of the knee joint with allograft. Clinical analysis of 33 cases. *Int Orthop* 1998; 22: pp. 277-81.
 78. Bell R, Davis A, Allan D, Langer F, Czitrom A, Gross A. Fresh osteochondral allografts for advanced giant cell tumors at the knee. *J Arthroplasty* 1994; 9: pp. 603-9.

-
79. Czitrom A, Keating S, Gross A. The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. *J Bone Joint Surg* 1990; 72A: pp. 574-81.
 80. Laprell H, Petersen W. Autologous osteochondral transplantation using the diamond bone-cutting system (DBSC): 6-12 years' follow-up of 35 patients with osteochondral defects at the knee joint. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121: pp. 248-53.
 81. Attmanspacher W, Dittrich V, Stedtfeld H. Experiences with arthroscopic therapy of chondral and osteochondral defects of the knee joint with OATS (Osteochondral Autograft Transfer System). *Zentralbl Chir* 2000; 125: pp. 494-99.
 82. Bentley G, Minas T. Treating joint damage in young people. *BMJ* 2000; 320: pp. 1585-88.
 83. Sadler, T. *Medizinische Embryologie*, 10. korrigierte Auflage. 2003, p. 158.
 84. Grande DA, Pitman Mi, Petersen L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989; 7: pp. 208-18.
 85. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: pp. 215-24.
 86. Solursh M. Formation of cartilage tissue in-vitro. *J Cell Biochem* 1991; 45: pp. 258-60.
 87. Katsube K, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Matsusaki M, Tobita M, et al. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in Atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000; 120: pp. 121-27.
 88. Friedenstein A, Determined an inducible osteogenic precursor cells. In: Elliot K, Fitzsimmons D, Eds. *Hard tissue growth , Repair, and Remineralization*. Ciba Foundation Symposium. Chichester: John Wiley& Sons. 1973: pp. 169-85.
 89. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976; 47: pp. 327-55.
 90. Friedenstein AJ, Latznik NW, Grosheva AG, Gorshaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultures cells in porous sponges. *Exp Hematol* 1982; 10: pp. 217-27.
 91. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. In: *Cell and Molecular biology of vertebrate hard tissue*. Ciba Foundation Symposium. Chichester: John Wiley&Sons 1988: pp. 42-60.
 92. Caplan A. Stem cell delivery vehicle. *Biomaterials* 1990; 11: pp. 44-46.
 93. Pittenger M, Mackay A, Beck, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: pp. 143-47.

-
94. Johnstone B, Yoo J. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop* 1999; 367: pp. 156-62.
 95. Im G, Kim D, Shiun J, Hyun C, Cho W. Repair of cartilage defect of the rabbit with Cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg* 2001; 83 B: pp. 289-94.
 96. Kadiyala S, Young R, Thiede M, Bruder S. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in-vivo und in-vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: pp. 125-34.
 97. Lennon D, Haynesworth S, Arm D, Baber M, Caplan A. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effect on in-vivo und in-vitro osteochondrogenesis. *Dev Dyn* 2000; 219: pp. 50-62.
 98. Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1994; 76A: pp. 579-92.
 99. Solchaga L, Dennis J, Goldberg V, Caplan A. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* 1999; 17: pp. 205-13.
 100. Gilbert, SF. (2000). *Developmental biology* (6th ed.). Sunderland, Mass: Sinauer Associates. ISBN 0-87893-243-7.
 101. Lee OK, Kuo TK, Chen W, Lee K, Hsieh S, Chen T. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103, 5: pp. 1669-1675
 102. White AC, Lavine KJ, Ornitz DM. FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network. *Development* 2007; 134, pp. 3743-3752.
 103. Lawrence, DA. "Transforming growth factor-beta: a general review." *European cytokine network* 7.3 (1996): pp. 363-374.
 104. Hoodless PA, Wrana JL. "Mechanism and function of signaling by the TGF β superfamily." *Protein Modules in Signal Transduction*. Springer Berlin Heidelberg, 1998. pp. 235-272.
 105. Lampropoulos P. TGF-beta signalling in colon carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2012 Jan 1; 314(1): pp. 1-7. Review.
 106. Su HT. Stem cell marker nestin is critical for TGFB1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*. 2013 Jul; 11(7): pp. 768-79.
 107. Zarzynska JM. Two Faces of TGF-Beta 1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014: Article ID 141747, 16 pages

-
108. Hau P. TGF- β 2 signaling in high-grade gliomas. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Dec; 12(12): pp. 2150-7.
 109. Drabsch Y, ten Dijke P., TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Dec; 31(3-4): pp. 553-68. Review.
 110. Massagué J, Weis-Garcia F. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv*. 1996; 27: pp. 41-64.
 111. Massagué J, TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Oct;13(10): pp. 616-30. Review.
 112. Komada M. Sonic Hedgehog signalling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem /progenitor cells by regulation cell cycle kinetics during the development of the neocortex. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2012 Jun; 52(2): pp. 72-7.
 113. Kavran JM. All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *J Biol Chem*. 2010 Aug 6;285(32): pp. 24584-90.
 114. Chen JK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signalling by direct binding of Cyclopamine to Smoothened *Genes Dev*. 2002 November 1; 16(21): pp. 2743–2748.
 115. Warzecha J, Brüning C, Percic D. Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the hedgehog-inhibitor cyclopamine *J Chemother*. 2007 Oct; 19(5): pp. 554-61.
 116. Dahmane N. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development*. 2001 Dec; 128(24): pp. 5201-12.
 117. Horne J. Sonic hedgehog, the Morphogen. *Nature Cell Biology*. 1 July 2004.
 118. Aguilar A. Analysis of human samples reveals impaired SHH-dependent cerebellar development in Joubert syndrome/Meckel syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 16;109(42): pp. 16951-6.
 119. Zaghoul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest*. 2009;119(3): pp. 428–437.
 120. Wilson CW. Fused has evolved divergent roles in vertebrate Hedgehog signalling and motile ciliogenesis. *Nature*. 2009 May 7; 459(7243): pp. 98-102
 121. Furubo S. Roles of myofibroblasts and notch and hedgehog signaling pathways in the formation of intrahepatic bile duct lesions in polycystic kidney rats. *Pediatr Dev Pathol*. 2013 May-Jun; 16(3): pp. 177-90.
 122. Flaquer M. *Nefrologia*. Growth factors and renal regeneration. 2010;30(4): pp. 385-93.

-
123. Tamama K. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. *Biomed Biotechnol.* 2010;2010: p. 795385.
 124. Watabe, T. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1): pp. 103-15.
 125. Ball SG. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 Jan;10(1): pp. 57-71.
 126. Blair HC. Balanced regulation of proliferation, growth, differentiation, and degradation in skeletal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov; 1116: pp. 165-73.
 127. Venzina CM, Bushman AW. Hedgehog signalling in prostate growth and benign Hyperplasia. *Curr. Urol. Rep.* 2007 Jul;8(4): pp. 275-80.
 128. Greene RM, Pisano MM. Palate morphogenesis: Current understanding and future directions. *Birth Defects Res C embryo Today* 2010. Jun; 90(2): pp. 133-54.
 129. Kayed H, Friess H. Hedgehog signalling in the normal and diseased pancreas. *Pancreas.* 2006 Mar; 32(2): pp. 119-29.
 130. Kimura J, Deutsch GH. Key mechanisms of early lung development. *Pediatr Dev Pathol.* 2007. Sep-Oct; 10(5): pp. 335-47.
 131. Hatsell S, Frost AR. Hedgehog signaling in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2007 Sep; 12(2-3): pp. 163-73.
 132. Altar M, Tang X. Hedgehog signaling in skin development and cancer. *Exp. Dermatol* 2006 Sep.; 15(9): pp. 667-77.
 133. Cristofaro B, Emanuelli C. Possible novel targets for therapeutic angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Apr; 9(2): pp. 102-8.
 134. Nagase T, Fujita T. Hedgehog signaling in vascular development. *Angiogenesis.* 2008; 11(1): pp. 71-77.
 135. Parkin CA, Ingham PW. The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair. I. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Feb; 294(2): pp. 363-7.
 136. van den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4): pp. 1343-75.
 137. Huang X, Ketova T. Isolation, enrichment, and maintenance of medulloblastoma stem cells. *J. Vis Exp.* 2010 Sep 1;(43)

-
138. Saran A. Basal cell carcinoma and the carcinogenic role of aberrant Hedgehog signaling. *Future Oncol.* 2010 Jun;6(6): pp. 1003-14.
 139. Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer. *Cancer J.* 2010 May-Jun; 16(3): pp. 196-201.
 140. Wu WK, Sung JJ. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2010 Sep 28; 295(2): pp. 144-53.
 141. Kasper M, Toftgard R. Hedgehog signaling in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2009 Jun; 30(6): pp. 903-11.
 142. Steck EI, Richter W. Chondrocyte expressed protein-68 (CEP-68), a novel human marker gene for cultured chondrocytes. *Biochem J.* 2001 Jan 15; 353(Pt 2): pp. 169-74.
 143. Herlofsen SR, Brinchmann JE. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Self-Gelling Alginate Discs Reveals Novel Chondrogenic Signature Gene Clusters. *Tissue Eng Part A.* 2011 Apr; 17(7-8): pp. 1003–1013.
 144. Tuli R, Tuan RS. Transforming growth-factor-beta mediated chondrogenesis of the mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem.* 2003 Oct 17; 278 (42): pp. 41227-36.
 145. Worster AA, Nixon AJ. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthopaedic Research* Vol 19, I 14, July 2001, pp. 738–749.
 146. Javelaud D, Pierrat M-J, Mauviel A. Crosstalk between TGF- β and hedgehog signalling in cancer hedgehog signalling in cancer, *FEBS letters*, Vol. 586, Issue 14, 4 July 2012, pp. 2016–2025.
 147. Cameron, Briggs, Steadman: Reproducibility and reliability of the Outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically, *Am. J. Sports Med.*, Jan 2003; 31: pp. 83-86
 148. Marks P, Donaldson M: Inflammatory Cytokine Profiles Associated With Chondral Damage in the Anterior Cruciate Ligament-Deficient Knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, Volume 21, Issue 11, pp. 1342-1347.
 149. Ganten, D, Ruckpaul, K. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen.* 1. Auflage, p. 472
 150. Pullig, O, Pfander D, Swoboda B. "Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression." *Der Orthopäde* 30.11 (2001): pp. 825-833
 151. Djouad F, Jorgensen C. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from

-
- umbilical cord blood. *Blood* 2004. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(2): R33.
152. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie*, 3. Auflage, Thieme 2009, pp. 137-144.
153. Schiebler TH., Korf, HW. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage, Thieme 2007, pp. 33-57
154. Zilles K., Tillmann B. *Anatomie*. 1. Auflage, Thieme 2010. pp. 33-42.
155. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Apr; 35(4): pp. 401-4.
156. Schünke M. *Funktionelle Anatomie - Topographie und Funktion des Bewegungssystems*. 1. Auflage, Thieme 2000. pp. 7-16.
157. Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J Dev Biol.* 2015 Dec;3(4): pp. 177-192.
158. Zilles K., Tillmann, B. *Anatomie*, 1. Auflage. Thieme 2010, pp. 76-94.
159. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009 Nov;1(6): pp. 461-8.
160. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. 3. Auflage. Thieme p. 167.
161. Stübgen JP. Tumor necrosis factor-alpha as a potential therapeutic target in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neurol.* 2011 Jun;258(6): pp. 961-70.
162. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005 May;115(1):1-20.
163. Morgera S, Haase M, Rocktäschel J, Böhler T, von Heymann C, Vargas-Hein O, Krausch D, Zuckermann-Becker H, Müller JM, Kox WJ, Neumayer HH. High permeability haemofiltration improves peripheral blood mononuclear cell proliferation in septic patients with acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Dec;18(12): pp. 2570-6.
164. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011 Dec;74(6): pp. 522-47.
165. Kellgren, JH, Laurence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheuma Dis* 1957; 16: pp. 491-501.
166. Altman RD, Gold GE. *Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis*, revised. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15 Suppl A:A pp. 1-56.
167. van Walsem A, Pandhi S, Nixon RM, Guyot P, Karabis A, Moore RA. Relative benefit-risk comparing diclofenac to other traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and

-
- cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis: a network meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2015 Mar 19;17: p. 66
168. Antman EM. Evaluating the Cardiovascular Safety of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Circulation.* 2017 May 23;135(21): pp.2062-2072.
169. Tian K, Cheng H, Zhang J, Chen K. Intra-articular injection of methylprednisolone for reducing pain in knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018 Apr;97(15).
170. Safy M, de Hair MJH, Jacobs JWG, Buttgerit F, Kraan MC, van Laar JM. Efficacy and safety of selective glucocorticoid receptor modulators in comparison to glucocorticoids in arthritis, a systematic review. *PLoS One.* 2017 Dec 21;12(12):e0188810.
171. Rivera F, Bertignone L, Grandi G, Camisassa R, Comaschi G, Trentini D, Zanone M, Teppex G, Vasario G, Fortina G. Effectiveness of intra-articular injections of sodium hyaluronate-chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: a multicenter prospective study. *J Orthop Traumatol.* 2016 Mar;17(1): pp. 27-33.
172. Kwon YW, Eisenberg G, Zuckerman JD. Sodium hyaluronate for the treatment of chronic shoulder pain associated with glenohumeral osteoarthritis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Shoulder Elbow Surg.* 2013 May;22(5): pp. 584-94.
173. Özler K, Aktaş E, Atay Ç, Yılmaz B, Arıkan M, Güngör Ş. Serum and knee synovial fluid matrix metalloproteinase-13 and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with late stage osteoarthritis. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2016 Dec;50(6): pp. 670-673.
174. Fu FH, Zurakowski D, Browne JE, Mandelbaum B, Erggelet C, Moseley JB Jr, Anderson AF, Micheli LJ. Autologous chondrocyte implantation versus debridement for treatment of full-thickness chondral defects of the knee: an observational cohort study with 3-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2005 Nov;33(11): pp. 1658-66.
175. Bijlsma JW, Dekker J. A step forward for exercise in the management of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2005 Jan;44(1): pp. 5-6.
176. Borrell RM, Parker R, Henley EJ, Masley D, Repinecz M. Comparison of in vivo temperatures produced by hydrotherapy, paraffin wax treatment, and Fluidotherapy. *Phys Ther.* 1980 Oct;60(10): pp. 1273-6.
177. Cheing GL, Hui-Chan CW. Would the addition of TENS to exercise training produce better physical performance outcomes in people with knee osteoarthritis than either intervention alone? *Clin Rehabil.* 2004 Aug;18(5): pp. 487-97
178. Fransen M, Crosbie J, Edmonds J. Physical therapy is effective for patients with osteoarthritis of the knee: a randomized controlled clinical trial. *J Rheumatol.* 2001 Jan;28(1): pp. 156-64.
179. Hoeksma HL, Dekker J, Runday HK, Heering A, van der Lubbe N, Vel C, Breedveld FC, van den Ende CH. Comparison of manual therapy and exercise therapy in

-
- osteoarthritis of the hip: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2004 Oct 15;51(5): pp. 722-9.
180. Ezzo J, Berman B, Hadhazy VA, Jadad AR, Lao L, Singh BB. Is acupuncture effective for the treatment of chronic pain? A systematic review. *Pain.* 2000 Jun;86(3): pp. 217-25.
181. Ammer K. *Manuelle Medizin.* March 2013, Vol. 51, Issue 1, pp. 73-76.
182. Rehart S, Lehnert H. Arthrosis update. *Rheumatol.* 2008 Jul;67(4): pp. 305-14.
183. Pfeil J, Hasch E. Umstellungsosteotomien am Kniegelenk, *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2005 May-Jun;143(3):R43-64.
184. Barlow T, Downham C, Griffin D. Arthroscopy in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *Acta Orthop Belg.* 2015 Mar;81(1): pp. 1-8.
185. Lazic S, Boughton O, Hing C, Bernard J. Arthroscopic washout of the knee: a procedure in decline. *Knee.* 2014 Mar;21(2): pp. 631-4.
186. van den Bekerom MP, Patt TW, Rutten S, Raven EE, van de Vis HM, Albers GH. Arthroscopic debridement for grade III and IV chondromalacia of the knee in patients older than 60 years. *J Knee Surg.* 2007 Oct;20(4): pp. 271-6.
187. Grieshaber JA, Stanton M, Gambardella R. Debridement of Articular Cartilage: The Natural Course. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2016 Jun;24(2): pp. 56-62.
188. Evidence Development and Standards Branch, Health Quality Ontario. Arthroscopic Debridement of the Knee: An Evidence Update. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2014 Nov 1;14(13): pp. 1-43.
189. Sansone V, de Girolamo L, Pascale W, Melato M, Pascale V. Long-term results of abrasion arthroplasty for full-thickness cartilage lesions of the medial femoral condyle. *Arthroscopy.* 2015 Mar;31(3): pp. 396-403.
190. Hangody L, Vásárhelyi G, Hangody LR, Sükösd Z, Tibay G, Bartha L, Bodó G. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury.* 2008 Apr;39 Suppl 1: pp. 32-9.
191. Müller B, Kohn D. Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method. *Orthopade.* 1999 Jan;28(1): pp. 4-10.
192. Steinwachs MR, Gugli T, Kreuz PC. Marrow stimulation techniques. *Injury.* 2008 Apr;39 Suppl 1: pp. 26-31.
193. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med.* 2009 Oct;37(10): pp. 2053-63.

-
194. Frehner F, Benthien JP. Microfracture: State of the Art in Cartilage Surgery? *Cartilage*. V 2017 Apr 1.
 195. Strecker W, Dickschas J, Harrer J, Müller M. Arthroscopy prior to osteotomy in cases of unicondylar osteoarthritis. *Orthopade*. 2009 Mar;38(3): pp. 263-8.
 196. Giuseffi SA, Replogle WH, Shelton WR. Opening-Wedge High Tibial Osteotomy: Review of 100 Consecutive Cases. *Arthroscopy*. 2015 Nov;31(11): pp. 2128-37.
 197. Lubowitz JH. Editorial commentary: biologics of osteotomy of the proximal tibia. *Arthroscopy*. 2015 Apr;31(4): p. 731.
 198. van der Woude JA, Wiegant K, van Heerwaarden RJ, Spruijt S, Emans PJ, Mastbergen SC, Lafeber FP. Knee joint distraction compared with total knee arthroplasty: a randomised controlled trial. *Bone Joint J*. 2017 Jan;99-B(1): pp. 51-58.
 199. Jahresbericht EPRD 2015, p 13.
 200. Bourne RB, Chesworth B, Davis A, Mahomed N, Charron K. Comparing patient outcomes after THA and TKA: is there a difference? *Clin Orthop Relat Res*. 2010, Feb;468(2): pp. 542-6.
 201. Philpott A, Weston-Simons JS, Grammatopoulos G, Bejon P, Gill HS, McLardy-Smith P, Gundle R, Murray DW, Pandit H. Predictive outcomes of revision total hip replacement--a consecutive series of 1176 patients with a minimum 10-year follow-up. *Maturitas*. 2014 Feb;77(2): pp. 185-90.
 202. Triantafyllopoulos GK, Soranoglou VG, Memtsoudis SG, Sculco TP, Poultsides LA. Rate and Risk Factors for Periprosthetic Joint Infection Among 36,494 Primary Total Hip Arthroplasties. *J Arthroplasty*. 2018 Apr;33(4): pp. 1166-1170.
 203. Concoff A, Sancheti P, Niazi F, Shaw P, Rosen J. The efficacy of multiple versus single hyaluronic acid injections: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017 Dec 21;18(1): p. 542.
 204. Bisicchia S, Tudisco C. Hyaluronic acid vs corticosteroids in symptomatic knee osteoarthritis: a mini-review of the literature. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2017 May-Aug;14(2): pp. 182-185.
 205. Rodriguez-Merchan EC. Intra-articular Injections of Hyaluronic Acid and Other Drugs in the Knee Joint. *HSS J*. 2013 Jul;9(2): pp. 180-2.
 206. Eli N, Oragui E, Khan W. Advances in meniscal tissue engineering. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2011 Jul-Aug;13(4): pp. 319-26.
 207. Familiari F, Cinque ME, Chahla J, Godin JA, Olesen ML, Moatshe G, LaPrade RF. Clinical Outcomes and Failure Rates of Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee: A Systematic Review. *Am J Sports Med*. 2017 Oct 1.

-
208. Tírigo LEP, McCauley JC, Pulido PA, Bugbee WD. Lesion Size Does Not Predict Outcomes in Fresh Osteochondral Allograft Transplantation. *Am J Sports Med.* 2018 Mar;46(4): pp. 900-907.
 209. Nielsen ES, McCauley JC, Pulido PA, Bugbee WD. Return to Sport and Recreational Activity After Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee. *Am J Sports Med.* 2017 Jun;45(7): pp. 1608-1614.
 210. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bély M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics.* 1998 Jul;21(7): pp. 751-6.
 211. Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V, Stankevicius E, Toliulis V, Bernotavicius G, Smailys A. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy.* 2005 Sep;21(9): pp. 1066-75.
 212. Link TM, Mischung J, Wörtler K, Burkart A, Rummeny EJ, Imhoff AB. Normal and pathological MR findings in osteochondral autografts with longitudinal follow-up. *Eur Radiol.* 2006 Jan;16(1): pp. 88-96.
 213. Bexkens R, Ogink PT, Doornberg JN, Kerkhoffs GMMJ, Eygendaal D, Oh LS, van den Bekerom MPJ. Donor-site morbidity after osteochondral autologous transplantation for osteochondritis dissecans of the capitellum: a systematic review and meta-analysis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017 Jul;25(7): pp. 2237-2246.
 214. Birla R. Introduction to tissue engineering. Applications&Challenges, John Wiley&Sons 2014, p.360.
 215. Shekhter AB, Fayzullin AL, Vukolova MN, Rudenko TG, Osipycheva VD, Litvitsky PF. Medical applications of collagen and collagen-based materials. *Curr Med Chem.* 2017 Dec 5.
 216. Choi SJ, Na K, Kim S, Woo DG, Sun BK, Chung HM, Park KH. Combination of ascorbate and growth factor (TGF beta-3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes for neocartilage formation. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Dec 15;83(4): pp. 897-905.
 217. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(24): pp. 2589-98.
 218. Joergensen NL, Foldager CB, Le DQ, Lind M, Lysdahl H. Precipitant induced porosity augmentation of polystyrene preserves the chondrogenicity of human chondrocytes. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Dec;104(12): pp. 3073-3081.
 219. Moulisová V, Poveda-Reyes S, Sanmartín-Masiá E, Quintanilla-Sierra L, Salmerón-Sánchez M, Gallego Ferrer G. Hybrid Protein-Glycosaminoglycan Hydrogels Promote

-
- Chondrogenic Stem Cell Differentiation. ACS Omega. 2017 Nov 30;2(11): pp. 7609-7620.
220. Choi WH, Kim HR, Lee SJ, Jeong N, Park SR, Choi BH, Min BH. Fetal Cartilage-Derived Cells Have Stem Cell Properties and Are a Highly Potent Cell Source for Cartilage Regeneration. Cell Transplant. 2016;25(3): pp. 449-61.
221. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008 Jun;45(2): pp. 115-20.
222. Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part B Rev. 2009 Mar;15(1): pp. 29-41.
223. Twardzik T, Rapp UR. Somatische Stammzellen. Grundlagen, Konzepte und Herausforderungen, 2002 Feb, Vol 45, Issue 2, pp. 79-84.
224. Unwin RD, Gaskell SJ, Evans CA, Whetton AD. The potential for proteomic definition of stem cell populations. Exp Hematol. 2003 Dec;31(12): pp.1147-59.
225. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Dec 1;8(12).
226. Hudnall AM, Arthur JW, Lowery JW. Clinical Relevance and Mechanisms of Antagonism Between the BMP and Activin/TGF- β Signaling Pathways. J Am Osteopath Assoc. 2016 Jul 1;116(7): pp. 452-61.
227. Scarfi S. Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. World J Stem Cells. 2016 Jan 26;8(1): pp. 1-12.
228. Kwiatkowski W, Gray PC, Choe S. Engineering TGF- β superfamily ligands for clinical applications. Trends Pharmacol Sci. 2014 Dec;35(12): pp. 648-57.
229. Sartori R, Gregorevic P, Sandri M. TGF β and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. Trends Endocrinol Metab. 2014 Sep;25(9): pp. 464-71.
230. Wang W, Rigueur D, Lyons KM. TGF β signaling in cartilage development and maintenance. Birth Defects Res C Embryo Today. 2014 Mar;102(1): pp. 37-51.
231. Wrana JL. Signaling by the TGF β superfamily. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Oct 1;5(10).
232. Harris PJ, Takebe N, Ivy SP. Molecular conversations and the development of the hair follicle and basal cell carcinoma. Cancer Prev Res (Phila). 2010 Oct;3(10): pp. 1217-21.
233. Manoranjan B, Venugopal C, McFarlane N, Doble BW, Dunn SE, Scheinmann K, Singh SK. Medulloblastoma stem cells: where development and cancer cross pathways. Pediatr Res. 2012 Apr;71(4 Pt 2): pp. 516-22.

-
234. Samadani AA, Akhavan-Niaki H. Interaction of sonic hedgehog (SHH) pathway with cancer stem cell genes in gastric cancer. *Med Oncol*. 2015 Mar;32(3): p. 48.
235. Benvenuto M, Masuelli L, De Smaele E, Fantini M, Mattera R, Cucchi D, Bonanno E, Di Stefano E, Frajese GV, Orlandi A, Screpanti I, Gulino A, Modesti A, Bei R. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/GLI pathway with SMO (GDC-0449) or GLI (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget*. 2016 Feb 23;7(8): pp. 9250-70.
236. Yang L, Wang LS, Chen XL, Gatalica Z, Qiu S, Liu Z, Stoner G, Zhang H, Weiss H, Xie J. Hedgehog signaling activation in the development of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of esophagus. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(1): pp. 46-57.
237. Xu C, Li J, Lu Y, Jiang Z. Estrogen receptor α and hedgehog signal pathway developmental biology of gastric adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2012 Jun;59(116): pp. 1319-22.
238. Satoh K, Kanno A, Hamada S, Hirota M, Umino J, Masamune A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. Expression of Sonic hedgehog signaling pathway correlates with the tumorigenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Oncol Rep*. 2008 May;19(5): pp. 1185-90.
239. Hwang RF, Moore TT, Hattersley MM, Scarpitti M, Yang B, Devereaux E, Ramachandran V, Arumugam T, Ji B, Logsdon CD, Brown JL, Godin R. Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*. 2012 Sep;10(9): pp. 1147-57.
240. Szczepny A, Rogers S, Jayasekara WSN, Park K, McCloy RA, Cochrane CR, Ganju V, Cooper WA, Sage J, Peacock CD, Cain JE, Burgess A, Watkins DN. The role of canonical and non-canonical Hedgehog signaling in tumor progression in a mouse model of small cell lung cancer. *Oncogene*. 2017 Sep 28;36(39): pp. 5544-5550.
241. Xie F, Xu X, Xu A, Liu C, Liang F, Xue M, Bai L. Aberrant activation of Sonic hedgehog signaling in chronic cholecystitis and gallbladder carcinoma. *Hum Pathol*. 2014 Mar;45(3): pp. 513-21.
242. He HC, Chen JH, Chen XB, Qin GQ, Cai C, Liang YX, Han ZD, Dai QS, Chen YR, Zeng GH, Zhu JG, Jiang FN, Zhong WD. Expression of hedgehog pathway components is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Pathol Oncol Res*. 2012 Apr;18(2): pp. 349-55.
243. Zhou J, Wei X, Wei L. Indian Hedgehog, a critical modulator in osteoarthritis, could be a potential therapeutic target for attenuating cartilage degeneration disease. *Connect Tissue Res*. 2014 Aug;55(4): pp. 257-61.
244. Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Auflage, Springer 2012, pp. 225.

-
245. Caron MM. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20: pp. 1170–1178.
 246. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jan;11(1): pp. 21-34.
 247. Mistry H, Connock M, Pink J, Shyangdan D, Clar C, Royle P, Court R, Biant LC, Metcalfe A, Waugh N. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2017 Feb;21(6): pp. 1-294.
 248. Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. ACI and MACI. *J Knee Surg*. 2012 Mar;25(1): pp. 17-22.
 249. Koerner K, Stampe D, Kubanek B. Deep frozen fresh plasma in blood component therapy: preparation--quality control—indications. *Infusionsther Klin Ernahr*. 1981 Oct;8(5): pp. 253-8.
 250. Laudy AB, Bakker EW, Rekers M, Moen MH. Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2015 May;49(10): pp. 657-72.
 251. Campbell KA, Saltzman BM, Mascarenhas R, Khair MM, Verma NN, Bach BR Jr, Cole BJ. Arthroscopy. Does Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injection Provide Clinically Superior Outcomes Compared With Other Therapies in the Treatment of Knee Osteoarthritis? A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses. 2015 Nov;31(11): pp. 2213-21.

6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis, Datensätze

Abbildung 1/Abb. 1 (S. 25): aus Quintana L, Zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and Regulatory Mechanisms During Developmental Chondrogenesis: New Paradigms for Cartilage Tissue Engineering Tissue Engineering Part B: Reviews. March 2009, 15(1): pp. 29-41.

Abbildung 2/Abb. 2 (S. 27): eigene Fotodokumentation

Abbildung 3/Abb. 3 (S. 27): aus Grässel S, Anders S. Zellbasierte Therapieoptionen von Gelenkknorpeldefekten. Autologe mesenchymale Stammzellen vs. autologe Chondrozyten. Der Orthopäde. May 2012, Volume 41, Issue 5, pp. 415-430.

Abbildung 4/Abb.4 (S. 29): aus Joan Massagué, Roger R. Gomis. The logic of Tgf β signaling. FEBS letters, Volume 580, Issue 12, 22 May 2006, pp. 2811–2820.

Abbildung 5/Abb.5 (S. 30):

Aus

<http://opm.phar.umich.edu/phpthumb/phpThumb.php?src=../images/png/3rjr.png&w=250&h=300>

Abbildung 6/Abb.6 (S. 30): aus <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1KLC>; 3-D Darstellung des Transforming growth factors beta 1.

Abbildung 7/Abb. 7 (S. 33): aus wikipedia, Suchbegriff: Sonic Hedgehog Protein; 3-D Darstellung des Proteins

Abbildung 7/Abb. 7 (S. 35): aus Pan A, Chang L. A review of hedgehog signaling in cranial bone development Front Physiol 2013;4; 61. signaling in cranial bone development.

Abbildung 8/Abb. 8 (S. 34): aus <http://dev.biologists.org/content/129/9/2223/F1.large.jpg>

Abbildung 9/Abb. 9 (S. 36): aus Pan A, Chang L. A review of hedgehog signaling in cranial bone development Front Physiol 2013;4; 61. signaling in cranial bone development.

Abbildung 10/Abb. 10 (S. 57): eigene Fotodokumentation,

Abbildung 11/Abb. 11 (S. 58): eigene Dokumentation. PCR

Abbildung 12-15/Abb. 12-15 (S. 70): eigene Fotodokumentation, BrdU Inkorporation 14: MEM + 0,5% FKS; 15: MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF- β 1; 16: MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh; 17: MEM + 20% FKS.

Abbildung 16/Abb. 16 (S. 71): eigene Fotodokumentation

Abbildung 17-20/Abb. 17-20 (S. 72): eigene Fotodokumentation

Abbildung 21-23/Abb. 21-23 (S. 73): eigene Fotodokumentation

Abbildung 24-25/Abb. 24-25 (S. 73): eigene Fotodokumentation

Abbildung 26-27/Abb. 26-27 (S. 74): eigene Fotodokumentation

Abbildung 28-29/Abb. 28-29 (S. 74): eigene Fotodokumentation

Abbildung 30/Abb. 30 (S. 75): eigene Fotodokumentation

Tabelle 1/Tab. 1 (S. 59): eigene Dokumentation. Zeit- und Dosis-/Wirkungsprofil von rekombinantem, n-terminalem Sonic Hedgehog Protein.

Tabelle 2/Tab. 2 (S. 64): eigene Dokumentation. Die mittleren Werte aus den Wachstumskurven und das prozentuale Wachstum gemessen an der Kontrollkultur mit Zusatz von 20% FKS.

Tabelle 3/Tab. 3 (S. 70): eigene Dokumentation. BrdU-Zell-Zählung nach 21 Tagen

Diagramme 1-18 (S. 60-63, 64-69): eigene Dokumentation, Wachstumskurven

Datensätze (folgende Seiten)

Name	Vorname	Geburtsdaten	Entnahme der Zellen welche(r) Op./ Knochen	Blut	Status
I					
II					
S	H	30.12.1969	Os ilium/ Beckenfraktur		abgebrochen
männlich			1 Probe OP-Termin: 22.07.03	Entnahme bei Schafteröffnung	
III					
R	H-K	23.03.1971	prox. Femur/ Hüft-TEP	teilweise geronnen	aktiv
männlich			1 Probe OP-Termin: 28.07.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
IV					
K	S	01.12.1973	prox. Femur/ Hüft-TEP		abgebrochen
weiblich			2 Proben OP-Termin: 06.08.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
V					
S	H	21.01.1954	Beckenkamm re. / PE/ Osteoset	teilweise geronnen	abgebrochen
männlich			1 Probe OP-Termin: 11.08.03 Beckenkamm-PE	Entnahme bei Schafteröffnung	
VI					
K	O	26.01.1967	Beckenkamm re. /Coxarthrose/ Hüft-TEP		aktiv
männlich			2 Proben OP-Termin: 21.08.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
VII					
B	C	17.02.1964	prox. Femur(troch. major)/ Hüft-TEP		abgebrochen
weiblich			2 Proben OP-Termin: 09.09.03 Stiff Man Syndrom '89, Pfannlockerung	Entnahme bei Schafteröffnung	
VIII					
B	S	25.10.1958	prox. Femur (troch.major) / CTX-Hüft-TEP		aktiv
männlich			5 Proben (+ 2 Proben nach 1. Scharbung) OP-Termin: 11.09.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
IX					
N	R	06.03.1959	prox. Femur (troch.major) / CTX-Hüft-TEP		aktiv
weiblich			2 Proben OP-Termin: 15.09.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
X					
B-P	A	23.03.1944	prox. Femur (troch.major) / Hüft-TEP		aktiv
männlich			4 Proben OP-Termin: 15.09.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
XI					
A	R	21.02.1958	prox. Femur (troch. major) / Hüft-TEP		aktiv
männlich			3 Proben OP-Termin: 17.09.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
XII					
J	A	24.06.1922	prox.Femur (troch. major) / Hüft-TEP		aktiv
weiblich			2 Proben OP-Termin: 17.09.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	
XIII					
S	G	15.12.1950	prox. Femur (troch. major) / Hüft-TEP		aktiv
männlich			2 Proben OP-Termin: 17.09.03	Entnahme bei Schafteröffnung	
XIV					
M	L	28.07.1934	Prox. Femur (troch. major) / Hüft-TEP		aktiv
männlich			4 Proben OP-Termin: 18.09.03 Coxarthrose	Entnahme bei Schafteröffnung	

XV									
L	H	08.11.1947	prox. Femur (troch. major) / Hüft-TEP/						aktiv
männlich			Larynx-Ca, Chemotherapie						Entnahme bei Schafteröffnung
			3 Proben						
			OP-Termin: 19.09.03						
			OP wegen Tumorfraktur						
XVI									
W	H-P	02.11.1946	prox.Femur (troch. major) / Hüft-TEP						aktiv
männlich			2 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 22.09.03						
			Coxarthrose						
XVII									
N	E	17.07.1938	prox. Femur(troch.major)/ Hüft-TEP					teilweise geronnen	aktiv
weiblich			3 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 09.10.03						
			Coxarthrose						
XVIII									
S	H	22.05.1946	prox. Femur(troch.major)/ Hüft-TEP					teilweise geronnen	aktiv
weiblich			3 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 09.10.03						
			Coxarthrose						
XIX									
B	I	18.03.1927	prox. Femur (troch.major)/ Hüft-TEP						aktiv
weiblich			7 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 21.10.03						
			Coxarthrose						
XX									
D	D	26.04.1941	prox. Femur (troch. Major)/ Hüft-TEP						aktiv
männlich			2 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP- Termin: 21.10.03						
			Coxarthrose						
XXI									
R	P	03.03.1951	Os ilium/ Hüft-Prothese (McMinn)					etwas geronnen	aktiv
männlich			2 Proben						
			Op-Termin: 09.12.03						
			Coxarthrose						
XXII									
R	H	11.08.1938	prox.Femur/ Hüft-TEP					nicht geronnen	aktiv
weiblich			2 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 18.02.04						
			Coxarthrose						
XXIII									
V	F	20.06.1936	prox.Femur/ Hüft-TEP					nicht geronnen	aktiv
männlich			2 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			Op-Termin: 25.02.04						
			Coxarthrose						
XXIV									
R	E	24.11.1941	prox.Femur/ Hüft-TEP					teilweise geronnen	aktiv
weiblich			4 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 02.03.04						
			Coxarthrose/Hüft-Dysplasie/Z. n. Mamma-Ca						
XXV									
D	M	25.03.1966	prox.Femur/ Hüft-TEP					nicht geronnen	aktiv
männlich			6 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 04.03.04						
			Coxarthrose/ Hep.B./ Hüftkopfnekrose/Farbiger Pat./						
XXVI									
R	M	28.09.1956	prox.Femur/ Hüft-TEP					nicht geronnen	aktiv
weiblich			6 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 11.03.04						
			Coxarthrose						
XXVII									
B	K	22.10.1973	prox. Femur/ Hüft-TEP					nicht geronnen	aktiv
weiblich			7 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			OP-Termin: 15.03.04						
			Coxarthrose						
XXVIII									
A	S	06.03.1985	prox. Femur/ Hüft-TEP					teilweise geronnen	aktiv
weiblich			8 Proben						Entnahme bei Schafteröffnung
			Op-Termin: 21.09.04						
			kongenitale Hüft-Dysplasie/ aus mittlerem Osten						

Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 1: MEM + 0,5% FKS										
WK 1										
	0	2	4	7	9	11	15	19	22	26
Einzelwert	30.000	30.000	50.000	95.000	167.346	205.822	224.019	280.905	337.094	389.118
Einzelwert	30.000	27.500	35.125	76.500	146.675	170.545	192.772	245.088	296.376	362.550
Einzelwert	30.000	30.000	45.500	92.500	185.625	223.673	258.750	310.976	361.259	417.272
Mittel	30.000	29.167	43.542	88.000	166.549	200.013	225.180	278.990	331.576	389.647
Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 2: MEM + 0,5% FKS										
WK 2										
	0	4	7	9	12	15	17	21	24	
Einzelwert	30.000	55.000	100.500	145.000	232.675	264.825	285.150	341.775	379.853	
Einzelwert	30.000	45.000	75.125	177.850	198.175	231.095	260.985	295.590	340.780	
Einzelwert	30.000	52.500	87.500	175.625	229.750	264.975	290.100	350.350	396.895	
Mittel	30.000	50.833	87.708	166.158	220.200	253.631	278.745	329.238	372.509	

Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 2: MEM + 0,5% FKS + 100 ng Shh										
WK 1										
Tage	0	2	4	7	9	11	15	19	22	26
Einzelwert	30.000	50.000	110.000	295.375	645.466	890.634	2.310.954	7.915.644	10.276.458	19.225.652
Einzelwert	30.000	50.000	128.125	347.250	616.992	875.019	2.737.128	7.534.926	9.996.280	17.622.718
Einzelwert	30.000	50.000	117.500	300.500	594.824	917.764	2.422.036	7.470.422	9.573.634	16.872.344
Mittel	30.000	50.000	118.541	314.375	619.094	894.472	2.490.039	7.640.330	9.948.790	17.906.904
Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 2: MEM + 0,5% FKS + 100 ng Shh										
WK 2										
Tage	0	4	7	9	12	15	17	21		
Einzelwert	30.000	80.000	145.000	327.375	543.560	1.632.974	6.213.320	14.739.961		
Einzelwert	30.000	70.000	188.000	406.875	634.155	1.523.680	5.931.988	18.604.971		
Einzelwert	30.000	75.000	142.500	345.500	603.955	1.587.176	5.910.176	17.114.866		
Mittel	30.000	75.000	158.500	359.917	593.889	1.581.279	6.018.495	16.819.933		

Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 2: MEM + 0,5% FKS + 10 ng TGF-β										
WK 1										
Tage	0	2	4	7	9	11	15	19	22	26
Einzelwert	30.000	40.000	90.500	230.750	495.450	734.575	2.110.650	6.244.900	8.451.650	15.875.983
Einzelwert	30.000	40.000	95.000	224.250	472.500	726.020	2.037.785	5.705.800	7.703.050	14.190.875
Einzelwert	30.000	50.000	112.500	270.125	473.625	685.750	1.863.855	5.958.625	7.658.675	12.913.764
Mittel	30.000	43.333	99.300	241.708	480.525	715.448	2.004.097	5.969.775	7.937.791	14.326.874
Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 2: MEM + 0,5% FKS + 10 ng TGF-β										
WK 2										
Tage	0	4	7	9	12	15	17	21		
Einzelwert	30.000	75.000	195.750	453.375	695.500	2.105.860	5.321.975	7.913.075		
Einzelwert	30.000	70.000	210.250	487.750	754.875	2.001.750	4.976.082	7.855.256		
Einzelwert	30.000	75.000	224.750	455.675	763.735	1.787.185	4.613.865	7.401.854		
Mittel	30.000	73.333	210.250	465.600	738.036	1.964.931	4.970.640	7.723.395		

Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 1: MEM + 20% FKS										
	WK 1									
	0	2	4	7	9	11	15	19	22	26
Einzelwert	30.000	50.000	150.000	417.188	791.461	1.206.340	3.106.954	12.157.644	11.245.820	25.225.000
Einzelwert	30.000	50.000	128.125	399.805	816.992	955.019	3.377.123	7.834.926	9.996.285	25.225.000
Einzelwert							3.242.039			
Mittel	30.000	50.000	139.062	408.497	804.227	1.080.680	3.242.039	9.996.285	10.621.052	25.225.000

Datensatz zu Diagramm xx: Wachstumskurve 2: MEM + 20% FKS										
	WK 2									
	0	4	7	9	12	15	17	21	24	28
Einzelwert	30.000	110.000	160.781	559.453	543.560	1.632.974	8.313.320	24.939.961	21.822.466	52.169.332
Einzelwert	30.000	100.000	246.094	406.875	634.153	2.523.687	8.313.320	18.704.971	24.550.274	69.559.110
Einzelwert					603.955					
Mittel	30.000	105.000	203.438	483.164	593.889	2.078.331	8.313.320	21.822.466	23.186.370	60.864.221

Proliferations-Assay 1										
Kontrolle 0,5%		TGF-β		Shh		Kontrolle 20%				Mittelwert-Tab.
0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
10.000	12.500	10.000	12.500	10.000	16.250	10.000	20.625	10.000	8.958	10.000
10.000	4.375	10.000	10.625	10.000	14.375	10.000	18.750	10.000	10.833	10.000
10.000	10.000	10.000	9.375	10.000	14.375	10.000	18.125	10.000	15.000	10.000
10.000	8.958 Mittelwerte	10.000	10.833 Mittelwerte	10.000	15.000 Mittelwerte	10.000	19.167 Mittelwerte	10.000	19.167	10.000
	4161,45507 SD		1572,88217 SD		1082,53175 SD		1301,04125 SD			

Proliferations-Assay 2										
Kontrolle 0,5%		TGF-β		Shh		Kontrolle 20%				Mittelwert-Tab.
0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
10.000	8.250	10.000	10.000	10.000	16.250	10.000	21.250	10.000	6.708	10.000
10.000	3.750	10.000	12.500	10.000	17.500	10.000	16.875	10.000	12.083	10.000
10.000	8.125	10.000	13.750	10.000	18.750	10.000	25.000	10.000	17.500	10.000
10.000	6.708 Mittelwerte	10.000	12.083 Mittelwerte	10.000	17.500 Mittelwerte	10.000	21.042 Mittelwerte	10.000	21.042	10.000
	2563 SD		1909,40654 SD		1250 SD		4066,50444 SD			

Fortl.-Nr.	BrdU-pos.	Gesamtzahl	Probe	Quotient	Prozentwert	Kohorte	Gesamt Kontrolle/Probe alle Zahlen der versch. Versuchsreihen	Zellzahlen (Rohzahlen)
4	1	36	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W1	0,027	2,70%			
5	0	33	hMSCs (MEM + 0,5% FKS) (Kontrolle) W1	0	0%			
6	0	25	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W1	0	0%	0,01169	1,17%	
7	0	40	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W1	0	0%			
8	1	37	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W1	0,027	2,70%			
9	0	74	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W2	0	0%			(Kontrolle) 0,5% FKS
10	0	35	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W2	0	0%	0,01077	1,08%	7/650 BrdU/ Gesamtzahl
11	1	32	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W2	0,03125	3,13%	0,00885	0,88%	
12	1	38	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W2	0,0263	2,63%			
13	0	47	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W2	0	0%			
14	0	51	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W3	0	0%			
15	0	63	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W3	0	0%			
16	1	72	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W3	0,01389	1,38%	0,01186	1,18%	
17	1	35	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W3	0,02857	2,86%			
18	31	36	falsche Zählung					
19	1	32	hMSCs (MEM + 0,5% FKS (Kontrolle) W3	0,03125	3,13%			
20	4	58	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W1	0,0689	6,89%			
21	3	55	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W1	0,0545	5,45%			
22	2	39	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W1	0,05128	5,13%	0,04602	4,60%	
23	0	45	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W1	0	0%			
24	2	42	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W1	0,0476	4,76%			
25	0	73	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W2	0	0%			1 ng/ml TGF-β + 0,5% FKS
26	2	85	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W2	0,0235	2,35%	0,02021	2,02%	15/742 BrdU/ Gesamtzahl
27	0	55	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W2	0	0%	0,00684	0,70%	
28	0	48	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W2	0	0%			
29	0	31	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W2	0	0%			
30	0	38	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W3	0	0%			
31	1	47	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W3	0,0212	2,12%			
32	0	45	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W3	0	0%	0,0948	0,95%	
33	1	41	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W3	0,0244	2,44%			
34	0	40	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 1 ng/ml TGF-β) W3	0	0%			
35	2	36	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W1	0,0555	5,50%			
36	8	81	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W1	0,0987	9,87%			
37	5	45	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W1	0,1111	11,11%	0,09603	9,60%	
38	5	38	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W1	0,1316	13,16%			
39	6	55	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W1	0,10909	10,91%			
40	3	47	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W1	0,0638	6,38%			
41	3	88	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W2	0,3409	3,41%			100 ng/ml Shh + 0,5% FKS
42	7	92	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W2	0,07608	7,61%	0,0759	7,59%	81/1067 BrdU/ Gesamtzahl
43	9	76	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W2	0,1184	11,84%	0,08616	8,62%	
44	6	91	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W2	0,06593	6,59%			
45	10	54	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W2	0,1851	18,51%			
46	3	40	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W2	0,075	7,50%			
47	5	105	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W3	0,0476	4,76%			
48	3	148	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W3	0,02027	2,03%	0,04321	4,32%	
49	6	71	hMSCs (MEM + 0,5% FKS + 100 ng/ml Shh) W3	0,08451	8,45%			
50	2	56	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W1	0,0357	3,57%			
51	6	66	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W1	0,0909	9,09%			
52	5	73	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W1	0,0685	6,85%	0,05946	5,95%	
53	8	101	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W1	0,07921	7,92%			
54	1	74	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W1	0,0135	1,35%			
55	3	66	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W2	0,04545	4,54%			20% FKS (Kontrolle)
56	1	85	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W2	0,01176	1,17%	0,0735	7,35%	98/1333 BrdU/ Gesamtzahl
57	8	38	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W2	0,21053	21,05%	0,08099	8,09%	
58	7	59	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W2	0,11864	11,86%			
59	7	73	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W2	0,09589	9,59%			
60	9	122	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W3	0,07377	7,38%			
61	8	155	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W3	0,05161	5,16%			
62	10	97	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W3	0,10309	10,31%	0,07788	7,78%	
63	9	96	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W3	0,09375	9,37%			
64	5	83	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W3	0,06024	6,02%			
65	9	89	hMSCs (MEM + 20% FKS (Kontrolle) W3	0,10112	10,11%			

Tabelle 4: BrdU-Inkorporation bei hMSCs mit und ohne Proteine sowie Kontrolle-Gruppe

Mikropellet-Kulturen

Mikropaliet-Kulturen		Spülen	7d inkubie. (dann Spülen) hi FL	gr. Flasche (wieder 7d)	Zellzählung	Zentrifugation	Proteingabef/ Mediumzusatz	MW (alle 3/4 Tage)
Pat.	Fraktionierung/ Nahrmedium	Spülen	7d inkubie. (dann Spülen) hi FL	gr. Flasche (wieder 7d)	Zellzählung	Zentrifugation	Proteingabef/ Mediumzusatz	MW (alle 3/4 Tage)
XXII	18.02.04/18.02.04	19.02.2004	18d 1 Probe	15.03.2004	Spilt 1 (XXII/1) am 16.03.04	MP 05.04.2004	05.04.2004	09.04./12.04./15.04./19.04./
	1/2 Proben (2x zentrifugiert)		Wachstum mäßig		3 Kulturen (Wachstum gut)	Z-Röhrchen		22.04./26.04./
XXII	18.02.04/18.02.04	19.02.2004	18d 1 Probe	15.03.2004	Spilt 2 (XXII/1) am 16.04.04	MP 23.04.2004	23.04.2004	24.04./26.04./30.04./03.05./
	1/2 Proben (2x zentrifugiert)		Wachstum mäßig		3 Kulturen (Wachstum gut)	Mega-Kultur (3 in 1)		07.05./10.05./
XXVI	11.03.04/11.03.04	12.03.2004	20d	01.04.2004	03/4/5	MP 08.04.2004	09.04.2004	12.04./16.04./19.04./23.04./
	3/6 Proben (2x zentrifugiert)		sehr gutes Wachstum		sehr gutes Wachstum			26.04./30.04./
XXVII	15.03.04/15.03.04	16.03.2004	16d	01.04.2004	03/4/5	MP 08.04.2004	09.04.2004	12.04./16.04./19.04./23.04./
	1/7 Proben (2x zentrifugiert)		sehr gutes Wachstum		sehr gutes Wachstum			26.04./30.04./
XXVII	15.03.04/15.03.04	16.03.2004	16d	01.04.2004	S1 K1-3	MP 13.05.2004	13.05.2004	16.04./30.04./
	2x zentrifugiert		sehr gutes Wachstum		sehr gutes Wachstum			alle unterhalb stehenden Kulturen wurden jeden Tag gewechselt
XXVII	15.03.04/15.03.04	16.03.2004	16d	01.04.2004	S2 K1-3	MP 13.05.2004	13.05.2004	16.04./30.04./
	2x zentrifugiert		sehr gutes Wachstum		sehr gutes Wachstum			
XXIV	02.03.04/02.03.04	03.03.2004	12d /4	15.03.2004	S2 K 0-3	MP 16.05.2004	16.05.2004	16.05.2004
	3 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		Probe 1			
XXIV	02.03.04/02.03.04	03.03.2004	12d /4	15.03.2004	S2 K 0-3	MP 16.05.2004	16.05.2004	16.05.2004
	3 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		Probe 2			
XXIV	02.03.04/02.03.04	03.03.2004	12d /4	15.03.2004	S2 K 0-3	MP 16.05.2004	16.05.2004	16.05.2004
	3 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		Probe 3			
XXV	04.03.04/04.03.04	05.03.2004	7d /6	12.03.2004	S3 K 1/2/3	MP 21.05.2004	21.05.2004	Abbruch Plizbefall am 23.05.04
	6 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		gutes Wachstum			
XXV	04.03.04/04.03.04	05.03.2004	7d /5	12.03.2004	S5 K 1-3	MP 21.05.2004	21.05.2004	21.05.2004
	6 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		gutes Wachstum			
XXV	04.03.04/04.03.04	05.03.2004	7d /6	12.03.2004	S5 K 1+2	MP 21.05.2004	21.05.2004	21.05.2004
	6 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		gutes Wachstum			
XXIV	02.03.04/02.03.04	03.03.2004	12d /3	15.03.2004	S1 K 1/2/3	MP 21.05.2004	21.05.2004	21.05.2004
	3 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		Probe 3			
XXVII	15.03.04/15.03.04	16.03.2004	16d /6	01.04.2004	S3 K 1-3	MP 21.05.2004	21.05.2004	21.05.2004
	7 Proben (2x zentrifugiert)		sehr gutes Wachstum		sehr gutes Wachstum			
XXV	04.03.04/04.03.04	05.03.2004	7d /4	12.03.2004	S4 K 1+2	MP 21.05.2004	21.05.2004	Abbruch Plizbefall am 23.05.04
	6 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		gutes Wachstum			
XXV	04.03.04/04.03.04	05.03.2004	7d /6	12.03.2004	S6 K 1-3	MP 28.05.2004	28.05.2004	28.05.2004
	6 Proben (2x zentrifugiert)		gutes Wachstum		gutes Wachstum			

Tabelle 5: Wachstum der verschiedenen hMSC-Kulturen und zeitlicher Versuchsablauf

MikroPellet-Kulturen Ergebnisse												
MP-Kultur-Nr.	Stammkultur	Beginn	Ende	ΔTage	Medium	Nassgewicht	Durchmesser (Schätzwerte)	Konsistenz	Fotos/Film	Procedere		
[1]	XXVII/6 S1 K1-3	13.05.2004	03.06.2004	21 d	DMEM+ ITS	0,0004 g	> 1 mm	mäßig fest, oval-rund	2 Fo/6.Film 200	an Stefan RT-PCR		
[2]	XXVII/6 S2 K1-3	13.05.2004	03.06.2004	21 d	DMEM+HTS+TGF-β TGF-β(5ng/ml)	0,0007 g	1 mm	mäßig elastisch, fest, rund	2 Fo/6.Film 200	an Stefan RT-PCR		
[3]	XXIV/4 S2 KD+K2 2. Probe	16.05.2004	06.06.2004	21 d	DMEM+ ITS	0,0006 g	1 mm	fest, elastisch, rund-oval	2 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[4]	XXIV/4 S2 K1+K3 2. Probe	16.05.2004	06.06.2004	21 d	DMEM+HTS+TGF-β TGF-β(5ng/ml)	0,0007 g	1 mm	fest, elastisch, rund	2 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[5]	XXIV/4 S2 K2+K3 1. Probe	16.05.2004	06.06.2004	21 d	DMEM+ ITS	0,0007 g	1 mm	weich, elastisch, oval-rund	2 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[6]	XXIV/4 S2 KD+K1 1. Probe	16.05.2004	06.06.2004	21 d	DMEM+HTS+TGF-β TGF-β(5ng/ml)	0,0006 g	> 1 mm	weich, elastisch, rund	2 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[7]	XXIV/4 S2 K2+K3 3. Probe	16.05.2004	06.06.2004	21 d	DMEM+ ITS	0,0006 g	> 1 mm	weich, elastisch, rund-oval	2 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[8]	XXIV/4 S2 KD+K1 3. Probe	16.05.2004	06.06.2004	21 d	DMEM+HTS+TGF-β TGF-β(5ng/ml)	0,0004 g	> 1 mm	weich, elastisch, rund	2 Fo/7.Film 400	nicht konserviert		
[9]	XXV/6 S3 K2 XXV/5 S5 K3	21.05.2004	04.06.2004	14 d	DMEM+ ITS	0,0005 g	~ 2 mm	sehr weich, rund-oval	3 Fo/6.Film 200	an Stefan RT-PCR		
[10]	XXV/6 S5 K1+K2	21.05.2004	04.06.2004	14 d	DMEM+HTS+TGF-β TGF-β(5ng/ml)	0,0006 g	< 1 mm	fest, elastisch, rund	2 Fo/6.Film 200	an Stefan RT-PCR		
[11]	XXIV/3 S1 K1-3	21.05.2004	04.06.2004	14 d	DMEM+ IST+SHH SHH (100ng/ml)	0,0008 g	1 mm	mittel-fest, rund-oval	3 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[12]	XXVII/6 S3 K1-3	21.05.2004	04.06.2004	14 d	DMEM+HTS+SHH SHH (100ng/ml)	0,0004 g	1 mm	mittel-fest, rund	3 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		
[13]	XXV/6 K1-3	28.05.2004	04.06.2004	7 d	DMEM+HTS+SHH SHH (100ng/ml)	0,0002 g	1 mm	sehr weich, verformbar, oval-langgezogen	3 Fo/7.Film 400	konserviert für Schnitte in Patho und Immunhisto		

Tabelle 6: Mikropellet-Kultur: Medienzusammensetzung, Gewicht, Kulturzeiträume, klinische Konsistenz der Proben

MP-Kulturen Ergebnisse der Färbungen										
Kultur-Nr.	Medium	Nr. Schmitte gemacht am	/ durch	Färbung am	/ durch	Färbungsschema/ Nachweis von	Ergebnisse	Besonderheit	Konz. AK Konz. ExAy	Ak-Einwirk- Zeit
3/	Kontrolle	1 27.08.2004	Pathologie Ffm	17.09.2004	Chris	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	2 h
		2 27.08.2004	Pathologie Ffm	17.09.2004	Chris	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	3 h
		3 27.08.2004	Pathologie Ffm	20./21.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht
		4 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		5 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		6 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		7 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		8 27.08.2004	Pathologie Ffm	27./28.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung	Negativ-Kontrolle	1 zu 50	über Nacht no und Immunhisto
		9 27.08.2004	Pathologie Ffm	27./28.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 50	über Nacht no und Immunhisto
		10 27.08.2004	Pathologie Ffm	27./28.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 50	über Nacht no und Immunhisto
4/	TGF-β	1 27.08.2004	Pathologie Ffm	17.09.2004	Chris	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	2 h
		2 27.08.2004	Pathologie Ffm	17.09.2004	Chris	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	3 h
		3 27.08.2004	Pathologie Ffm	20./21.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht
		4 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht
		5 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Einzel. AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		6 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	deutliche, ubiquitäre Braunfärbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		7 27.08.2004	Pathologie Ffm	23./24.09.2004	chris/cha	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht no und Immunhisto
		8 27.08.2004	Pathologie Ffm	27./28.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung	Negativ-Kontrolle	1 zu 50	über Nacht no und Immunhisto
		9 27.08.2004	Pathologie Ffm	27./28.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 50	über Nacht no und Immunhisto
		10 27.08.2004	Pathologie Ffm	27./28.09.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 50	über Nacht no und Immunhisto
5/	SHH	1 05.10.2004	Pathologie Ffm	06./07.10.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn Vimentin	keine klare Färbung		1 zu 10	über Nacht
		2 05.10.2004	Pathologie Ffm	06./07.10.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht
		3 05.10.2004	Pathologie Ffm	06./07.10.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht
		4 05.10.2004	Pathologie Ffm	06./07.10.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn Vimentin	keine klare Färbung		1 zu 10	über Nacht
		5 05.10.2004	Pathologie Ffm	06./07.10.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht
		6 05.10.2004	Pathologie Ffm	06./07.10.2004	chris	Paraff./Immun. f. Gefr. Schn AggreCan	keine klare Färbung		1 zu 100	über Nacht

Tabelle 7: Mikropellet-Kulturen, Immunhisto-Substrat und Antikörperkonzentration

6.3 Abkürzungsverzeichnis

AP1: Aktivatorprotein 1 (Transkriptionsfaktor)

Boc: transmembranäres Protein (Neuralrohr)

BrdU: 5'-Bromo-2'-deoxyuridin

Ca²⁺: Calcium

CDK: Cyclin-abhängige Kinase

Cdo: transmembranäres Protein (ventrale Mittellinie des Neuralrohres)

CEP 68: Chondrocyte expressed protein 68

cJun: Protein des JUN Genes

c-myc: Gen-Expression verstärkendes Gen auf Chromosom 8, welches für ein Protein codiert.

CO₂: Kohlendioxid

COX 2- Hemmer: Cyclooxygenase-2-Hemmer

CREB/ATP: cAMP response element-binding protein, ein Transkriptionsfaktor/
Adenosintriphosphat

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

E2F: Gen-Gruppe, die Transkriptionsfaktoren codieren

ERK1+2: Extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen 1+2

FKS: fötales Kälberserum

FKB BP 12: FK 506 bindende Proteine, Bindungsprotein 12

FOX: Forkheadbox-Protein, Transkriptionsfaktor

G1-Phase: GAP1 = Lücke, Zellzyklus Phase, Zeitraum zwischen Kernteilung und DNA-

Synthese

GAPDH: Glycerinaldehyd-3 Phosphat-Dehydrogenase

GAG-Seitenkette: Glucosaminoglykan Seitenketten

GC- reiche DNA-Stelle: Guanin/Cytosin reiche Desoxyribonucleinsäure-Stelle

GFAP: Glial fibrillary acidic protein, Teil der Intermediärfilamente

GS-Protein: Alpha-Anteil des G-Proteins

HEPES: Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure Puffer

HLA B27: Humanes Leukozyten Antigene B27

hMSCs: humane mesenchymale Stammzellen

HOX: Homöobox-Gene, Produktion von Transkriptionsfaktoren

IGD, KS, CS: Interglobuläre Domäne, Keratansulfat, Chondroitinsulfat

JNK: Janus Protein Kinase

in vitro: Versuche im Lebenden (Tiere, Mensch)

in vivo: Versuche an Zellen in Kultur

MAPK: Mitogen-aktivierte Protein Kinasen

MEM/D-MEM: minimales, essentielles Medium

mg: milligramm

Mg²⁺: Magnesium

MH1/2- Domäne: Teile der SMAD-Proteine, die als Mediatoren der Transkriptionsaktivität der TGF-Beta Superfamilie fungieren.

ml: milliliter

MMP: Matrix-Metallo-Protein

N-Cadherine: Transmembranöse Glykoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine

N-CAM: Neural cell adhesion molecule

NHS: Normales Pferde Serum

n-terminal: Amino-terminales Proteinkettenende

p38: mitogen-aktivierte Proteinkinase

PBS: Phosphat gepufferte Salzlösung

Peni/Strep: Antibiotikum aus Penicillin/Streptomycin

PFA: Paraformaldehyd

pH: Maß für den sauren oder basischen Gehalt einer wässrigen Lösung

PP-Röhrchen: Polypropylen-Gefäß

RGD-Sequenz: Aminosäure Sequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure

RNA: Ribonucleinsäure

R-SMAD: Rezeptor regulierte intrazelluläre Protein-Gruppe, die TGF Beta Liganden-Signale zum Zellkern bringen

RT-PCR: Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

RunX: Runt-related Transkriptionsfaktor

Shh/SHH: Sonic Hedgehog Protein

SMAD: intrazelluläre Protein-Gruppe, die TGF Beta Liganden-Signale zum Zellkern bringen

SOX 9: Transkriptionfaktor an SRY (Sex determining region Y-Box 9)

TGF-beta: transformierender Wachstumsfaktor Beta

Tris-Puffer: Trishydroxymethyl-Aminomethan, Tromethamin

Trypsin-EDTA: Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure

Kapitel 7:

Anhang

Verbrauchs-Material

Es wurde eine Vielzahl an Materialien benötigt, die hier im Einzelnen aufgelistet werden sollen. Um größtmögliche Vollständigkeit zu gewähren, wurden bei der Auflistung auch Materialien und Gegenstände aufgelistet und erklärt, die man als Verbrauchsmaterialien bezeichnen würde und die nicht zwangsläufig einer Erwähnung bedürfen.

7.1 Material

Im folgenden Abschnitt werden sowohl Festkörper/Plastikwaren und Medienzusammensetzungen, wie auch Substrate und Proteine für Versuche beschrieben.

7.1.1 Festkörper/Plastikwaren

7.1.1.1 Zellflaschen

Es wurden zwei verschiedene Größen von Zellflaschen für die unterschiedlichen Methodenschritte genutzt. Diese bestehen aus glasklarem Polystyren. Zur Anzucht wurden eher die 25 cm³- und zur Kultivierung vermehrt die 75 cm³- Flaschen genutzt. Es handelt sich um abgeflachte, sterile (strahlendesinfizierte) Flaschen, die im Liegen in Kultur genommen werden. Sie besitzen einen nach oben geknickten Flaschenhals und einen roten oder weißen Schraubverschluss am Hals, der abhängig von der Umluftzusammensetzung teils geöffnet bleiben kann oder im Schraubverschluss einen Filter besitzt.

7.1.1.2 Mehrloch-Platten

Es wurden im Rahmen der Versuche vor allem 6-Loch, 12-Loch und 24-Loch Platten genutzt. Diese bestehen aus glasklarem Polystyren und sind mit einem Deckel verschlossen. Trotzdem kann die gewünschte Umluftzusammensetzung bei nicht komplettem Verschluss des Deckels an die in Kultur befindlichen Zellen über Öffnungen gelangen. Sie haben hervorragende Eigenschaften zur Anheftung von Zellen auf der PS-Oberfläche. Sie sind weiterhin frei von DNase, RNase, humaner DNA, nicht entflammbar oder cytotoxisch. Pro Loch haben sie eine

Wachstumsfläche von 9,6 cm². Es wurden die Mehrlochplatten der Firma greiner-bio-one genutzt.

7.1.1.3 Einfrier-Röhrchen

Die Einfrier-Röhrchen wurden in den Grössen 1,8 und 3,6 ml genutzt. Es handelt sich um sterile Polypropylen Röhrchen mit Schraubkappe und weißem Schreibfeld. Diese sind speziell zur Lagerung von Zellkulturen, Bakterien und anderen Proben bei Tiefsttemperaturen entwickelt worden. Einsetzbar sind diese in Tiefkühlgeräten und ebenso in gasförmigem und flüssigem Stickstoff. Sie sind keimfrei und nicht cytotoxisch. Es wurden die Einfrier-Röhrchen der Firma VWR genutzt.

7.1.1.4 Neubauer-Zählkammer

Bei der Zählkammer handelte es sich um ein Präzisionsmessgerät, das aus einem optischen Glas zu einer Glasplatte gegossen wurde. Mit der Kammer war es möglich, Zellteilchenzahlen in einer Volumenmenge-Flüssigkeit zu bestimmen. Man unterteilte verschiedene Abschnitte auf der Zählkammer. Es befanden sich vier Längsrinnen auf der Oberfläche des Glases. Die beiden mittleren Längsrinnen wurden durch eine Querrinne miteinander verbunden. Ober- und unterhalb dieser Querrinne waren die Zählfelder. Die Zählfelder bestanden aus einem mit Diamanten geschliffenen Raster. Es gab verschieden große Vierecke. Aufgrund der ausgezählten Anzahlen an Vierecken war es möglich, Rückschlüsse auf die Zahl der Zellen in einem bestimmten Volumen Flüssigkeit mittels einer Rechnungsformel zu schließen. Um die Zahlen zu ermitteln, wurden bestimmte Größen benötigt:

1. die ausgezählten Zellen

Es war nicht unbedingt egal, wie man die Zellen zählt. Man sollte sich vor Beginn einer Zählung klar geworden sein, in welcher Art und Weise man die Zellen auszählte und welche Felder man zählt. Es empfahl sich eine Vorgehensweise in „Schlangenlinien“ von oben nach unten. Außerdem sollten die Zellen, welche gerade außerhalb der Ränder lagen, nicht mitgezählt werden.

2. ausgezählte Fläche (mm²)

Diese ergab sich aus den ausgezählten Quadraten. Ein Großquadrat entsprach zum Beispiel 1 mm².

3. Kammertiefe (mm)

Dies war vom Hersteller vorgegeben und betrug bei der Neubauer-Kammer improved 0,1 mm.

4. Verdünnungsverhältnis

Entsprechend der Volumenverhältnisse und der Verdünnung wurden Faktoren zur Berechnung mit eingefügt.

Es wurde nach folgender Gleichung gerechnet:

$$\frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung ml Volumen}} = \text{Zellen/ ml Blut}$$

Um ein entsprechend valides Zählergebnis zu gewährleisten, wurden häufig alle 8 Groß-Quadrate in der Zählkammer ausgezählt.

Nach der Zählung wurde das Deckglas von der Kammer genommen und sowohl Kammer als auch Deckglas mit destilliertem Wasser und Alkohol abgespült.

Da die Zellkammern von Hersteller zu Hersteller unterschiedlich sind, sollte man sich immer die verschiedenen Maße genau anschauen.

7.1.2 Medien

7.1.2.1 Minimal Essential Medium

Die Basis der Zellversuche stellte das „Minimal Essential Medium“ dar. Hierbei handelt es sich um ein Basismedium fast ohne Zusätze.

Zusammensetzung: Wasser, Earl's Salze ohne L-Glutamin und Natrium-Bikarbonat, steril filtriert und für Zellkulturen getestet.

Notwendige Zusätze wurden in den empfohlenen Mengen oder variierten Dosen dem Medium hinzugegeben.

7.1.2.2 Dulbecco`s Modifiziertes Essentielles Medium

Ein durch z.B. die Firma Sigma-Aldrich hergestelltes und vertriebenes Standard-Medium mit physiologischen Zusätzen zur Zellkultivierung

Zusammensetzung: Wasser, Earl`s Salze ohne L-Glutamin, mit 1000 mg/l Glucose und Natrium-Bikarbonat, Pyridoxin-HCl, steril filtriert, auf Endotoxine getestet, für Zellkulturen getestet.

Notwendige Zusätze wurden in den empfohlenen Mengen oder variierten Dosen dem Medium hinzugegeben.

7.1.2.3 Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)

Dieses Medium wurde vor allem im Rahmen der Zellwasch- und –reinigungsschritte genutzt, ein im Rahmen der Zellkulturpflege notwendiger und kaum ersetzbarer Basis-Puffer.

Zusammensetzung: Wasser, Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert, Endotoxin getestet, für Zellkulturen getestet.

7.1.2.4 Dichtegradient Ficoll-Paque™ Plus

Ficoll-Paque Plus ist ein Standard-Dichtegradient zur Isolation von Lymphzyten. Im Rahmen der Versuche wurde er zur suffizienten Isolation der mesenchymalen Stammzellen genutzt.

Es handelt sich um ein steriles Fertigprodukt zur Isolation aus dem peripheren Blut unter Nutzung von Zentrifugen bei verschiedenen Geschwindigkeiten. Die separierten Zellen verlieren ihre Vitalität durch den Dichtegradienten nicht.

7.1.3 Substrate

7.1.3.1 Fötale Kälberserum (FBS)

Fötale Kälberserum ist ein vielgenutzter Medium-Zusatz, der eine Vielzahl an zum Teil nicht definierten Nährstoffen, Wachstums- und Adhärenz-Faktoren für die Zellen in Kultur zur Verfügung stellt. Zusätzlich verhindert es die Zerstörung der Zellen durch oxidativen Stress oder Apoptose im Vergleich zu FBS freien Medien. FBS wird auf Endotoxin und Hämoglobin getestet.

7.1.3.2 Penicillin/Streptomycin

Dies ist der antibiotische Standard-Medienzusatz zur Kontrolle von bakterieller Kontamination. Gelöst in Zitrat-Puffer wird er in einer Konzentration von 10 ml/l als Zugabe empfohlen.

7.1.3.3 Trypsin-EDTA

Trypsin-EDTA Lösung wird vor allem zum Ablösen von adhären Zellen von Oberflächen genutzt. Die Konzentrationen werden je nach Zelltyp und der Stärke der Zelladhärenz unterschiedlich gewählt und reichen von 0,025% bis 0,5%.

7.1.3.4 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU)/ Anti-BrdU

BrdU ist die Abkürzung für die Substanz 5-bromo-2-deoxyuridine. Es handelt sich hierbei um ein Analogon des DNA-Bausteins Thymidin. Die chemische Formel ist $C_9H_{11}BrN_2O_5$. In der Abbildung sieht man die chemische Struktur schematisch dargestellt. Der Schmelzpunkt liegt bei 191-194°C. BrdU ist ein gesundheitsgefährdender Stoff, der nach Möglichkeit nicht mit Haut oder Schleimhaut in Kontakt kommen sollte. BrdU wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich für den Nachweis von Zellwachstum in Stammzellen im Rahmen eines Assays genutzt. Das ist möglich, wenn BrdU in ausreichenden Konzentrationen zu den sich in Wachstumsmedien befindenden Zellen gegeben wird. Durch die Ähnlichkeit zum Thymidin wird bei der Neusynthese von Zellkern- oder mitochondrialer DNA das BrdU teilweise anstelle des Thymidins eingelagert und kann später mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Reaktion detektiert werden.

Der gegen BrdU gerichtete Antikörper heißt Anti-BrdU. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der in Mäusen produziert wurde. Er lag in einer Konzentration von 1,5 mg/ml.

Es handelt sich um ein gereinigtes Immunglobulin, welches in wässriger Lösung gepuffert wurde. Die Lösung bestand aus 0,01 M Phosphat-gepufferter Salzlösung mit 15 mM Natriumazid. Der pH wurde bei 7,4 eingestellt. Er war in der Lage, spezifisch BrdU in Zellkernen zu detektieren. Das galt auch für konservierte Gewebeoberflächen.

7.1.3.5 Alzian-Blau

Bei dem Reagens Alzian-Blau handelt es sich um einen Farbstoff zum Nachweis saurer Mucopolysaccharide. Die Alzian-Farbstoffe gehören zur Gruppe der Kupferphthalocyanine; sie verbinden sich über Salzbrücken mit den Polyanionen der sauren Mucopolysaccharide. Bei der Methode mit pH 2,5 wird der Farbstoff mit einer Natriumtetraborat-Lösung in das Pigment Monastral Blau umgewandelt. Dieses Pigment ist unlöslich und eignet sich somit für weitere Handhabungen, ohne sich im Gewebe zu verbreiten (z.B. Alzianblau – PAS-Färbung). Die Polyanionen, mit denen das Alzianblau reagiert, bestehen aus Schwefel- und Carboxyradikalen (die Phosphatradikalen der Nukleinsäuren reagieren nicht), folglich reagieren nur die sauren Muzine.

7.1.3.6 Vimentin/ Anti-Vimentin

Das Typ 3-Intermediärfilament-Protein Vimentin aus der Gruppe der Desmine (hierzu gehören auch das saure Gliafaserprotein (GFAP)) ist Teil des Zellskeletts der Wirbeltiere. Es ist Bestandteil im Zytoplasma (teilweise auch im Nucleolus) aller Zellen mesenchymaler Herkunft von z. B. Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Chondrozyten, Osteozyten, Endothelzellen oder weißen Blutkörperchen. Die Molekülmasse humanen Vimentins beträgt 53.689 Dalton.

Die Funktion des Vimentins im menschlichen Organismus ist nicht endgültig geklärt. Als Marker wird es in der Diagnostik für Sarkome und Weichteiltumor genutzt, aber auch für die Darstellung von Zellen mesenchymalen Ursprungs.

Der Antikörper Anti-Vimentin wird aus Ratten, Mäusen, Hasen und dem Menschen gewonnen. In den Versuchen wurde zur Darstellung der endogenen Spiegel von Vimentin der am Menschen gewonnene Antikörper genutzt. Er wird häufig für indirekte ELISA- und Western Blot –Untersuchungen gebraucht. Der polyklonale Antikörper wird gebrauchsfertig von den Vertreiberfirmen bereitgestellt. In den durchgeführten Versuchen wurde eine Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Der Antikörper kann zum unspezifischen Nachweis der oben genannten mesenchymalen Zelltypen genutzt werden. Es wird dabei die nicht-konjugierte Form gebraucht.

7.1.3.7 Aggrecan/ Anti-Aggrecan

Aggrecan ist Bestandteil des menschlichen Knorpels. Man findet es dort als große multimolekuläre Konglomerate. Hier finden nicht-kovalente Bindungen mit anderen Monomeren statt. Am n-terminalen Ende des Proteins findet sich ein Glykoprotein-Anteil, welcher die Stabilisierung des Proteins ermöglicht. Aufgrund von 90% GAG-Seitenketten, die angelagert sind, formiert sich das Aggrecan zu dem aktuell größten im menschlichen Körper nachgewiesenen Protein-Komplex. Die GAG Seiten beinhalten Keratansulfat- und Chondroitinsulfat-Ketten. Aggrecan besteht aus 3 globulären Anteilen (G1, G2 und G3) sowie 3 erweiternden Anteilen (IGD, KS, CS). Jedes Aggrecan besteht aus etwa 100 Chondroitinsulfat-Ketten, welche ein atomares Gewicht von je 20 kDa besitzen.

Der Antikörper Anti-Aggrecan wird aus Ratten, Mäusen, Hasen und dem Menschen gewonnen. In den Versuchen wurde zur Darstellung der endogenen Spiegel von Aggrecan der am Hasen gewonnene Antikörper genutzt. Er wird häufig für immunhistochemische Untersuchungen oder den Western Blot gebraucht. Der polyklonale Antikörper wird gebrauchsfertig von den Vertreiberfirmen bereitgestellt. In den durchgeführten Versuchen wurde eine Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Der Antikörper kann zum spezifischen Nachweis von Aggrecan an den Zelloberflächen genutzt werden. Es wird dabei die nicht-konjugierte Form gebraucht.

7.1.3.8 Trypanblau

Das Trypanblau-Molekül ist vorwiegend als Tetranatriumsalz im Handel und in der Anwendung, bei dem alle vier Sulfonsäuregruppen dissoziiert vorliegen. Trypanblau wird in der Mikrobiologie und in der Zellkultur für die Bestimmung der Zellviabilität von Zellen verwendet. Die Substanz wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, abgestorbene und perforierte Zellen nehmen dagegen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt. Man kann aus der Nichtaufnahme des Farbstoffes auf den Zustand der Zellmembran und nicht auf die Funktionstüchtigkeit des Zellinneren schließen. Trypanblau bindet an Proteine. Wegen der Zytotoxizität von Trypanblau muss die Auswertung unmittelbar nach der Zugabe des Farbstoffes erfolgen.

Trypanblau ist teratogen, was erstmals 1948 erkannt wurde. Später wurden zudem die krebserregenden Eigenschaften von Trypanblau festgestellt, die im Wesentlichen auf das Metabolisierungsprodukt Tolidin zurückzuführen sind.

Der Name leitet sich von der Eigenschaft des Trypanblaus ab, Trypanosomatida abzutöten.

7.2 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Erlangung der Promotion vorgelegten Dissertationsschrift mit dem Titel „Einfluss von Sonic Hedgehog Protein (rekombinant, n-terminal) auf das Wachstum und die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in invitro-Kulturen“ in der orthopädischen Universitätsklinik –Friedrichsheim-, unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. A.A. Kurth mit Unterstützung durch Dr. med. J. Warzecha und PD Dr. med. B. Habermann, ohne weitere Hilfen, außer die in der Promotionsschrift angegebenen Hilfsmittel und Literatur, bei der Abfassung meiner Arbeit genutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- noch ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung der Promotionsarbeit erbeten.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht (weder durch mich noch andere).

Die vorliegende Arbeit wurde im Zusammenhang in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Journal of Orthopedic Sciences, 2006, 11: pp. 491-496 (Japan).

Bad Vilbel, den 09.07.2019

Christian Brüning

7.3 Danksagung

Datenschutz

7.2 Lebenslauf

Name: Christian Rüdiger Brüning
Geboren: 14.04.1977
Geburtsort: Frankfurt am Main
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter, 1 Sohn

Schulische Ausbildung: 1983-86 Grundschule Bad Vilbel
1986-93 Unterstufe und Mittelstufe an der Anna-Schmidt-Schule in Ffm- Nieder-Erlenbach
1993-96 Oberstufe an der Anna-Schmidt-Schule in Frankfurt/Main
7.96 Abitur
9.96-6.97 gesetzlicher Grundwehrdienst

Studium: 4.98-11.06 Humanmedizin an der Goethe-Universität Frankfurt am Main

Berufliche Tätigkeit: 1.07-7.07 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Angestellter in der orthopädischen Klinik, Stiftung Friedrichsheim; Universitätsklinik Frankfurt am Main bei Prof. Dr. A. Kurth.
8.07-7.09 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Angestellter in der unfallchirurgischen Klinik; Universitätsmedizin Mainz am Rhein bei Prof. Dr. P.-M. Rommens, Ableistung des Common Trunc im Rahmen der ärztlichen Weiterbildung.
8.09-7.11 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Angestellter in der unfallchirurgischen Klinik und des muskuloskelettalen Zentrums; Universitätsmedizin Mainz am Rhein bei Prof. Dr. P.-M. Rommens und Prof. Dr. A. Kurth; Rotation im Rahmen der Fortbildung in die orthopädische Klinik ab 04.2010
8.11.-2.13 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Angestellter in der unfallchirurgischen Klinik und des muskuloskelettalen Zentrums; Universitätsmedizin Mainz am Rhein bei Prof. Dr. P.-M. Rommens und Prof. Dr. A. Kurth; Rotation im Rahmen der Fortbildung in die orthopädische Klinik.
ab 03.13 Assistenzarzt und Angestellter in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Frankfurt am Main bei Prof. Dr. R. Hoffmann.
ab 03.16 Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie
ab 03.17 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin und Tätigkeit als Notarzt

Publikationen:

2006: Warzecha J, Göttig S, Brüning C, Lindhorst E, Arabmothlagh M, Kurth A. Sonic hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. J. Ortho Sci; 11 (2006), pp. 491-496

2007: Warzecha J, Göttig S, Chow KU, Brüning C, Percic D, Boehrer S, Brude E, Kurth A. Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the Hedgehog-inhibitor cyclopamine. J Chemother. 2007 Oct;19(5): pp. 554-61.

2009: Hofmann A, Mattyasovszky SG, Brüning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, Rommens PM. Osteoblasts: Cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing. Orthopäde 2009, Oct

15.

2010: Aust J, Brüning C, Kurth A. Metachronous multifocal osteosarcoma: two case reports and literature review. Osteologie; 19(2010), 4: pp. 346-353.

Poster:

2005: J. Warzecha, C. Brüning, A. Zambon-Bertoja, E. Lucarelli, A. Kurth.
„Three dimensional cartilage formation in mesenchymal stem cells under the influence of Sh-protein.“
Bologna, 2005

2007: C. Brüning, J. Warzecha, S. Göttig, K. Chow, D. Percic, S. Boehrer, A. Kurth
„Inhibition of primary bone tumor cell proliferation by a hedgehog pathway inhibitor“, ORS,
Chicago, 2007

Bad Vilbel, den 09.07.2019