

Aus der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Norbert R. Kübler

Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Malin Johanna Roeb

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Handschel

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Giers

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	II
2	Einleitung.....	1
2.1	Zellbasierte Knochenregenerationsstrategien	3
2.2	Einteilung der versch. Zellarten für Tissue Engineering von Knochen	4
2.3	Knochenbildung.....	8
2.4	Mikromassen.....	10
2.5	Biomaterialien.....	11
2.6	Ziel der Arbeit.....	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Materialliste	14
3.2	Zellen	18
3.3	Herstellung und osteogene Differenzierung von USSC-Mikromassen	19
3.4	Knochenbildung <i>in vivo</i>	19
3.4.1	Versuchstiere	20
3.4.2	Versuchsaufbau und chirurgisches Vorgehen.....	20
3.4.3	Versuchsdurchführung	22
3.4.4	Versuchsauswertung.....	25
4	Ergebnisse	28
4.1	Radiologische Ergebnisse.....	28
4.2	Histologische Ergebnisse	32
4.2.1	Detektion von Osteocalcin.....	33
4.2.2	Masson-Goldner-Färbung	37
4.3	Laborchemische Ergebnisse	40
5	Diskussion.....	41
5.1	Calciumhydroxylapatitbildung.....	41
5.2	Osteocalcinbildung	43
5.3	Osteoidbildung	44
5.4	Klinische Bedeutung des Tissue Engineering mit USSCs.....	45
5.5	Vergleich zwischen USSCs und USSC-Mikromassen.....	47
6	Zusammenfassung.....	50
7	Literaturverzeichnis	III
8	Anhang.....	XIV
9	Danksagung	XVIII
10	Lebenslauf	XIX

1 Abkürzungsverzeichnis

ADPC	Adipose tissue derived progenitor cells
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMDPC	Bone marrow derived progenitor cells
BMP-2	Bone morphogenic protein 2
BMP-7	Bone morphogenic protein 7
β-TCP	β-Tricalciumphosphat
CaHa	Calciumhydroxylapatit
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomograph
DAB	3,3'Diaminobenzidine
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + β-Glycerophosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ECM	Extrazellulärmatrix
ESC	Embryonale Stammzelle
HLA	Human Leukocyte Antigene
HNA	Human nuclear antigen
ICBM	Insoluble collagenous bone matrix
i.p.	Intraperitoneal
MPC	Mesenchymale Progenitorzellen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PDPC	Periost derived progenitor cells
PGA	polyglycolic acid copolymer
PLA	polylactic acid copolymer
RNU	Rowett nude rat (T-Zell-defiziente, athymische Ratte)
S1	Sicherheitsstufe 1
USSC	Unrestricted somatic stem cell (Nabelschnurblutstammzelle)
VEGF	Vascular endothelial growth factor

2 Einleitung

Defekte im Bereich des Kiefer- und Gesichtsskeletts können durch diverse Ursachen entstehen. Häufig sind Traumata infolge von Unfällen und chirurgisch herbeigeführte Resektionen im Rahmen einer Malignomtherapie. Aber auch der natürliche Alterungsprozess und die damit verbundene Knochenatrophie spielen in unserer immer älter werdenden Gesellschaft eine zentrale Rolle [Panetta et al., 2009]. Daten aus den USA zeigen, dass jährlich 275.000 Knochentransplantationen vorgenommen werden. Hinzukommen weitere 30.000 Rekonstruktionen im Gesichtsbereich. Insgesamt belaufen sich die Operationen, die sich mit Knochenheilung befassen, in den USA auf über eine Million pro Jahr. [Langer et al., 1993].

Defekte im Bereich des Kiefers oder des Gesichts bedeuten nicht nur eine Funktionseinschränkung, sondern oft auch eine ästhetische Beeinträchtigung für den Patienten. Es ist folglich eine wesentliche Aufgabe der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, sowohl Funktion als auch Ästhetik für den Patienten wiederherzustellen.

In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem Konzeptwandel bei der Behandlung von Knochendefekten im Kiefer- und Gesichtsbereich weg von den rein resizierenden hin zu den rekonstruktiven Verfahren. Diese Verfahren zielen neben der Resektion auf die Wiederherstellung der ursprünglichen Form des Knochenskeletts - und damit teilweise auch dessen Funktion - ab. Zu Beginn der Anwendung dieser rekonstruktiven Verfahren wurden Materialien wie Polyurethane [Leake et al., 1976] Metalloxid-Keramiken [Binderman et al., 1990; Frenkel et al., 1975] oder Polymethylmetacrylate [Pochon et al., 1991] als Ersatzkomponenten verwendet. Da es sich hierbei um artifizielle Materialien handelt, mussten entsprechende Nachteile in Kauf genommen werden, wie beispielsweise Fremdkörperreaktionen und Infektionen, die bis zum Implantatverlust führen können [Schwenzer et al., 2002; Panetta et al., 2009]. Zusätzlich traten auch strukturelle Schwächen einzelner Materialien auf [Panetta et al., 2009]. Beispielsweise liegt der größte Nachteil von Keramiken in ihrer nicht ausreichenden individuellen Anpassungsfähigkeit [Horch, 1998]. Trotzdem werden diese Verfahren teilweise auch heute in der Klinik noch angewendet.

Um langfristige Therapieerfolge verzeichnen zu können, findet die Tatsache, dass ossäres Gewebe dynamischen Prozessen unterliegt, inzwischen mehr und mehr

Beachtung. In Abhängigkeit des Grades der Beanspruchung kommt es zu Knochenauf- beziehungsweise -abbau. Auch die Knochenneubildung beruht auf dem Remodelingpotential des Knochens beziehungsweise seiner Zellen. Dabei werden die verschiedenen Komponenten des Knochenskeletts dazu angeregt, Umbauprozesse so in Gang zu setzen, dass es optimalerweise zur *Restitutio ad integrum* kommt. Als klassisches Beispiel sei hierfür die Knochenheilung nach Fraktur zu nennen [Rodan, 1992]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden vermehrt autologe Knochentransplantate in der Therapie von Knochendefekten eingesetzt. Der Vorteil einer autologen Transplantation gegenüber artifiziellen Materialien besteht vor allem in den lebenden Zellen, die im Transplantat enthalten sind. Diese unterstützen nicht nur die Heilung, sondern ermöglichen den Transplantaten gleichzeitig die Fähigkeit, sich an die lokalen Begebenheiten und die mechanische Beanspruchung anpassen zu können. Ein weiterer, nahe liegender Vorteil besteht darin, dass die materialspezifischen unerwünschten Nebeneffekte wegfallen. Somit kann die autologe Transplantation heute als „Gold-Standard“ bezeichnet werden [Pretorius et al., 2005].

Allerdings weisen auch diese Verfahren Nachteile auf. Neben der zusätzlichen Morbidität für den Patienten, die aufgrund der Gewebeentnahme entsteht (Donordefekt), ist auch die quantitative Limitation als ein entscheidender Nachteil zu nennen [Nkenke et al., 2001; Nkenke et al., 2004; Sasso et al., 2005; Perry 1999; Fernyhough et al., 1992; Heary et al., 2002]. Außerdem kann es bei autologen Transplantaten zu einem Volumenverlust kommen. So zeigten Smolka et al., dass es bei Transplantaten aus der Kalotte, die zur Behandlung von Maxillaatrophie verwendet wurden, nach einem Jahr zu Volumenverlusten zwischen 16,2 und 19,2 % gekommen ist [Smolka et al., 2006]. Andere Arbeiten weisen sogar eine Volumenverlustrate von 36 – 40 % bei Transplantaten auf, die aus der Crista iliaca gewonnen wurden [Johansson et al., 2001]. In einer weiteren Studie von Smolka zu Maxilla- und Gesichtsrekonstruktionen mit verschiedenen autologen Transplantationsansätzen traten bei 39 % ein totaler Transplantatverlust und bei weiteren 22 % ein partieller Transplantatverlust auf [Smolka et al., 2005].

Aus diesem Grund hat die Forschung in den letzten Jahren nach alternativen Möglichkeiten gesucht, Knochendefekte zu heilen. In den Mittelpunkt gerückt sind nun zellbasierte Knochenregenerations- und Knochenrekonstruktionsansätze, bei denen die vitalen Zellen von Bedeutung sind, die die Wiederherstellung der

Gewebeintegrität unterstützen [Langer et al., 1993].

2.1 Zellbasierte Knochenregenerationsstrategien

Grundsätzlich gibt es drei Formen der zellbasierten Knochenregenerationsstrategien

- I. das klassische Knochentransplantat
- II. die *In-situ*-Aktivierung von ortständigen Zellen
- III. Tissue Engineering

Wie bereits oben erwähnt, stellt das klassische Knochentransplantat derzeit den „Gold-Standard“ in der Therapie von Knochendefekten dar. Dabei werden die Zellen und das Gewebe en bloc transplantiert. Dadurch hat das Transplantat von Beginn an eine ausgeprägte mechanische Stabilität und enthält neben den Zellen bereits alle benötigten organischen und anorganischen Bestandteile. Der Vorteil liegt darin, dass die Umbauprozesse, auch ‚remodeling‘ genannt, dadurch schnell ermöglicht werden. Die Nachteile liegen, wie bereits oben erwähnt, darin, dass der Patient sich einem Zweiteingriff unterziehen muss und zur Transplantation auch nur ein begrenztes Knochenreservoir genutzt werden kann.

Bei der *In-situ*-Aktivierung werden ortständige Zellen, das heißt die Zellen, die den defekten Bereich umgeben, durch Stimulation zur Knochenneubildung angeregt. Stimuli können dabei unterschiedlicher Art sein. Meyer et al. beschreiben die Knochenneubildung durch Dehnungsreize bei der Distraktionsosteogenese [Meyer et al., 1999a, 1999b]. Weitere Möglichkeiten sind elektromechanische Reize [Aaron et al., 2004; Markaki et al., 2004] und die Stimulation durch Zytokine (z.B. BMP-2 [Kübler et al., 1998], BMP-7 [Terheyden et al., 2001] oder BMP-2-Mutanten [Depprich et al., 2005]). Von Vorteil ist bei dieser Methode, dass kein Spenderknochen benötigt wird. Allerdings lassen sich große Defekte durch dieses Vorgehen nicht rekonstruieren. Des Weiteren kann die *In-situ*-Aktivierung gerade in der Malignombehandlung problematisch sein, da die ortständigen Zellen durch eine adjuvante Radiatio geschädigt worden sein können und folglich nicht mehr zur Osteogenese fähig sind beziehungsweise durch Reize nicht länger zur Osteogenese stimuliert werden können [Holmes et al., 2002].

Tissue Engineering bezeichnet ein „Verfahren der In-vitro-Vermehrung autogener

Zellen (z.B. Chondrozyten, mesenchymale Stammzellen) zum Gewebeersatz mit oder ohne (dreidimensionale) Matrix“ mit „anschließende[r] Replantation der Zellen“ [Pschyrembel®, 2007]. Dabei können Zellproliferation und –differenzierung gegebenenfalls durch Zugabe von Wachstumsfaktoren beeinflusst werden [Pschyrembel®, 2007]. Tissue Engineering ist folglich eine Methode, bei der Zellen *in vitro* in einer Matrix (Biomaterial) kultiviert werden, um anschließend das gewonnene Gewebekonstrukt zu transplantieren. Ein entscheidender Vorteil liegt darin, dass nicht nur Zellen zur Knochenbildung generiert werden, sondern sich auch Endothelzellen zur Blutgefäßbildung entwickeln. Dies ist zur Ossifikation nötig, da nicht vaskularisierte Osteozyten fibrosieren und damit keinen Knochen bilden können [Panetta et al., 2009].

Man hofft, durch das Tissue Engineering in Zukunft nicht nur unterschiedliche Gewebe erzeugen, sondern auch komplexe Strukturen für den gesamten Körper generieren zu können [Meyer et al., 2005a]. Im Bereich des Tissue Engineering steckt die Forschung zurzeit noch in ihren Anfängen. Sicher ist, dass der Erfolg dieser Vorgehensweise von den verwendeten Materialien abhängt. Die drei Hauptbestandteile, aus denen sich das Tissue Engineering aufbaut, sind die Zellen [Handschel et al., 2006], Wachstumsfaktoren [Kübler et al., 1998; Depprich et al., 2005] und die Matrix [Handschel et al., 2002; Wiesmann et al., 2004].

Die Vorteile des Tissue Engineering liegen auf der Hand: Die Knochenentnahme und die damit verbundenen Belastungen für den Patienten entfallen. Darüber hinaus ist es von großem Nutzen, wenn das Knochengewebe *in vitro* generiert werden kann, da man so nicht auf ein limitiertes Reservoir angewiesen ist und auch große Defekte behandelt werden können.

2.2 Einteilung der verschiedenen Zellarten für Tissue Engineering von Knochen

Zellen, die für das Tissue Engineering gewonnen werden, können autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs sein. Diese Zellen kann man je nach ihrem Differenzierungspotential einteilen in totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Zellen. Totipotente Zellen haben *per definitionem* die Fähigkeit, sich nicht

nur in Zellen aller drei Keimbahnlinien zu differenzieren sondern auch die Fähigkeit, einen komplexen Organismus zu generieren. Dies unterscheidet sie von den pluripotenten Zellen, die sich auch in Zellen jeglicher Keimblätter differenzieren, aber keinen komplexen Organismus bilden können. Die multipotenten Zellen besitzen ein eingeschränktes Differenzierungspotential. So hat die Differenzierung in eines der drei Keimblätter bereits stattgefunden und es können sich nur noch die Zellen, die aus diesem Keimblatt hervorgehen, entwickeln. Die unipotenten Zellen sind bereits endgültig determiniert und haben damit keine Möglichkeit zur Differenzierung.

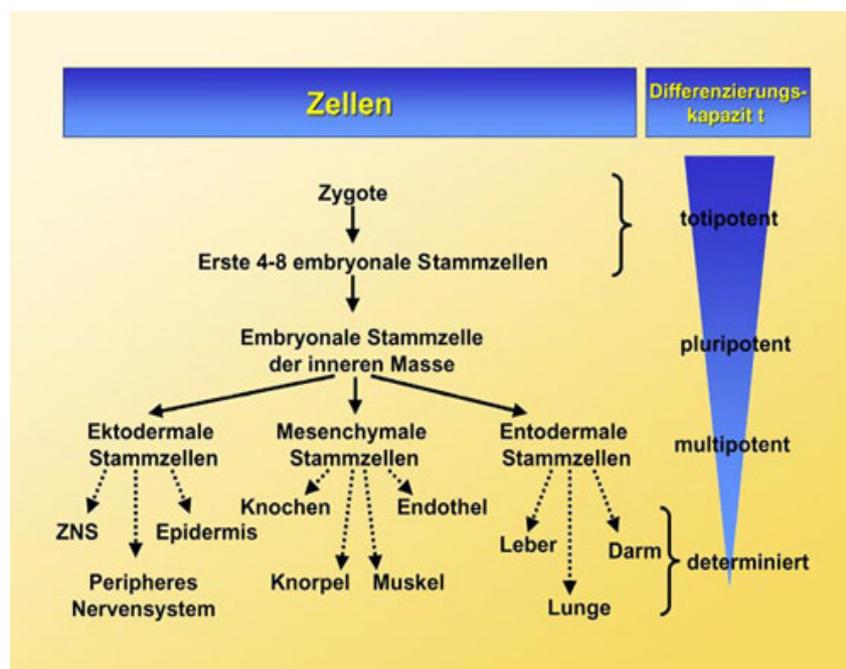


Abb. 1: Differenzierungskaskade [Naujoks et al., 2008].

Im Rahmen des osteogenen Tissue Engineering können Zellen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden eingesetzt werden. Neben bereits determinierten Osteoblasten werden auch mesenchymale Progenitorzellen (MPCs) im Sinne von multipotenten Zellen verwendet. Diese Zellen können beispielsweise aus Periost, Knochenmark oder Fettgewebe gewonnen werden [Pittenger et al., 1999; Moosmann et al., 2005; Covas et al., 2005; In't Anker et al., 2004, Wulf et al., 2004, Seo et al., 2004; Ng et al., 2005; Sakaguchi et al., 2004]. Auch wenn die Entnahme dieser Zellen eine nur geringe Belastung für den Patienten darstellt, ist der Nachteil dieser Methode deren relativ aufwändige Gewinnung. So findet sich zum Beispiel in einem Knochenmarksaspirat nur eine MPC unter 100.000 Zellen [D'Ippolito et al., 1999; Quarto et al., 1995]. Verglichen mit den pluripotenten Stammzellen weisen die MPCs

eine limitierte Kapazität für Zellteilungen und damit ein begrenztes Selbsterneuerungspotential auf [McCulloch et al., 1991]. Ein weiteres Problem, das ältere Patienten betrifft, ist, dass mit zunehmendem Lebensalter die Proliferationsrate und die Differenzierungskapazität nachlassen [D'Ippolito et al., 1999; Quarto et al., 1995; McCulloch et al., 1991]. Da Knochendefekte aber häufig erst im höheren Alter auftreten, kann dies ein entscheidendes Problem bei der knöchernen Rekonstruktion darstellen.

Die seit wenigen Jahren verwendeten embryonalen Stammzellen (ESCs) [Heng et al., 2004; zur Nieden et al., 2005] oder Nabelschnurblutstammzellen (USSCs = Unrestricted somatic stem cells) [Kögler et al., 2004] zählen zu den toti-beziehungsweise pluripotenten Zellen und weisen folgende Vorteile auf: Sie haben ein hohes Erneuerungspotential und aufgrund allogener beziehungsweise xenogener Transplantation entfällt die Entnahmemorbidität für den Patienten.

Verglichen mit ESCs weisen die USSCs sowohl weniger rechtliche Einschränkungen als auch weniger ethische Vorbehalte auf. Die ethische Diskussion über die embryonale Stammzellforschung beschäftigt sich mit der Frage, ob die mögliche Therapie für einen kranken Menschen als höherwertig anzusehen ist als das Leben des Embryos. In einer utilitaristischen Argumentation wird das Gemeinwohl, in dem Fall die Option auf Erforschung einer Therapie, die vielen Menschen helfen könnte, über das Wohl des Einzelnen, des Embryos, gestellt [Cogle et al., 2003]. Dem gegenüber stehen das Recht auf Leben wie auch der Schutz der Menschenwürde, die die Forschung an embryonalen Zellen verbieten (Artikel 1 und 2 des Grundgesetzes für die Bundesrepublik Deutschland). Aus diesem Grund ist in Deutschland die Forschung mit embryonalen Zellen durch das aus dem Jahre 1991 stammende Embryonenschutzgesetz (ESchG) geregelt. Dieses Gesetz verbietet jede verbrauchende Forschung an Embryonen (ESchG §2 Absatz 1).

Doch nicht nur aufgrund der geringeren ethischen Bedenken und der rechtlichen Bestimmungen in Deutschland scheinen die USSCs einen Vorteil gegenüber den ESCs zu bieten. Im Tierexperiment zeigte Trounson eine erhöhte Zahl von Teratomen und Teratokarzinomen bei Transplantationen von ESCs [Trounson, 2002]. Man kann also maligne Entartungen nach Transplantation von ESCs nicht ausschließen, auch wenn Zhang et al. in *In-vivo*-Untersuchungen keine Entartungen zeigen konnten [Zhang et al., 2001]. Studien über USSCs zeigten bislang kein Entartungspotential. So konnten Kögler et al. 2004 im Schafsmodell keine

Teratombildung feststellen, ebenso wenig wie Mann im Jahr 2007 in einer Arbeit über das Differenzierungspotential von USSCs [Mann, 2007].

Darüber hinaus fanden Jäger et al. heraus, dass USSCs während der osteogenen Differenzierung vermehrt VEGF und weitere Marker, die auf Angiogenese hinweisen, sezernieren [Degistirici et al., 2008]. Das ist ein weiterer Vorteil der Nabelschnurblutstammzellen, da, wie oben erwähnt, das Vorhandensein von Blutgefäßen zur Versorgung der sich entwickelnden Osteozyten nötig ist.

Ein häufiger Nachteil bei allogenen Transplantationen stellen Abstoßungsreaktionen dar. Dies scheint für USSCs eingeschränkt zu gelten. In bisherigen Studien zeigte sich eine nur geringe Immunogenität für diese Zellen [Benito et al., 2004; Bradstock et al., 2006; Kleen et al., 2005]. Bereits jetzt werden in der Hämato- und Onkologie USSCs erfolgreich zur Leukämietherapie eingesetzt [Rocha et al., 2007]. Dabei zeigen sich auch bei nicht HLA-identischer Transplantation nur wenige Fälle einer Abstoßung [Benito et al., 2004].

Beim Tissue Engineering von Knochen werden allerdings nicht nur die bisher genannten natürlich vorkommenden Zellen, sondern auch genetisch modifizierte Zellen verwendet. Handschel et al. teilen die Zellen, wie in der folgenden Tabelle gezeigt, ein.

Tab. 1: Einteilung von Zellen für das Tissue Engineering von Knochen. ADPC = Progenitorzellen aus Fettgewebe, BMDPC = Progenitorzellen aus Knochenmark, PDPC = Progenitorzellen aus Periost [Handschel et al., 2006].

Natürlich vorkommende Zellen	Genetisch modifizierte Zellen
<p>Toti- und Pluripotente Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Embryonale Stammzellen (ESCs) • Nabelschnurblutstammzellen (USSCs) 	<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarkom Zelllinien • Immortalisierte Zelllinien <ul style="list-style-type: none"> ○ spontan ○ transformiert • Nicht transformierte clonale Zelllinien
<p>Multipotente Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • ADPC • BMDPC • PDPC • Progenitorzellen aus Gefäßwänden • Progenitorzellen aus Plazenta 	
<p>Unipotente Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Präosteoblasten • "Lining cells" • Osteoblasten • Osteocyten 	

2.3 Knochenbildung

Es gibt zwei Arten der Knochenbildung. Man unterscheidet die desmale von der chondralen Osteogenese. Bei der desmalen Knochenbildung entsteht das Knochengewebe direkt aus den mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren. Sie wird deswegen auch als direkte Osteogenese bezeichnet. Bei der chondralen oder indirekten Osteogenese entsteht Knochengewebe über einen Zwischenschritt. Hier wird zuerst Knorpel gebildet, der dann in Knochen umgewandelt wird [Welsch, 2006].

Knochen ist ein besonders hartes, hoch differenziertes und spezialisiertes Stützgewebe. Es besteht aus einem organischen und einem anorganischen Anteil. Der organische Anteil macht etwa 20 % der Knochenmasse aus und besteht vorwiegend aus Kollagen I. Nur 10 % machen nicht-kollagene Proteine wie

Proteoglykane, Osteonectin, Osteopontin, Bone-Sialoprotein, Matrix-GLA-Protein und Osteocalcin aus. Den weitaus größeren Anteil (80 %) der Knochensubstanz bilden die anorganischen Bestandteile. Sie bestehen hauptsächlich aus Calciumphosphaten und einem relativ geringen Anteil an Wasser [Löffler et al., 2003].

Im Knochengewebe finden sich zwei Zellreihen: zum einen die Osteoblastenreihe, die sich aus mesenchymalen Stammzellen entwickelt - zu dieser Zellreihe gehören die Proosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten - , zum anderen die Osteoklasten, die sich aus monozytären Zellen entwickeln und damit aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen [Löffler et al., 2003].

Die Entstehung von Knochen kann im Wesentlichen in drei Schritte eingeteilt werden:

1. Proliferation der Osteoblasten
2. Reifung von Extrazellulärmatrix (inklusive Kollagen-Produktion)
3. Mineralisierung [Stein et al., 1990].

Knochengewebe entsteht durch die Mineralisierung von Osteoid. Das von Osteoblasten gebildete Osteoid stellt die nicht-kalzifizierte Knochengrundsubstanz dar, die vor allem Kollagen Typ I, Proteoglykane und Glykoproteine enthält [Welsch, 2006]. Die Osteoblasten sezernieren Tropokollagen, das durch Quervernetzungen Kollagenfibrillen bildet. 90 % des Osteoids besteht aus Kollagen Typ I [Löffler et al., 2003]. Kollagen Typ I ist ein Heterotrimer, bestehend aus zwei $\alpha 1(I)$ -Ketten und einer $\alpha 2(I)$ -Kette und stellt einen typischen Marker für mesenchymale Zellen dar [Bilezikian et al., 1996]. Calcium- und Phosphationen bilden Hydroxylapatitkristalle $[3Ca_3 (PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2]$, die in enger räumlicher Beziehung zu den Kollagenfibrillen stehen. Aufgrund ihrer Affinität lagern sie sich dem Kollagen an [Lüllmann-Rauch, 2003]. Solange die Kollagenfibrillen ungeordnet sind, bezeichnet man den Knochen als Geflechtknochen. Dieser Knochen weist ein großes Wachstumspotential auf, zeichnet sich jedoch durch geringe mechanische Festigkeit aus. Durch verschiedene Reize, zum Beispiel mechanische Beanspruchung, kommt es durch Osteoblasten, die für den Aufbau und Osteoklasten, die für den Knochenabbau zuständig sind, zu einem Umbau in den solideren Lamellenknochen [Lüllmann-Rauch, 2003].

Während der Ossifikation verändert sich die Zusammensetzung des Sekrets der Osteoblasten. Auch wenn der genaue Ablauf der Mineralisierung noch nicht endgültig verstanden ist, geht man heute davon aus, dass die Mineralisation durch Expression des membranständigen Glykoproteins Alkalische Phosphatase eingeleitet wird [Zernik et al., 1990]. Im Frühstadium exprimieren die Osteoblasten Osteopontin,

das im Verlauf der Knochenbildung allerdings nicht unbedingt nachweisbar ist, da es zu einer Absorption in das Substratum kommt. Osteopontin hat diverse Aufgaben. Es ist für die Regulation der Mineralisierung, für die Zelladhäsion und für Tissue Remodeling verantwortlich [Davies, 1996]. Im späteren Stadium wird Osteocalcin gebildet [Aubin et al., 1996], was die Umbauprozesse im Knochengewebe in Gang setzt, da eine wesentliche Aufgabe des Osteocalcins in der Aktivierung von Osteoklasten liegt, die für die Knochenresorption verantwortlich sind [Davies, 1996].

2.4 Mikromassen

Ein derzeit weit verbreitetes Verfahren zur Transplantation von Knochengewebe *in vitro* ist das scaffoldbasierte Verfahren, bei dem vor der Transplantation Knochengewebe *in vitro* mit Hilfe von Trägergerüsten, so genannten Scaffolds, generiert wird [Hutmacher et al., 2000]. Es herrscht allerdings Uneinigkeit über die Anwendung von Scaffolds im Rahmen von Tissue Engineering, da artifizielle Scaffolds verglichen mit natürlicher Matrix einige Nachteile haben, beispielsweise in der Biokompatibilität und der Abbaubarkeit [Meyer et al., 2004]. Zusätzlich kann das artifizielle Material *in vivo* durch Immunogenität eine Abwehrreaktion beim Patienten hervorrufen [van der Kraan et al., 2002]. Um diese unerwünschten Nebenwirkungen zu verringern, wäre es erstrebenswert, die Verwendung von Scaffolds auf ein Minimum zu reduzieren. Dazu scheint die Mikromassentechnologie eine viel versprechende Alternative zu bieten.

In der Mikromassentechnologie werden Zellen nach Proliferation von 2D-Monolayern abgelöst und in spezielle, nicht-adhäsive Kulturkammern überführt. Innerhalb von drei Tagen bilden sich daraus sphärische Formationen [Handschel et al., 2007b]. Der Vorteil von Mikromassen liegt darin, dass die Bedingungen eher mit den *In-vivo*-Verhältnissen vergleichbar sind, da sie ein dreidimensionales Konstrukt darstellen. Die Zellen bilden in dieser Formation selbstständig die extrazelluläre Matrix. Da keine arten- beziehungsweise gewebespezifische Extrazellulärmatrix existiert, scheint dies ein weiterer Vorzug der Mikromassen zu sein. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass die sonst künstlich verwendete Matrix mit zellulären Funktionen, wie Proliferation, Zellmigration, Differenzierung und Apoptose, interagiert [Boudreau et

al., 1999; Abbott, 2003]. Diese unerwünschte Beeinflussung der Zellentwicklung entfällt bei Verwendung von Mikromassen. Gerber et al. führten verschiedene Untersuchungen zur Differenzierung osteoblastenähnlicher Zellen in Monolayer- und Mikromassenkulturen durch. Dabei zeigten sich weitere positive Eigenschaften von Mikromassen: Verglichen mit 2D-Kulturen weisen Mikromassenkulturen zwar, anhand des DNA-Gehalts gemessen, eine geringere Proliferationsrate auf. Sie demonstrieren aber eine schnellere und ausgeprägtere osteoblastäre Differenzierung, die durch die in Mikromassenkulturen bereits früh entstandenen Zell-Zell-Kontakte (vor allem gap-junctions) begünstigt wird [Gerber et al., 2001; Gerber et al., 2002]. Gleichzeitig zeigten sich eine erhöhte Alkalische Phosphatase Aktivität und eine gesteigerte Osteocalcin Expression [Gerber et al., 2002]. Außerdem war zu erkennen, dass die Mineralisation in den Mikromassen bereits nach einer Woche einsetzt und sich nach 2 - 3 Wochen fast ausschließlich mineralisiertes Gewebe zeigt. Die Monolayerkulturen hingegen benötigen 2 - 3 Wochen, um mit der Mineralisierung zu beginnen. Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der Kollagenexpression. In den 2D-Kulturen war Kollagen kaum detektierbar verglichen mit den Mikromassen, die eine deutliche Kollagen Expression zeigten [Gerber et al., 2002]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass Mikromassenkulturen eher die *In-vivo*-Verhältnisse der Knochenentwicklung nachahmen als 2D-Kulturen und dies der ausschlaggebende Vorteil gegenüber Monolayerkulturen ist [Hall et al., 2000]. Mikromassenkulturen aus embryonalen Stammzellen konnten bereits erfolgreich generiert und auch chondrogen differenziert werden [Tanaka et al., 2004]. Dies ließ hoffen, ähnliche Erfolge nun auch mit osteogen vordifferenzierten USSCs erreichen zu können.

2.5 Biomaterialien

Wie bereits beschrieben, strebt die Forschung danach, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem Knochen *ex vivo* generiert werden kann, um anschließend für Transplantationen zur Verfügung zu stehen. Um Knochen als dreidimensionalen Komplex erzeugen zu können, kann zurzeit noch nicht auf Biomaterialien verzichtet werden. Als Biomaterialien kommen verschiedene Materialien in Frage [Wiesmann et

al., 2004]. Häufig verwendet werden deproteiniertes Rinderknochen (Bio Oss®), β -Tricalciumphosphat (Cerasorb®), multiporöses β -TCP (Cerasorb M®) PLA/PGA (polylactic/polyglycolic acid copolymer) und demineralisierter Knochen (insoluble collagenous bone matrix, (ICBM)).

Entscheidend bei der Wahl eines geeigneten Biomaterials ist vor allem die Interaktion zwischen Trägergerüst, den zur Implantation verwendeten Zellen und dem Transplantat empfangenden Gewebe [Panetta et al., 2009]. Die Trägermaterialien können nicht nur die mechanische Stabilität beeinflussen, sondern auch die osteogene Differenzierung anregen [Panetta et al., 2009]. Handschel et al. zeigten in einer *In-vitro*-Studie, dass demineralisierter Knochen (insoluble collagenous bone matrix, (ICBM)) gefolgt von β -Tricalciumphosphat (Cerasorb ®) die beste Kompatibilität mit ESCs aufweist [Handschel et al., 2009]. So fand sich bei der ICBM die größte Anzahl von lebenden Zellen. Auch zeigten sich für ICBM die höchsten Zelladhäsionsraten.

Die Porosität eines Trägermaterials ist eine der entscheidenden Beschaffenheiten, die dessen Oberfläche prägen und damit direkt Zellanheftung und Zellmigration beeinflussen [Chehroudi et al., 1997]. Vermutet wird demnach, dass der Vorteil von ICBM darin liegt, dass es die höchste Porosität aller Biomaterialien aufweist. Hinzu kommen große Poren und zusätzlich Verbindungen zwischen den einzelnen Poren. Dies scheint einen positiven Effekt auf die Knochenbildung zu haben [Handschel et al., 2009]. Der hohe Kollagenanteil des ICBM-Trägermaterials ist vermutlich, neben der Porosität, mitverantwortlich für dessen gute Zellkompatibilität. Es konnte nachgewiesen werden, dass Biomaterialien mit hohem Kollagenanteil deutlich bessere Zellzahlen und erhöhte Proliferationswerte aufweisen als Trägermaterialien mit geringem Kollagenanteil [Petrovic et al., 2006].

Die Studie von Handschel et al. konnte einen weiteren Aspekt von Biomaterialien ausmachen. Es zeigte sich, dass Biomaterialien die Genexpression von Zellen materialspezifisch beeinflussen. So wies ICBM eine signifikant erhöhte Expression von Alkalischer Phosphatase auf, wohingegen β -TCP signifikant mehr Osteopontin exprimiert. Unklar bleibt allerdings, inwiefern die Scaffolds die Differenzierung beeinflussen [Handschel et al., 2009].

Naujoks et al. konnten mit einer ganz aktuellen Studie die oben genannten Vorteile von ICBM im Rahmen des Tissue Engineering auch für USSCs belegen. In Anlehnung an die bereits zitierte Studie von Handschel et al. wurde auch die

Kompatibilität verschiedener Biomaterialien mit osteogen vordifferenzierten USSCs untersucht. Es zeigte sich, dass ICBM sowohl die höchste Anzahl an lebenden Zellen aufweisen konnte, als auch die besten Werte für Zellanheftung und -proliferation bot [Naujoks et al., 2010].

2.6 Ziel der Arbeit

In der Einleitung wurden viele Vorzüge von USSCs benannt, die sie zu einem wichtigen Bestandteil in vielen Therapien machen können. Die Studie soll zeigen, inwiefern sich humane Nabelschnurblutstammzellen als ein Exempel pluripotenter Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen tatsächlich eignen. Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragestellungen analysiert werden:

- Fördern USSCs die Mineralisierung *in vivo*?
- Fördern USSC-Mikromassen die Mineralisierung *in vivo*?
- Bieten USSC-Mikromassen bei der Mineralisierung von Knochengewebe *in vivo* Vorteile gegenüber USSCs?

3 Material und Methoden

3.1 Materialliste

Chemikalien

Cell & Tissue Staining Kit (Mouse Kit), bestehend aus:

- Peroxidase Blocking Reagenz (3%iges Wasserstoffperoxid)
- Serum Blocking Reagenz G (tierisches/murines Serum in Puffer mit Konservierungsstoffen)
- Avidin Blocking Reagenz (Avidin Lösung mit 0,1 % Natriumazid, NaN_3)
- Biotin Blocking Reagenz (Biotin Lösung mit 0,1 % Natriumazid, NaN_3)
- Secondary Biotinylated Antibodies
- High Sensitivity Streptavidin-HRP Conjugate (HSS-HRP)
- DAB Chromogen (2,5 % 3,3'Diaminobenzidine in Puffer)
- DAB Chromogen Buffer (0,1 % H_2O_2 in Puffer)
- Leere Tropfflasche

Fa. R&D Systems Europe, Ltd., Abington (UK)

Ethanol 99,5 %, 96 %

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Formaldehydlösung 4 % (gepuffert, pH 6,9)

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Masson-Goldner Färbekit, bestehend aus:

- Azophloxin-Lösung
- Phosphorwolframsäure Orange G-Lösung
- Lichtgrün SF-Lösung
- Essigsäure 10 %

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Xylol (Isomere)

Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)

Medien und Puffer

Biozym Plaque Agarose

Fa. Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf (D)

Basismedium zur Mikromassenherstellung:

- 350 ml Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)
Fa. Lonza, Verviers (B)
- 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS)
Fa. Biochrom AG, Berlin (D)
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
Fa. Biochrom AG, Berlin (D)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
Fa. Biochrom AG, Berlin (D)

Herstellung von DAG

- Ascorbinsäure
Fa. Sigma, Taufkirchen (D)
- Dexamethason
Fa. Sigma, Taufkirchen (D)
- β -Glycerolphosphat
Fa. Sigma, Taufkirchen (D)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1X

Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4) 10X

Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Geräte, Laborhilfsmittel und weitere Materialien

96 Well Cell Culture Cluster, costar

Fa. Corning Incorporated, New York (USA)

Autoklav: D-65

Fa. Systec GmbH, Wetttenberg (D)

Computertomograph SOMATOM Sensation 64

Fa. Siemens AG, Erlangen (D)

Einbettautomat

Fa. Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance (Kalifornien, USA)

Einbettformen (Probendicke 16 mm)

Fa. PSI Grünewald GmbH & Co. KG, Laudenbach (D)

Färbekästen nach Schiefferdecker

Fa. DURAN Group GmbH, Mainz (D)

Fluoromount-G™

Fa. SouthernBiotech, Birmingham (Alabama, USA)

Gefrierschränke

Fa. Liebherr, Ochsenhausen (D)

Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)

HERAcell® 240 CO2 Inkubator

Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold (D)

Kühlschränke

Fa. Liebherr, Ochsenhausen (D)

Kulturschalen

Fa. Vitaris, Baar (Schweiz)

Leica QWin V3

Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., 2003, Wetzlar (D)

Low Temperature Freezer Vials, 1,2 ml

Fa. VWR International bvba, Leuven (B)

MBT PAP-Pen,

Fa. Micro-Bio-Tec-Brand, Gießen (D)

Mikroliterpipette Eppendorf Research®

Fa. Eppendorf, Wesseling-Erzdorf (D)

Mikroskop: Leica DM5000 B

Fa. Leica, Wetzlar (D)

Mikroskop Kamera: DC300F

Fa. Leica, Wetzlar (D)

Mikrotome Blades (Low Profile) Leica 819

Fa. Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch (D)

Millipore™ Direct-Q 3UV

Fa. Millipore, Billerica (Massachusetts, USA)

Messzylinder, B, blau graduiert 100: 1 ml

Fa. Hirschmann, Eberstadt (D)

Messzylinder, B, blau graduiert 500: 5 ml

Fa. Hirschmann, Eberstadt (D)

Multifuge®

Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold (D)

Objektträger SuperFrost® Plus (geputzt, geschliffen, 25 x 75 x 1,0 mm)

Fa. VWR International bvba, Leuven (Belgien)

Pinzette

Fa. Hammacher, Solingen (D)

Pipettenspitzen TipOne® (0,1 – 10; 1-100; 101-1000 µl)

Starlab GmbH, Ahrensburg (D)

Präparate-Mappe

Fa. Welabo VGKL, Düsseldorf (D)

Präparate-Kasten

Fa. Welabo VGKL, Düsseldorf (D)

Schlitten Mikrotom Leica SM2000 R

Fa. Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar (D)

Sterile Zentrifugen- und Probenröhrchen, 50 ml

Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)

Stoppuhr

Fa. neoLab®, Heidelberg (D)

Wasserbad für Paraffinschnitte

Fa. Leica, Wetzlar (D)

Zentrifuge, Multifuge® 1 S-R

Fa. Hereaus, Osterode (D)

3.2 Zellen

Für den Versuch zur Knochengewinnung *in vivo* wurden sowohl humane Nabelschnurstammzellen als auch murine embryonale Stammzellen verwendet, die als pluripotente Zellen zum Vergleich genutzt werden sollten. Die humanen Nabelschnurstammzellen wurden vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Frau Professor G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank, zur Verfügung gestellt. Gewonnen wurden die Zellen ausschließlich mit Einverständnis der Mutter. Gewinnung und Kultivierung erfolgten standardisiert nach bekanntem Protokoll [Kögler et al, 2004].

Die murinen embryonalen Stammzellen entstammten einer Zelllinie aus dem Inneren der Zellmasse einer Blastozyste, die vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Herrn Professor K. Pfeffer bereitgestellt wurden. Sie wurden dreieinhalb Tage *post conceptionem* entnommen und mittels Kryokonservierung gelagert. Für unseren Versuch wurden sie nach einem bereits veröffentlichten Protokoll [Handschele et al, 2008] osteogen differenziert.

3.3 Herstellung und osteogene Differenzierung von USSC-Mikromassen

Die Mikromassenherstellung von USSCs wurde in unserer Arbeitsgruppe in Anlehnung an die Herstellung von ESC-Mikromassen untersucht. Dabei erwies sich die folgende Vorgehensweise als erfolgreich.

Die USSCs wurden nach 14 Passagen aus den Kulturschalen gelöst, zentrifugiert (7 min bei 250 xg) und im Kulturmedium erneut suspendiert (1 Mio Zellen/ml). 96-well Zellkulturplatten wurden mit 60 µl 2%iger Agarose in DMEM bedeckt. Die Agaroselösung verhindert ein Anhaften der Zellen an den verwendeten Platten. Damit wird die Möglichkeit, einen Monolayer (2D-Kultur) zu bilden, verhindert. Jedem "well" wurden 180 µl Zellsuspension, dies entspricht etwa 200.000 Zellen, hinzugefügt und die Zellkultur anschließend über Nacht inkubiert. Danach fand ein Mediumwechsel statt. Dabei wurde das alte Medium durch 160 µl DAG-Medium ersetzt. Dieses bestand aus 100 nM Dexamethason, 50 µM L-Ascorbat und 10 mM β-Glycerophosphat. Nach 3 Tagen wurden die Mikromassen aus den Zellkulturplatten herausgenommen und, nachdem sie mit PBS gewaschen wurden, mit 1 ml Formaldehyd (4 %)/Kammer fixiert.

3.4 Knochenbildung *in vivo*

Ein Tierexperiment sollte zeigen, ob sich mit Hilfe der Transplantate, die durch das Tissue Engineering hergestellt wurden, ektop neuer Knochen bilden kann. Sowohl die Testung eines geeigneten Biomaterials als auch die geeignete Kulturdauer für die Herstellung der USSC-Mikromassen wurde in unserer Arbeitsgruppe experimentell herausgearbeitet und nach den daraus gemachten Erfahrungen für unsere Versuche übernommen.

Als Biomaterial, das notwendig für die Herstellung von 3D-Strukturen ist, wurde ICBM (insoluble collagenous bone matrix) gewählt, da Handschel et al. zeigen konnten, dass der demineralisierte Knochen, der hier Verwendung findet, für viele Zellen eine gute Verträglichkeit aufweist [Handschel et al., 2009]. Studien zu der Kompatibilität

von ICBM und USSCs gab es zu Beginn dieser Arbeit noch nicht. Naujoks et al. veröffentlichten 2010 eine Studie, die belegt, dass ICBM das am besten geeignete Biomaterial für Tissue Engineering unter Verwendung von osteogen vordifferenzierten USSCs ist [Naujoks et al., 2010].

3.4.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Ratten (RNU-Ratten) verwendet, da Tiere von gewisser Größe notwendig waren, um die Probenkörper ohne übermäßige Beeinträchtigung der Tiere implantieren zu können. Um Immunreaktionen zu vermeiden, wurden immuninkompetente, athyme Tiere verwendet.

Alle Ratten waren männlich und zwei bis drei Monate alt. Sie wurden mit handelsüblichem Trockenfutter und *Aqua ad libitum* gefüttert. Entsprechend der Vorschriften des Tierschutzgesetzes wurden die Tiere in S1-Räumen gehalten. Die tierärztliche Versorgung erfolgte durch die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

3.4.2 Versuchsaufbau und chirurgisches Vorgehen

Es wurden insgesamt 30 Ratten in dem Versuch erfasst. Die Tiere wurden zu Beginn mit Ketamin und Xylazin i.p. narkotisiert. Pro Seite wurden jedem Tier 2 Transplantate implantiert. Dabei erfolgten die Hautschnitte 3 cm paravertebral in sagittaler Ebene. In vorpräparierte Muskeltaschen wurden die Transplantate 1,5 cm caudal der Schulter und 1,5 cm cranial des Beckens eingesetzt. Die Muskeltaschen wurden anschließend mit 2 nicht resorbierbaren Nähten (Ethilon 4-0) verschlossen. Es wurde ein nicht resorbierbares Material gewählt, um das Auffinden der Probenkörper bei der Explantation zu vereinfachen. Subcutis und Cutis wurden abschließend mit Ethilon 2-0-Fäden eng vernäht.

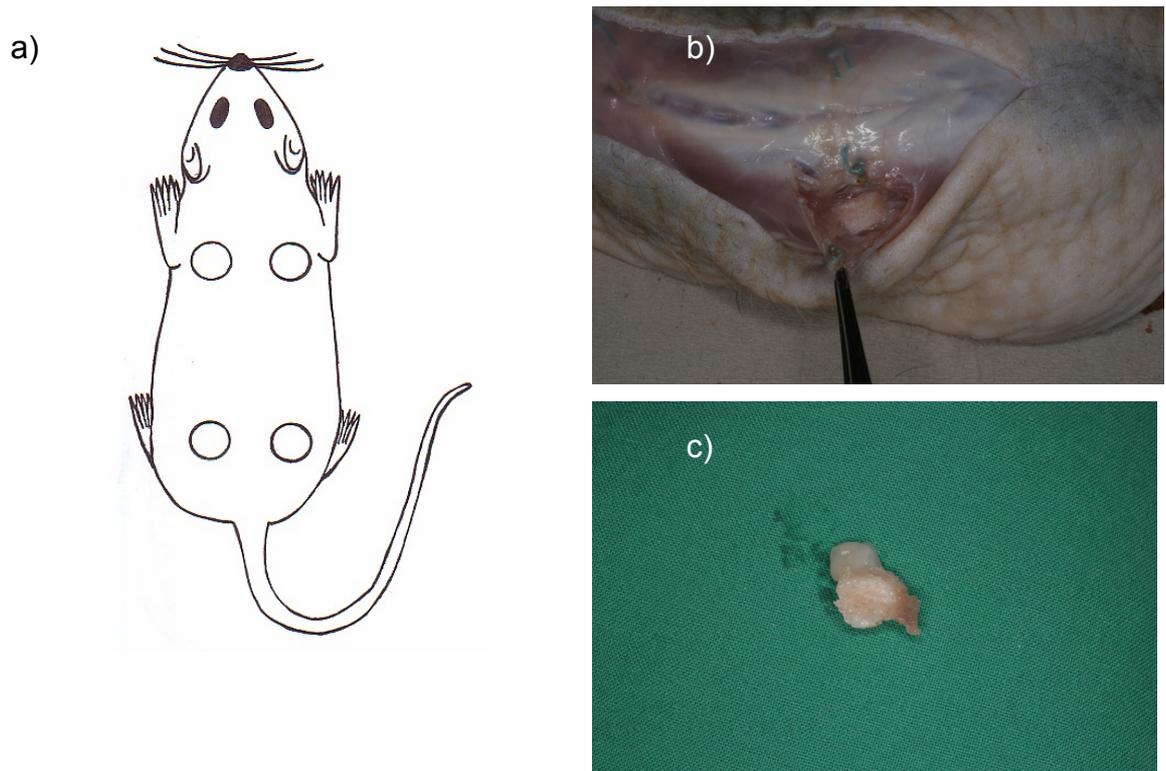


Abb. 2: Tiermodell

- a) Implantatlokalisationen paravertebral rechts und links anterior sowie posterior
- b) Explantation eines Probenkörpers aus einer Muskeltasche
- c) Explantiertes Biomaterial-Zell-Konstrukt

Aufgrund der oben erwähnten Erkenntnisse wurde als Biomaterial ICBM verwendet. Die Probenkörper haben einen Durchmesser von 6 mm und eine Höhe von 5 mm (Abb. 3).

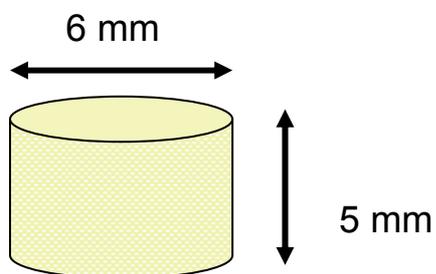


Abb. 3: Abmessungen der ICBM Probenkörper

Randomisiert wurden folgende vier Typen des Transplantats in die unterschiedlich lokalisierten Muskeltaschen implantiert.

- I. Probenkörper mit USSCs (PK-USSC): Probenkörper, auf dem die für drei Tage in DAG osteogen vordifferenzierte USSCs drei Tage inkubiert wurden.
- II. Probenkörper mit USSC-Mikromassen (PK-USSC-Mikr.): Probenkörper, auf dem zwei für drei Tage in DAG vordifferenzierte USSC-Mikromassen drei Tage *prae implantationem* aufgebracht wurden.
- III. Probenkörper mit ESCs (PK-ESC): Probenkörper, auf dem die für drei Tage in DAG vordifferenzierten ESCs für drei Tage inkubiert wurden.
- IV. Probenkörper ohne Zellen (PK-Kontrolle): Probenkörper, der vor der Implantation drei Tage in DAG eingelegt wurde, aber keine Zellen enthält. Diese Probe dient als Kontrolle.

3.4.3 Versuchsdurchführung

Um den Verlauf einer möglichen Knochenentwicklung zeitlich verfolgen zu können, wurden die Ratten monatlich computertomographisch untersucht. Für eine zusätzliche histologische Beurteilung wurden die Versuchstiere zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten geopfert. Nach zwei, nach drei, nach vier und nach sechs Monaten wurden jeweils vier bis neun Tiere getötet und die Transplantate explantiert.

Radiologische Analyse

Sieben Tage, ein Monat, zwei, drei und vier Monate nach Implantation der unterschiedlichen Probenkörper wurden alle lebenden Ratten einem Ganzkörper-CT unterzogen. Die radiologische Untersuchung wurde von einem Radiologen durchgeführt, der keinerlei Kenntnisse über die jeweilige Zusammensetzung der Transplantate besaß. Untersucht wurde der zeitliche Verlauf des Calciumgehalts in Abhängigkeit vom Transplantationstyp.

Histologische Untersuchungen

Nach Opferung der Tiere wurden die Probenkörper explantiert und für die histologischen Untersuchungen aufgearbeitet.

- Einbetten und Schneiden

Die Transplantate wurden einmal mit PBS gewaschen und dann in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (20 % Ethanol über Nacht, 50 %, 70 %, 96 % und 99,5 % Ethanol für jeweils 10 Minuten) wurden die Proben entwässert und in Xylol gelagert. Anschließend wurden sie nach herkömmlichem Verfahren in Paraffin eingebettet.

Mittels Schlittenmikrotom wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt, die auf Superfrost® Objektträger aufgezogen wurden. Vor den jeweiligen Färbungen wurden die Schnitte für sieben Minuten in Xylol gegeben, um das Paraffin herauszulösen und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5 %, 96 %, 70 %, 50 % Ethanol für jeweils eine Minute) wieder gewässert, um die Färbung zu ermöglichen. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Objektträger im Anschluss an die Alkoholreihe in Aqua dest. aufbewahrt, bis mit der Färbung begonnen wurde.

- Masson-Goldner-Färbung

Gefärbt wurde mit dem Masson-Goldner-Färbekit, Fa. IVD.

Die Masson-Goldner-Färbung als Trichromfärbung färbt verschiedene Gewebe unterschiedlich an und macht sie damit gut gegeneinander abgrenzbar. Dabei werden Zellkerne dunkelbraun bis schwarz dargestellt, Zytoplasma und Muskulatur dagegen ziegelrot. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen färben sich grün an. Erythrozyten weisen nach der Färbung ein leuchtendes Orange auf. Entscheidend für unseren Versuch ist jedoch, dass mineralisierte und nicht mineralisierte Knochenmatrix farblich unterschieden wird. Dabei zeigt sich für mineralisiertes Knochengewebe eine leuchtend grüne Farbe, wohingegen sich Osteoid rot darstellt [Würzler, 2003].

Nach der oben beschriebenen absteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger zu Beginn für 30 Sekunden in 1%iger Essigsäure getränkt, um anschließend für zehn Minuten mit Azophloxin-Lösung gefärbt zu werden. Nach zehn Minuten erfolgte für 30 Sekunden eine Entfärbung mit 1%iger Essigsäure.

Danach wurden die Schnitte für eine Minute mit Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung gefärbt. Erneut wurde mit 1%iger Essigsäure entfärbt, um anschließend die Objektträger für zwei Minuten in Lichtgrün SF-Lösung zu geben. Abschließend fand eine letzte Entfärbung mit 1%iger Essigsäure statt. Vor dem Einbetten wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Dazu wurden die Präparate in Aqua dest. gespült, um anschließend für jeweils 30 Sekunden in Färbewannen mit 50%igem, 70%igem und 96%igem Ethanol gegeben zu werden. Es folgte eine dreiminütige Inkubation mit 99,5%igem Ethanol, bevor die Präparate für sieben Minuten in Xylol eingelegt wurden. Abschließend wurden ein bis zwei Tropfen Fluoromount G auf das gefärbte Präparat gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt.

- Detektion von Osteocalcin

Für die Darstellung des Osteocalcin wurde das Cell & Tissue Staining Kit (HRP-DAB System) der Firma R&D Systems benutzt und nach Anleitung verwendet.

Die vom Paraffin befreiten Schnitte wurden zu Beginn mit einem Fettstift (PapPen) eingekreist, um den Bereich, der gefärbt werden sollte, zu kennzeichnen. Zusätzlich half die Markierung durch den Fettstift, eine Begrenzung für die Inkubationslösungen zu schaffen, um ein Verlaufen der Reagenzien auf Teile des Objektträgers zu verhindern, die kein Präparat aufwiesen.

Da es sich bei der Osteocalcin-Färbung um eine immunhistochemische Methode mithilfe von Osteocalcin-Antikörpern handelt, begann die Färbung mit der Blockierung von potentiellen Bindungsstellen für den Osteocalcin-Antikörper, damit dieser ausschließlich an das möglicherweise im Präparat neu entstandene Osteocalcin bindet. Zuerst wurden die Schnitte mit Peroxidase Blocking Reagenz für fünf Minuten inkubiert. Nach Abwaschen der Peroxidase Blocking Reagenz mit Pufferlösung wurden die Schnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgten zwei weitere Blocking Schritte: zuerst mit Serum Blocking Reagenz G für 15 Minuten, dann für ebenfalls 15 Minuten mit Avidin Blocking Reagenz. Zwischen den beiden Reagenzien erfolgte kein Waschschrift. Die Serum Blocking Reagenz wurde lediglich abgetropft, um die Schnitte direkt anschließend mit Avidin Blocking Reagenz zu inkubieren. Dem folgte ein Waschschrift mit PBS, bevor das Biotin Blocking Reagenz für 15 Minuten einwirkte. Nach erneutem

Waschen mit PBS wurde der Osteocalcin-Antikörper (10 µg/ml, der nach wiederholten Versuchen auf 1:1000 mit PBS verdünnt wurde) auf die Schnitte gegeben. Nach 60 Minuten wurde der Antikörper mit PBS abgespült und anschließend noch dreimal für jeweils 15 Minuten in PBS-Lösung gewaschen, um die nicht-gebundenen Antikörper sicher zu entfernen und nicht fälschlicherweise mit anzufärben. Darauf folgte die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Auch dieser wurde nach 45minütiger Einwirkzeit mit Pufferlösung abgewaschen und erneut wurden die Schnitte dreimal für jeweils 15 Minuten in PBS-Lösung gewaschen. Um das gegebenenfalls vorhandene Osteocalcin sichtbar zu machen, bedurfte es eines weiteren Zwischenschritts: Hoch sensitives Streptavidin konjugiert an Horseradish Peroxidase (HSS-HRP) wurde für 30 Minuten auf die Objektträger gegeben. Über Streptavidin bindet es an das im Sekundärantikörper enthaltene Biotin. Schließlich wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils zwei Minuten den Schnitten die chromogene Substanz, die 3,3'Diaminobenzidine enthielt, zugeführt. Dazu wurden zwei Tropfen von der im Kit enthaltenden DAB Chromogen Lösung in zwei Milliliter Chromogen Puffer aufgelöst. Nach 12 Minuten zeigte sich eine braune Farbausfällung an den Stellen, an denen sich im Präparat Osteocalcin befindet. Nach fünf Minuten Waschen in Aqua dest. folgte die aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 % und 96 % Ethanol für jeweils 30 Sekunden, 99,5 % Ethanol für drei Minuten und schließlich Xylol für sieben Minuten). Eingedeckt wurden auch diese Schnitte mit Fluoromount G.

3.4.4 Versuchsauswertung

Histologische Untersuchungen

- Masson-Goldner-Färbung

Die Masson-Goldner-Färbung wurde mithilfe eines Image Analysers (verwendetes Computerprogramm: Leica QWin V3) gemessen. Berechnet wurde der Anteil des Osteoids (im histologischen Präparat rot dargestellt) am gesamten ICBM Probenkörper. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Fläche, die vermessen wurde, mit einem Rahmen gekennzeichnet. So sollte vermieden

werden, dass Gewebe, das ebenfalls rot angefärbt worden war (z.B. Muskelgewebe), mit in die Berechnung einfluss. Nun wurde die Gesamtfläche des auf dem Objektträger vorhandenen ICBM Probenkörper vermessen. Dazu wurde der zu vermessende Teil mithilfe des Computerprogramms farblich gekennzeichnet. In einem zweiten Schritt wurden nur die rot gefärbten Anteile durch eine andere Farbe markiert. Das Computerprogramm errechnete daraufhin die beiden markierten Flächen. Der Wert des ICBM Probenkörpers wurde 100 % gleichgesetzt. Da auch die Fläche des Osteoids errechnet wurde, ließ sich der prozentuale Anteil des Osteoids an der Gesamtmatrix ermitteln. Die Formel nach der berechnet wurde, lautet

$$(100/\text{Fläche der Gesamtmatrix}) \times \text{Fläche des Osteoids}$$

- Osteocalcin-Färbung

Die immunhistochemische Darstellung von Osteocalcin wurde semiquantitativ ausgewertet. Je nach Quantität der angefärbten Matrix wurden die Schnitte drei Gruppen zu geordnet.

- I. 0 - 10 % der Matrix ist angefärbt
- II. 11 – 50 % der Matrix ist angefärbt
- III. > 50 % der Matrix ist angefärbt

Die Objektträger wurden bei Auswertung beider Färbungen nummeriert und nach Explantationsort des Transplantats bezeichnet (1 vorne links, 2 hinten rechts usw.). Diese Verblindung sollte der Objektivität dienen, da so während der Auswertung keine Kenntnis über den vorliegenden Transplantationstyp bestand.

Untersuchung von Laborparametern

Vor Opferung der Versuchstiere wurde jeweils eine intrakardiale Blutentnahme durchgeführt. Diese diente zur Erstellung eines Blutbildes. Gleichzeitig wurde auch das CRP als Entzündungsparameter mitbestimmt, um Entzündungsreaktionen auf Systemebene erkennen beziehungsweise ausschließen zu können.

Statistische Methoden

Alle statistischen Berechnungen und Signifikanzanalysen wurden mittels der

Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel ausgeführt.

Der CaHa-Gehalt der Mineralisationen, der mithilfe der radiologischen Verfahren ermittelt wurde, wurde mit den parameterfreien Tests, Kruskal-Wallis-Test sowie Mann-Whitney U Test, auf signifikante Differenzen überprüft. Die histologischen Präparate wurden auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich Osteocalcinbildung und Osteoidbildung untersucht. Dabei kamen erneut nicht-parametrische Tests zur Anwendung – unter anderen der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney U Test. Mithilfe des Zweistichproben T-Tests wurde überprüft, ob die Mittelwerte der USSCs und USSC-Mikromassen enthaltenden Proben typen signifikant größer sind als die der Leerproben. Dieser Test ist dem Whitney-Mann-Test relativ ähnlich, prüft allerdings nicht nur Unterschiede in den Mittelwerten, sondern auch die Signifikanz zweier Mittelwerte. Des Weiteren ist dieser Test für Stichproben mit einem geringen Umfang geeignet. Für die statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5 % gewählt. Es wurden sowohl der Explantationszeitpunkt als auch der Transplantattyp in die Untersuchung mit einbezogen.

4 Ergebnisse

Drei der Versuchstiere verstarben vorzeitig, so dass letztendlich 27 Versuchstiere in den Versuch einbezogen wurden. Während des gesamten Zeitraums zeigten sich bei keinem Tier Anzeichen für Entzündungen im Operationsgebiet oder Wundheilungsstörungen im Bereich der Narben.

4.1 Radiologische Ergebnisse

Mithilfe der computertomographischen Untersuchung wurde der CaHa-Gehalt als Maß für die Mineralisierung gemessen. Sieben Tage *post implantationem* zeigte sich auf den Schichtbildern kein Nachweis der Transplantate. In den Folgemonaten hingegen waren sie auf den CT-Bildern deutlich zu erkennen. Die Messungen des Calciumgehalts stellten eine eindeutige Relation zwischen CaHa-Menge und Implantationstyp dar. So konnten in den USSCs und USSC-Mikromassen enthaltenden Proben entschieden mehr CaHa nachgewiesen werden als in der Gruppe der ESCs oder in der Kontrollgruppe. Dabei zeigte sich in den Mittelwerten des CaHa-Gehalts der USSCs und der USSC-Mikromassen die 200 - 300fache Menge an Calciumhydroxylapatit verglichen mit den Leerproben. Dabei ist zu beachten, dass die Standardabweichung nur circa 10 % beträgt, was darauf schließen lässt, dass alle Werte sehr eng um den Mittelwert verteilt liegen und es sich damit um äußerst valide Werte handelt.

Auch ein Vergleich zwischen USSCs und USSC-Mikromassen machte einen bemerkenswerten Unterschied deutlich: Innerhalb der USSC-Probenkörper zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt ein signifikant höherer CaHa-Gehalt als in den USSC-Mikromassen enthaltenden Probenkörpern. Tabelle 2 stellt die durchschnittlichen Calciumhydroxylapatit-Werte der verschiedenen Implantattypen dar.

Ergebnisse - Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung *in vivo*

Tab. 2: Calciumhydroxylapatitgehalt-Messung. CaHa in mg 1 Woche, 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate und 4 Monate *post implantationem*. Mw. = Mittelwert. Stabw. = Standardabweichung.

	1 Woche Mw (Stabw.)	1 Monat Mw (Stabw.)	2 Monate Mw (Stabw.)	3 Monate Mw (Stabw.)	4 Monate Mw (Stabw.)
USSCs	0	29,1 (2,3)	27,8 (2,9)	29,8 (2,9)	32,2 (2,6)
USSC-Mikr.	0	22,6 (2,4)	22,2 (2,7)	20,1 (3,1)	20 (4,2)
ESCs	0	0,3 (0,1)	1 (0,4)	0,7 (0,4)	1,8 (1,3)
Kontrolle	0	0,1 (0,1)	0,1 (0,07)	0,1 (0,07)	0,1 (0,1)

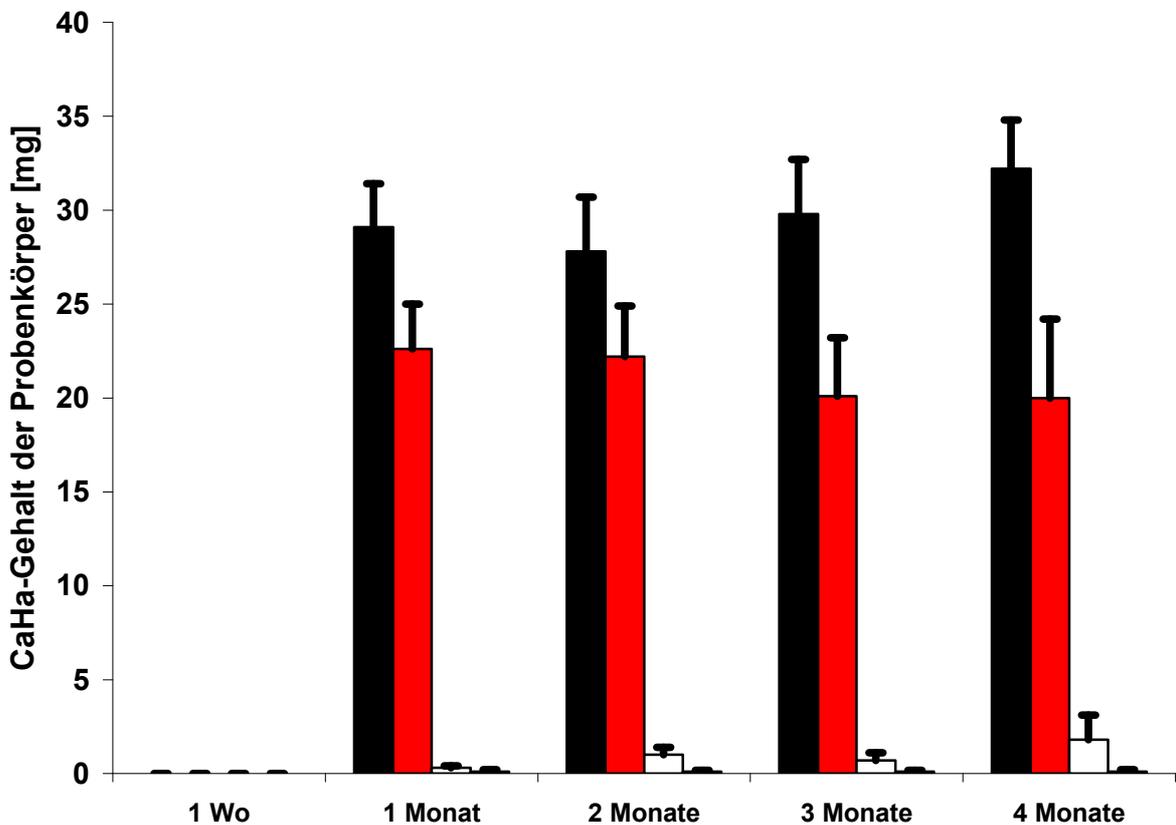


Abb. 4: CaHa-Messung des mineralisierten Gewebes nach Implantation. Schwarz = USSCs; Rot = USSC-Mikromassen; Weiß = ESCs; Grau = Kontrolle (ohne Zellen). CaHa = Calciumhydroxylapatit

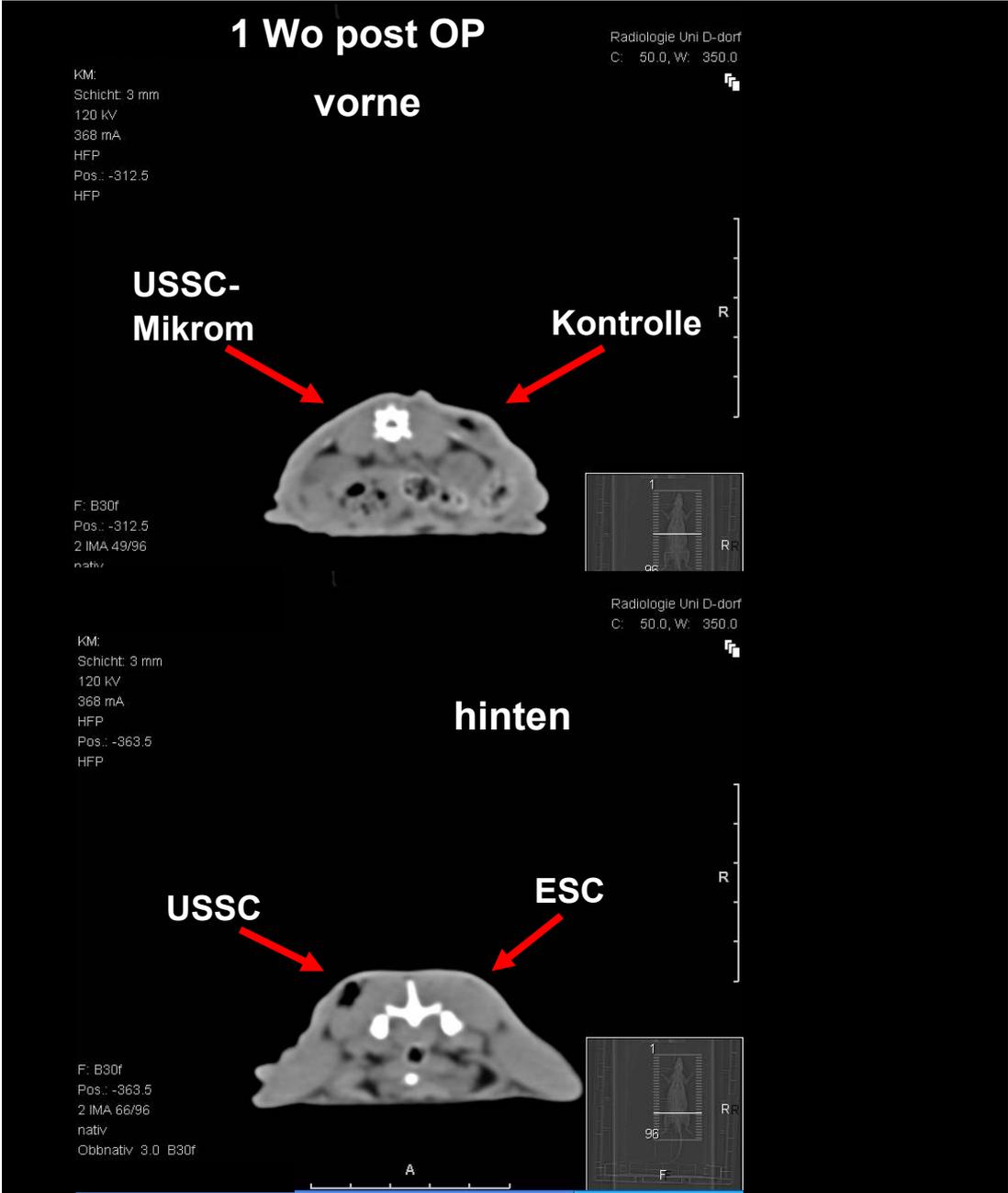


Abb. 5: Computertomographische Schnittbilder eine Woche nach Implantation der verschiedenen Transplantattypen. An keiner Transplantationslokalisierung sind Mineralisierungen zu erkennen.

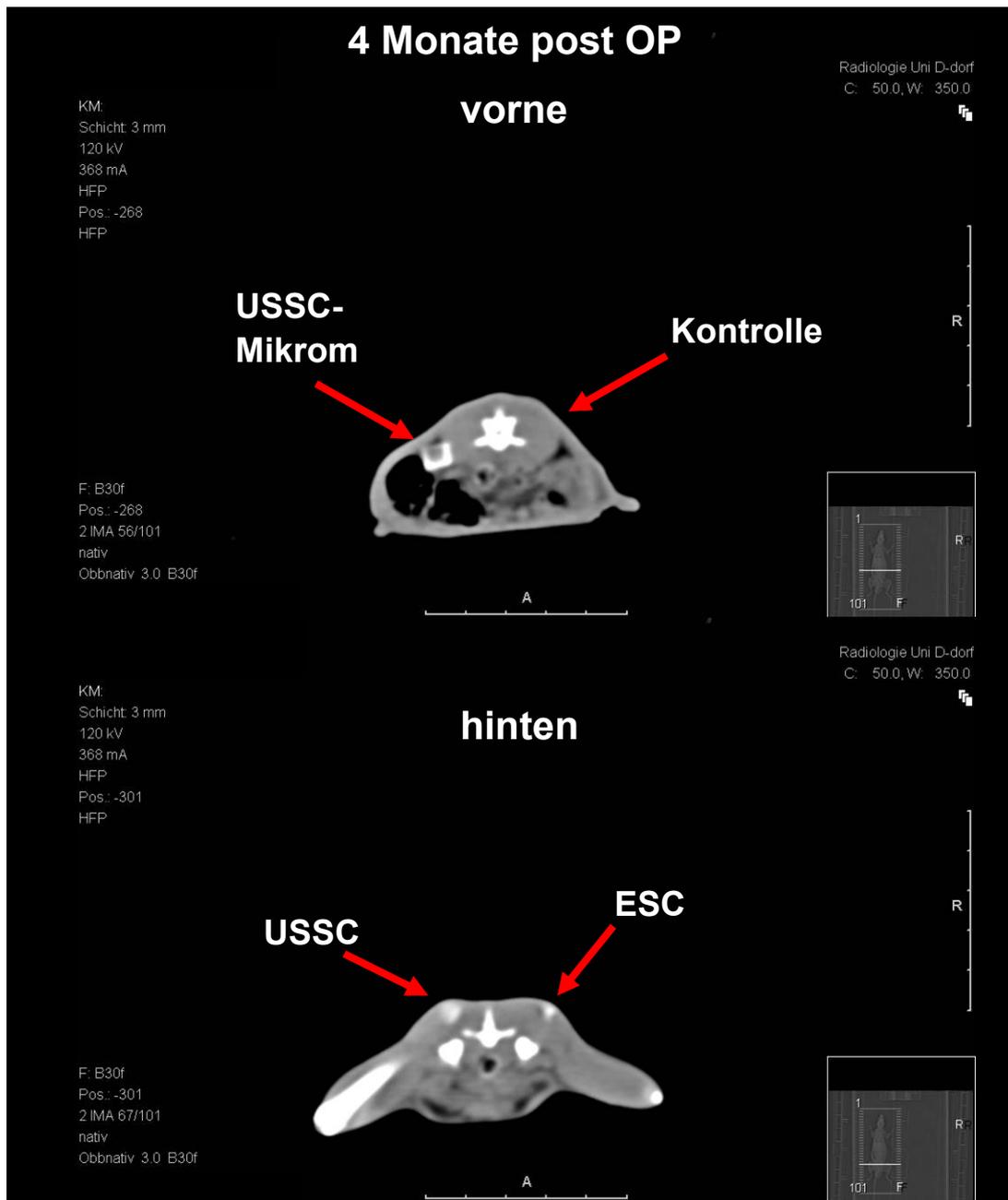


Abb. 6: Computertomographische Schnittbilder vier Monate nach Implantation. Sowohl USSC-Mikromassen als auch USSCs zeigen deutliche Mineralisierungen. Aber auch die ESCs weisen diskrete Mineralisierungen auf. Die Kontrollprobe zeigt keinerlei Veränderung.

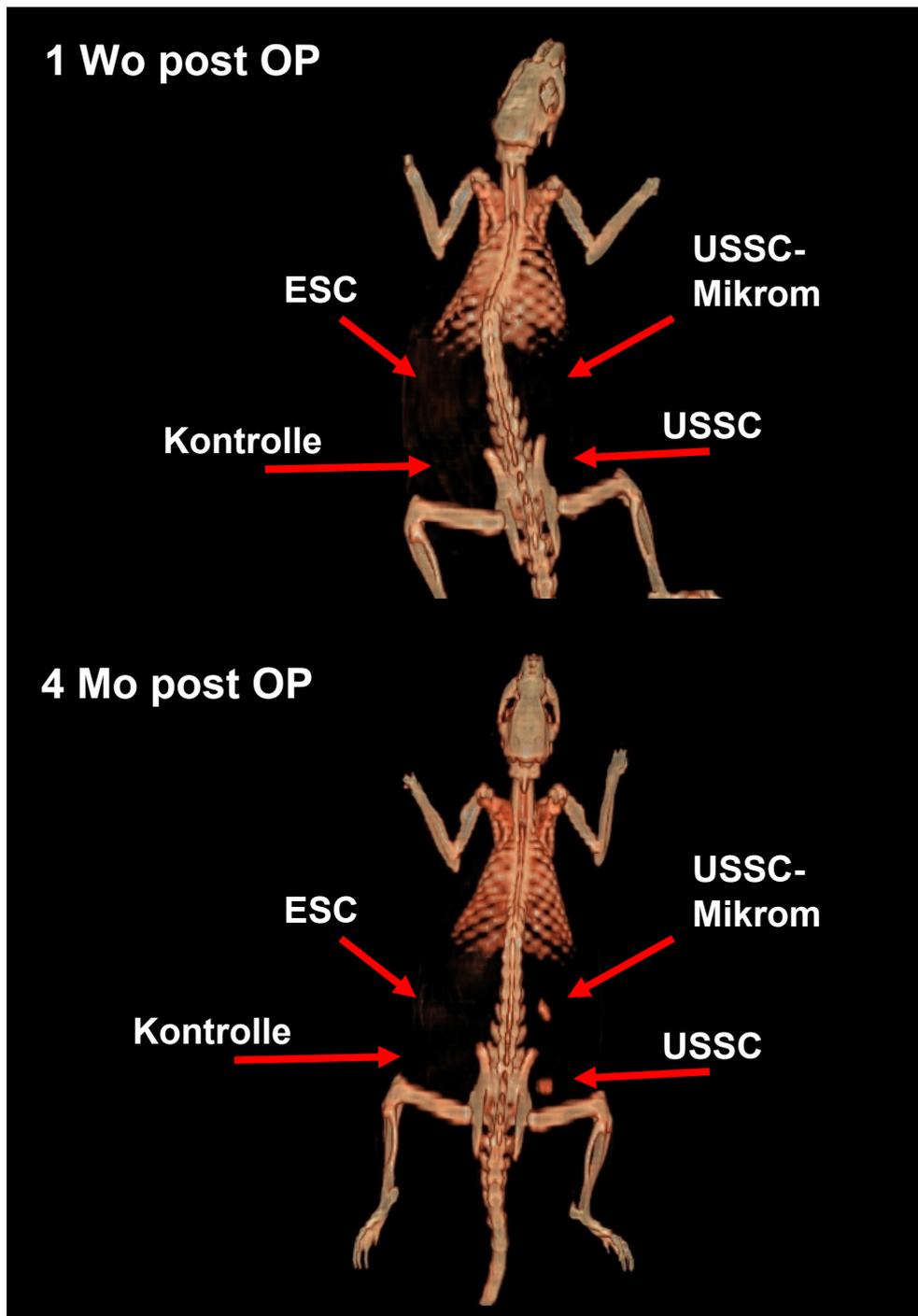


Abb. 7: Computertomographische Rekonstruktion eine Woche und vier Monate nach Implantation der vier verschiedenen Transplantattypen. Bei den USSC-Mikromassen und USSCs sind deutliche Mineralisierungen zu erkennen. Das ESC-Transplantat zeigt ebenso wie die Kontrolle keine Mineralisierungen.

4.2 Histologische Ergebnisse

Die immunhistochemische Osteocalcin-Darstellung bestätigt die radiologische Auswertung. Die Masson-Goldner-Färbung zeigt kein eindeutiges Ergebnis. In

unserer Arbeitsgruppe wurde ebenfalls eine weitere Färbung mit Alizarin durchgeführt, die die Mineralisation darstellt. Diese Färbung zeigte signifikante Unterschiede in dem Grad der Mineralisierung je nach Transplantationstyp.

4.2.1 Detektion von Osteocalcin

Die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von Osteocalcin ergab bei Opferung der Tiere nach nur 2 Monaten eine geringe Osteocalcinentwicklung (siehe Tabelle 3). Die Proben, die drei Monate *post implantationem* explantiert wurden, zeigten hingegen in Abhängigkeit von dem Transplantationstypen eine deutliche Entwicklung von Osteocalcin. Es ergaben sich sehr geringe p-Werte. Varianzen im p-Wert lassen sich durch den relativ kleinen Stichprobenumfang erklären. Insgesamt lässt sich erkennen, dass bei den Proben, die USSCs und USSC-Mikromassen enthalten, signifikant mehr Osteocalcin-Bildung erfolgte als bei den zellfreien Leerproben (Leerprobe vs. USSCs $p = 0,016$; Leerprobe vs. USSC-Mikromassen $p < 0,01$)

In den Proben der Kontrollgruppe konnte kaum Osteocalcin nachgewiesen werden. Dagegen waren 85,7 % der USSC-Mikromassen und 75 % der USSCs, teilweise deutlich, gefärbt (Intensitätsstufen II und III) (vergleiche Tabelle 4). In der zellfreien Kontrollgruppe erreichten nur 12,5 % Intensitätsstufe II. Stufe III wurde in dieser Gruppe nicht erreicht. Diese Entwicklung ist in Abbildung 8 grafisch dargestellt.

Tab. 3: Osteocalcin-Auswertung. Opferung nach 2 Monaten (OP zw. 1.10 und 4.10.2007, Opfertag 7.12.2007); 8 Tiere.

Semiquantitative Beurteilung	USSCs	USSC-Mikromassen	Kontrolle
I.	4	3	6
II.	3	3	2
III.	-	-	-
Keine Bewertung möglich	1	2	-

Tab. 4: Osteocalcin-Auswertung. Opferung nach 3 Monaten (OP zw. 1.10 und 4.10.2007, Opfertag 4.1.2008); 9 Tiere.

Semiquantitative Beurteilung	USSCs	USSC-Mikromassen	Kontrolle
I.	2	1	7
II.	5	6	1
III.	1	-	-
Keine Bewertung möglich	1	2	1

Ausprägung der Osteocalcinbildung 3 Monate *post implantationem*

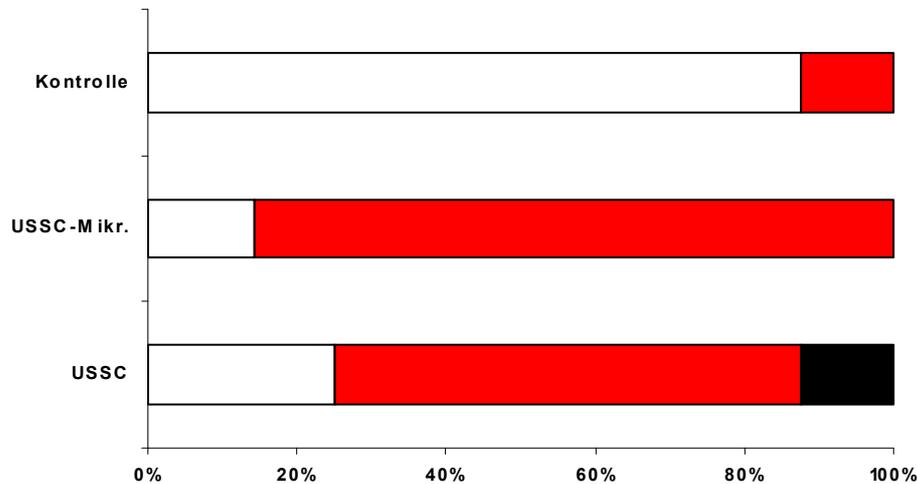


Abb. 8: Unterschiedliches Ausmaß der Osteocalcinbildung in den verschiedenen Gruppen: weiß = 0-10 % der Matrix positiv für Osteocalcin; rot = 11-50 %; schwarz = > 50 % positiv.

Zur Auswertung der Transplantate, die vier und sechs Monate nach Implantation explantiert wurden, standen nur noch jeweils vier Versuchstiere zur Verfügung. Da auch bei diesen Proben einige Schnitte nicht auswertbar waren, stehen für die endgültige Bewertung wenige Daten zur Verfügung. Bei den USSCs war trotzdem eine ausgeprägte Osteocalcinbildung zu verzeichnen. So zeigten nach 4 und 6 Monaten 71,4 % der Schnitte einen Osteoidgehalt von über 50 % an der Gesamtmatrix (Intensitätsstufe III). Die restlichen 28,6 % ließen sich der Intensitätsstufe II zuordnen. Die USSC-Mikromassen wiesen zu 66,7 % einen mittelgradigen Osteoidgehalt auf (Intensitätsstufe II) und lagen damit unter den Werten der USSCs. Ein unerwartetes Ergebnis zeigte die Kontrollgruppe: Von den vier auswertbaren Schnitten aus den Opferungen nach vier beziehungsweise sechs Monaten zeigten 75 % eine ausgeprägte Osteoidbildung (vergleiche Tab. 5 und Tab. 6).

Ergebnisse - Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung in vivo

Tab. 5. Osteocalcin-Auswertung. Opferung nach 4 Monaten (OP zw. 2.10 und 4.10.2007, Opfertag 8.2.2008); 4 Tiere.

Semiquantitative Beurteilung	USSCs	USSC-Mikromassen	Kontrolle
I.	-	1	-
II.	1	2	-
III.	2	-	2
Keine Bewertung möglich	1	1	2

Tab. 6. Osteocalcin-Auswertung. Opferung nach 6 Monaten (OP zw. 1.10 und 4.10.2007, Opfertag 2.4.2008); 4 Tiere.

Semiquantitative Beurteilung	USSCs	USSC-Mikromassen	Kontrolle
I.	-	-	1
II.	1	2	-
III.	3	1	1
Keine Bewertung möglich	-	1	2



Abb. 9: 2 Monate nach Implantation: Nur der Probenotyp, der USSCs enthält, weist einen geringen Osteocalcingehalt auf.

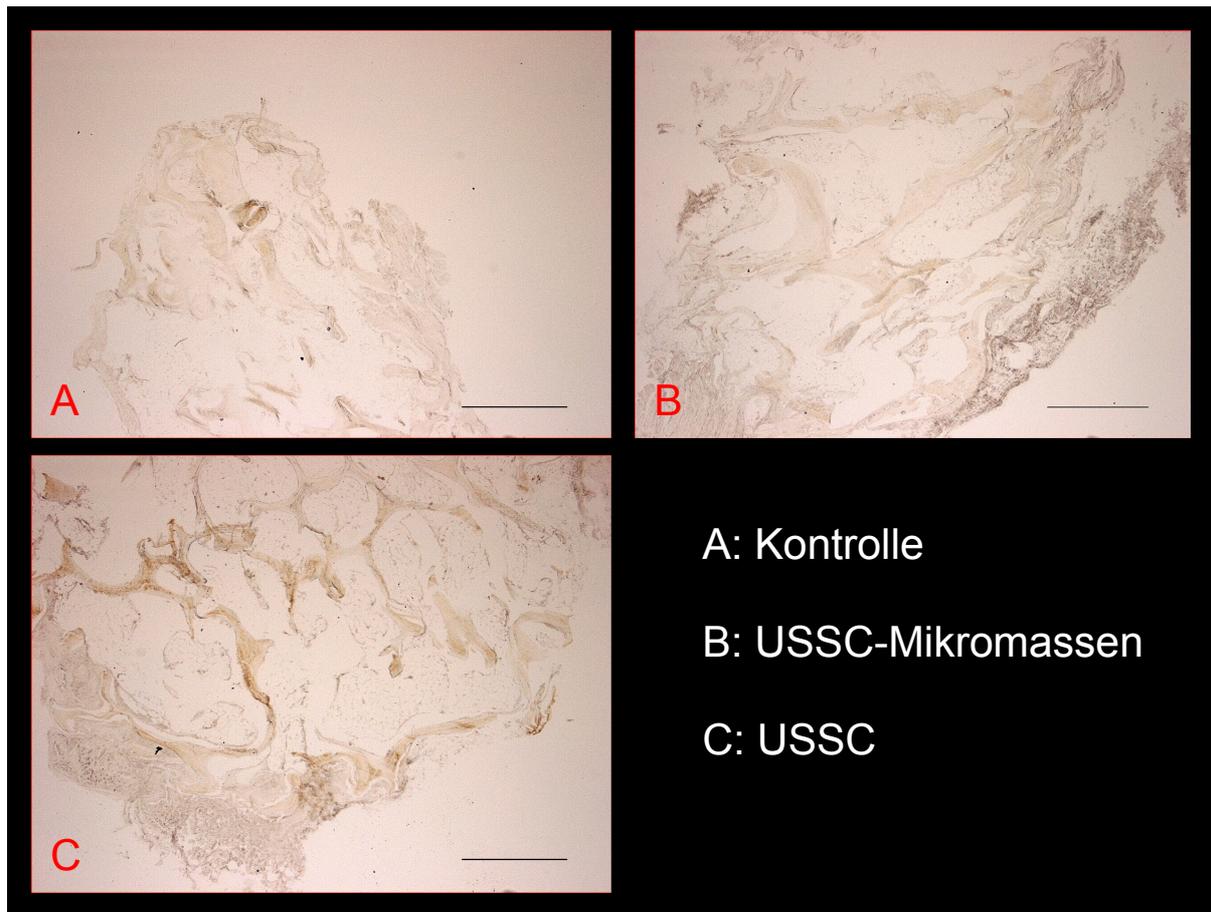


Abb. 10: 3 Monate nach Implantation: Die USSCs enthaltende Probe zeigt eine deutliche Osteocalcinentwicklung. Die Probe mit USSC-Mikromassen scheint nur geringfügig mehr Osteocalcin zu enthalten als die zellfreie Kontrollprobe.

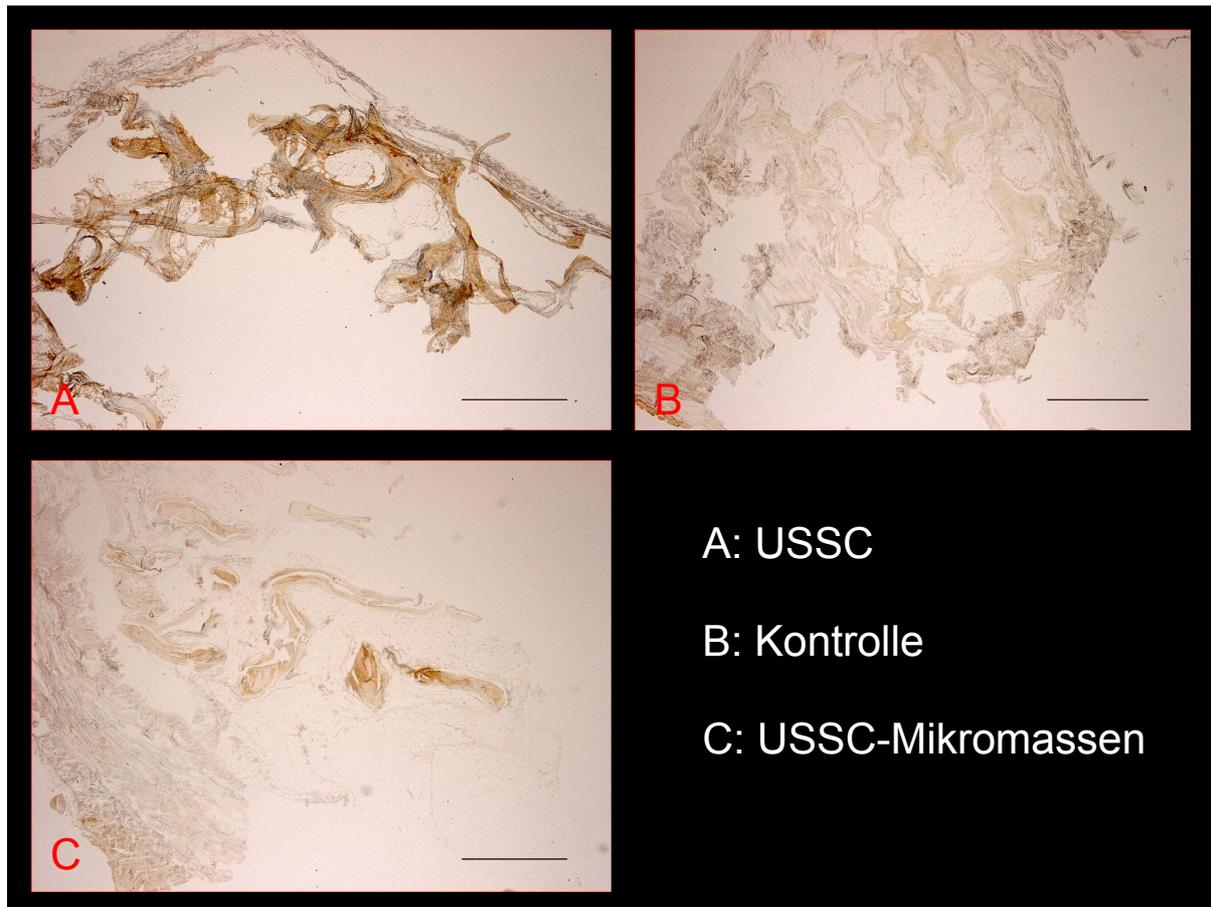


Abb. 11: 6 Monate nach Implantation: Es zeigt sich eine ausgeprägte Osteocalcinentwicklung in dem Transplantattyp mit USSCs. Die Probe, die USSC-Mikromassen enthält, zeigt zumindest stellenweise eine deutliche Entwicklung von Osteocalcin. Die Kontrolle hingegen scheint kein Osteocalcin gebildet zu haben.

4.2.2 Masson-Goldner-Färbung

Die Masson-Goldner-Färbung zeigte kein eindeutiges Ergebnis. So wiesen die USSCs zum ersten Explantationszeitpunkt die ausgeprägteste Osteoidbildung auf (Mittelwert 23,6 %). Die USSC-Mikromassen lagen mit einem Mittelwert von 17,4 % etwas darunter, zeigten aber bessere Ergebnisse als die ESCs (14,3 %). Erwartungsgemäß wiesen die Kontrollproben den geringsten Osteoidanteil auf (9,9 %) (Tab. 7).

Tab.7: Masson-Goldner-Auswertung. Mittelwerte des prozentualen Osteoidgehalts am ICBM-Probenkörper und Standardabweichungen der vier Transplantattypen zu den verschiedenen Explantationszeitpunkten. Mw=Mittelwert, Stabw.=Standardabweichung.

Explantation in Monaten <i>post implantationem</i>	USSCs Mw&Stabw.	USSC-Mikr. Mw&Stabw.	ESCs Mw&Stabw.	Kontrolle Mw&Stabw.
2	23,6 (18,9)	17,4 (15,4)	14,3 (15,4)	9,9 (10,4)
3	17,9 (16,7)	26,6 (13,1)	13,5 (16,7)	25,7 (20,7)
4	15,0 (14,0)	18,6 (6,7)	10,8 (6,7)	5,5 (6,9)
6	24,6 (16,5)	8,2 (1,5)	5,8 (7,0)	3,6 (3,9)

Zum zweiten Entnahmezeitpunkt, also circa drei Monate *post implantationem* wiesen die USSC-Mikromassen den höchsten Osteoidgehalt auf. Unerwarteter Weise ließen die Kontrollen eine nur unmaßgeblich geringere Osteoidbildung erkennen. Die USSCs zeigten deutlich niedrigere Werte, übertrafen aber noch die der ESCs. Beim Explantationszeitpunkt vier Monate nach Implantation lagen alle Werte unterhalb der Werte der vorherigen 2 Monate. Auch hier entwickelten die USSC-Mikromassen das meiste Osteoid, gefolgt von den USSCs, den ESCs und schließlich der Kontrollgruppe. Sechs Monate *post implantationem* war eine ausgeprägte Osteoidbildung bei den USSCs erkennbar, die anderen Transplantattypen wiesen eine nur sehr geringe Mineralisation auf.

Insgesamt ließ sich aber trotz einiger Unregelmäßigkeiten in den oben genannten Werten eine eindeutige Tendenz erkennen. Ein Vergleich der Mittelwerte zeigte, dass die Ergebnisse der USSCs und USSC-Mikromassen eindeutig höher waren als die Leerprobe und die der ESCs.

Die Kruskal-Wallis-Testung der Masson-Goldner-Färbung ergab zu drei Explantationszeitpunkten p-Werte kleiner 0,15, so dass keine Unterschiede in den Mittelwerten aller Probetypen bei dem gewählten Signifikanzniveau (95 %) zueinander angenommen werden können.

Der Whitney-Mann-Test sowie der Zweistichproben T-Test führten zu ähnlichen Ergebnissen. Bei diesen Tests wurden jeweils zwei Probetypen miteinander verglichen. So ergab sich zum Beispiel zum vierten Explantationszeitpunkt für den Vergleich zwischen den Leerproben mit den USSCs und den USSC-Mikromassen ein p-Wert von 0,032 respektive 0,042. Hier liegen statistisch signifikante Unterschiede bei dem gewählten 95 %-Signifikanzniveau vor. Auch zu den anderen Explantationszeitpunkten ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Beim zweiten

Explantationszeitpunkt führten die Ergebnisse zu signifikanten Unterschieden auf einem geringeren Signifikanzniveau.

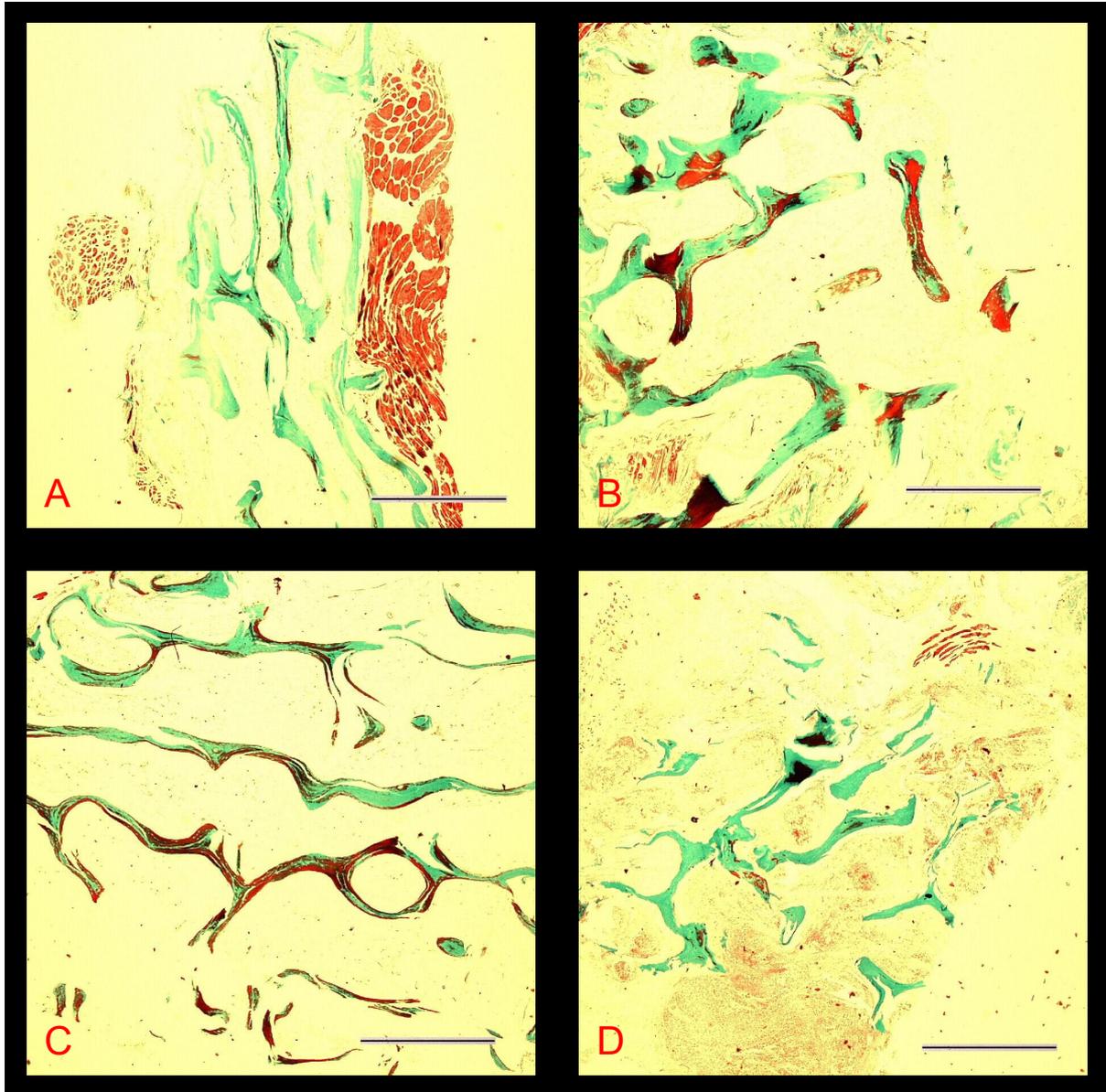


Abb.12: A: Zellfreie Kontrolle; B: USSC-Mikromassen; C: USSCs; D: ESCs; Probenentnahme 3 Monate *post implantationem*. Sowohl die USSCs als auch die USSC-Mikromassen zeigen eine deutliche Osteoidentwicklung (dunkel rot gefärbte Anteile). Die embryonale Stammzellen enthaltende Probe D weist eine minimale lokale Osteoidentwicklung auf. Dahingegen stellt sich die Kontrollprobe mit nur sehr geringer Osteoidentwicklung dar.

4.3 Laborchemische Ergebnisse

Die laborchemischen Untersuchungen bestätigten den klinischen Eindruck, dass die Ratten keinerlei systemische Entzündungen aufwiesen (Tab. 8). Das C-reaktive Protein war zu keinem Zeitpunkt erhöht. Alle Blutentnahmen zeigten ein, bis auf erwartet niedrige Lymphozytenwerte, normales Blutbild. Die Lymphozyten lagen unterhalb der Normwerte, da es sich bei den Versuchstieren um T-Zell-defiziente Ratten handelte.

Tab. 8: Laborparameter in Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Entnahmezeitpunkt <i>post implantationem</i>	Hämoglobin [g/dl]	Lymphozyten [$10^3/\text{mm}^3$]	Granulozyten [$10^3/\text{mm}^3$]	CRP [mg/dl]
1 Woche	13,31 + 1,52	0,51 + 0,35	2,3 + 0,69	<0,1
2 Monate	13,9 + 1,74	0,83 + 0,30	5,15 + 5,38	<0,1
3 Monate	14,2 + 0,58	0,59 + 0,27	2,21 + 0,50	<0,1
4 Monate	13,0 + 1,42	0,47 + 0,19	4,00 + 3,95	<0,1
Normalwerte	11,10 - 18,00	1,2 - 3,2	1,2 - 6,8	<0,1

5 Diskussion

Tissue Engineering von Knochen ist ein viel versprechendes Verfahren zur Therapie von Knochendefekten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, das zurzeit Gegenstand vieler Forschungsprojekte ist. Die drei wesentlichen Aspekte dabei sind die verwendeten Zellen, die Matrix und Wachstumsfaktoren beziehungsweise Stimulanzen [Naujoks et al., 2008]. Ziel dieser Arbeit war es, Tissue Engineering von Knochen unter Verwendung humaner Nabelschnurblutstammzellen (USSCs) zu untersuchen. USSCs als pluripotente Stammzellen sind seit einiger Zeit in das Blickfeld wissenschaftlicher Forschung gerückt [Degistirici et al., 2008; Kögler et al., 2004; Markov et al., 2007; Penolazzi et al., 2008].

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Nabelschnurblutstammzellen zur *In-vivo*-Knochenregeneration verwendet. Die USSCs wurden nicht nur als Monolayerkulturen sondern auch als Mikromassen, also dreidimensionale Kulturen, eingesetzt, um eventuelle Vor- oder Nachteile für das Tissue Engineering erkennen zu können. Zum Vergleich wurden embryonale Stammzellen (ESCs) von der Maus und zellfreie Probenkörper benutzt. Als Tiermodell diente die RNU-Ratte, die aufgrund ihrer T-Zell-Defizienz xenogene Transplantate toleriert. Die verwendeten ICBM Probenkörper mit den oben beschriebenen Zellarten bzw. die zellfreien Kontrollproben wurden in vorpräparierte Muskeltaschen implantiert, um den Zellen eine gut vaskularisierte Umgebung zu bieten. Nach einer Woche, einem, zwei, drei und vier Monaten wurden CT-Bilder angefertigt, um die Calciumhydroxylapatitbildung beurteilen zu können. Zusätzlich wurde zwei, drei, vier und sechs Monate *post implantationem* jeweils ein Teil der Versuchstiere geopfert, um histologische Untersuchungen der Proben durchzuführen und damit die Knochenentwicklung zu erfassen.

5.1 Calciumhydroxylapatitbildung

Die radiologische Auswertung lieferte beeindruckende Ergebnisse. Verglichen mit den ESCs und den Kontrollen ließ sich in den Proben, die USSCs und USSC-Mikromassen enthielten, hochsignifikant mehr Calciumhydroxylapatit nachweisen.

Der zeitliche Ablauf der CaHa-Bildung ist dabei interessant. Eine Woche nach Implantation der Zellen ließ sich im CT noch kein Calciumhydroxylapatit darstellen. Dies entsprach den Erwartungen, da davon ausgegangen werden musste, dass die Zellen eine gewisse Zeit brauchen, um sich zu differenzieren und dadurch CaHa überhaupt erst bilden zu können. Bereits zum zweiten Messzeitpunkt ließen sich deutliche Veränderungen erkennen. Zwei Monate *post implantationem* war der Calciumhydroxylapatitgehalt in den USSC-Probenkörpern auf über 29 mg angestiegen. Die USSC-Mikromassen enthielten im Mittel 22,6 mg CaHa. Es zeigte sich ein beträchtlicher Unterschied zu den ESCs (0,3 mg) und der zellfreien Kontrollgruppe (0,1 mg). Es kann also geschlussfolgert werden, dass eine Korrelation zwischen den Nabelschnurblutstammzellen, sowohl als Monolayer als auch in Form von Mikromassen, und dem Calciumhydroxylapatitgehalt besteht.

Die Menge an CaHa in den vier verschiedenen Probengruppen veränderte sich im Laufe der weiteren drei Monate nicht wesentlich. Vier Monate nach Implantation ließen sich in den USSCs enthaltenden Probenkörpern im Durchschnitt 32,2 mg CaHa nachweisen, in den Proben der USSC-Mikromassen 20 mg. Verglichen dazu zeigten auch nach vier Monaten die ESCs (1,8 mg) und die Kontrollproben (0,1 mg) quasi keine Calciumhydroxylapatitentwicklung.

Ursache dafür, dass sich kaum Veränderungen des CaHa-Gehaltes zwischen einem und vier Monaten *post implantationem* nachweisen ließen, könnte sein, dass die osteogen vordifferenzierten Stammzellen sich sehr schnell zu Osteoblasten differenzieren. Damit würde die Knochenbildung früh beginnen und den frühen Anstieg des Calciumhydroxylapatits erklären. Dass nach dem zweiten Monat kaum noch CaHa gebildet wurde, führt zu der Annahme, dass die Osteoblasten ihr Potential bereits ausgeschöpft haben und die erreichbare Menge an Calciumhydroxylapatit gebildet wurde. Eine mögliche Bestätigung dieser Theorie liefert eine Studie von Jäger et al. Die Arbeitsgruppe konnte im Tierexperiment mit RNU-Ratten ebenfalls positive Effekte von USSCs im Zusammenhang des Tissue Engineerings von Knochen zeigen. Vier Wochen nach Implantation konnten nicht nur verbesserte Knochenheilungsraten unter Verwendung von USSCs nachgewiesen werden, sondern zusätzlich auch lebende menschliche Zellen innerhalb, aber auch außerhalb des verwendeten Scaffolds. Allerdings wurden die humanen USSCs im Laufe der Zeit vom Organismus des Empfängers getötet, was vermutlich an der zunehmenden HNA (= human nuclear antigen)-Expression der USSCs lag [Jäger et

al., 2007]. Dies kann erklären, warum diese Studie den Eindruck erweckte, dass sich anfänglich gute Ergebnisse mit USSCs erzielen lassen, diese aber nach einiger Zeit stagnieren. Wenn auch im vorliegenden Tierexperiment die humanen Zellen nach einer gewissen Zeit im Rahmen einer Host-versus-graft-Reaktion vernichtet wurden, ist zu verstehen, dass damit auch die weitere Knochenentwicklung begrenzt ist.

Interessanterweise scheinen die USSC-Mikromassen keinen Vorteil gegenüber den Monolayer-USSCs zu bieten. Vergleicht man die Werte über die vier Explantationszeitpunkte hinweg, lässt sich erkennen, dass die USSCs zu jedem Zeitpunkt durch einen höheren CaHa-Gehalt gekennzeichnet sind als die USSC-Mikromassen. Mögliche Ursachen dafür werden in 5.5 diskutiert.

5.2 Osteocalcinbildung

Osteocalcin zählt zu den nicht-kollagenen Proteinen, die zusammen mit Kollagen I den organischen Teil des Knochens ausmachen. Es wird von Osteoblasten synthetisiert und kann als osteoblastenspezifischer Marker bezeichnet werden. Die im Bindegewebe vorkommenden Fibroblasten weisen verglichen mit Osteoblasten sehr ähnliche Merkmale auf, bilden aber kein Osteocalcin [Löffler et al., 2003]. Der erfolgreiche Nachweis von Osteocalcin liefert also den histologischen Anhalt, dass sich funktionstüchtige Osteoblasten entwickelt haben.

Die Transplantate zeigten zwei Monate *post implantationem* nur eine geringe Osteocalcinbildung sowohl in den USSCs, den USSC-Mikromassen als auch in den zellfreien Kontrollproben. Bereits einen Monat später, folglich drei Monate nach Implantation, ließ sich eine transplantattypabhängige Osteocalcinentwicklung erkennen. Dabei wiesen die USSCs und auch die USSC-Mikromassen einen signifikant höheren Osteocalcingehalt ($p=0,016$ bzw. $p<0,01$) auf als die Kontrollproben. 85,7 % der USSC-Mikromassen zeigten eine Osteocalcinbildung zwischen 11 und 50 %. Bei 75 % der USSCs konnte eine deutliche Osteocalcinentwicklung nachgewiesen werden. Davon enthielten 62,5 % Werte zwischen 11 und 50 %, die restlichen 12,5 % erreichten sogar einen Osteocalcingehalt von über 50 %. Es wird also deutlich, dass die Osteocalcinbildung eine gewisse Zeit benötigt, um sich zu entwickeln. Der zeitliche Verlauf der

Osteocalcinentwicklung, der sich in unserer Versuchsreihe zeigte, deckt sich mit Beobachtungen von Davies et al., die zeigen konnten, dass Osteocalcin in der fortgeschrittenen Phase der Mineralisierung exprimiert wird. Es dient scheinbar der Osteoklastenaktivierung und fördert damit Umbauprozesse am Knochen [Davies et al., 1996].

Die Bewertungen der Proben der letzten beiden Explantationszeitpunkte fielen aufgrund mangelnder Probenanzahl ungenau aus. So verblieben zu den Entnahmezeitpunkten vier und sechs Monate *post implantationem* nur jeweils vier Versuchstiere. Aufgrund zu geringer Population können statistische Aussagen für diese beiden Zeitpunkte nicht auf Signifikanz geprüft werden. Es zeigten sich beim dritten Explantationszeitpunkt ausgeprägte Osteocalcinanreicherungen in den USSCs enthaltenden Proben, allerdings auch in den Leerproben. Da allerdings nur drei USSC-Proben und sogar nur zwei zellfreie Kontrollproben untersucht werden konnten, können die Ergebnisse nicht als aussagekräftig bewertet werden. Ähnliches lässt sich für den letzten Entnahmezeitpunkt nach sechs Monaten sagen. Auch wenn eine zu geringe Stichprobe untersucht wurde, um relevante Aussagen machen zu können, ließ sich trotzdem erkennen, dass die USSCs die höchste Osteocalcinbildung aufwiesen. Betrachtet man sämtliche Proben zu allen Explantationszeitpunkten, kommt man zu dem Schluss, dass die USSCs die besten Werte zeigen, gefolgt von den USSC-Mikromassen. Die Leerproben wiesen die geringsten Mengen an Osteocalcin auf. Die zwei Leerproben, die nach sechs Monaten explantiert und hochpositiv auf Osteocalcin gefärbt wurden, sind dabei als „Ausreißer“ zu bewerten, die aufgrund der geringen Stichprobenanzahl entstanden sind.

5.3 Osteoidbildung

Osteoid ist die von Osteoblasten sezernierte unmineralisierte Knochengrundsubstanz. In den hier präsentierten Versuchen wurde es mittels der Masson-Goldner-Färbung dargestellt. Wie oben beschrieben, lieferte die Auswertung der histologischen Schnitte in diesem Fall kein eindeutiges Ergebnis. So zeigte sich weder ein Transplantattyp, der durchgehend signifikant höhere Werte aufwies, noch

war innerhalb der einzelnen Transplantattypen zeitlich gesehen eine eindeutige Vermehrung – oder auch Verringerung – des Osteoidgehalts festzustellen. Aufgrund der deutlich nachweisbaren positiven Ergebnisse, die sowohl die CT-Auswertungen als auch die Osteocalcindetektion erkennen ließen und die auch mittels einer Alizarin Rot-Färbung in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurden, muss man zu dem Schluss kommen, dass die Methode der Osteoiddarstellung durch die Masson-Goldner-Färbung in unserem Fall nicht funktioniert hat. Eine Erklärung dafür kann sein, dass die Stichprobe zu klein war und dadurch einzelne „Ausreißer“ das Gesamtergebnis verfälscht haben. Zu den letzten beiden Explantationszeitpunkten standen maximal vier, teilweise nur zwei Proben zur Auswertung zur Verfügung. So konnten statistisch aussagekräftige Angaben nicht getätigt werden. Ein anderer Grund kann sein, dass die Masson-Goldner-Färbung eine für unsere Zwecke nicht geeignete Methode der Färbung darstellt. Bisher unbekannte Gründe könnten dafür verantwortlich sein, dass die Färbemethode mit den Geweben und Zellen in unseren histologischen Schnitten nicht einwandfrei interagiert hat und es somit zu den unerwarteten Ergebnissen gekommen ist.

5.4 Klinische Bedeutung des Tissue Engineering mit USSCs

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie oben erläutert, im Rahmen des osteogenen Tissue Engineerings sowohl in den computertomographischen als auch in den histologischen Untersuchungen einen signifikanten Vorteil der USSCs verglichen mit ESCs beziehungsweise zellfreien Proben. Interessanterweise wurde Anfang 2010 eine ähnliche Studie zum Thema Tissue Engineering von Knochen durch humane Nabelschnurblutstammzellen in China veröffentlicht [Liu et al., 2010]. Dort wurden ebenfalls athymen Ratten als Versuchstiere benutzt, um die Heilung von Knochendefekten im *Os parietale* mit USSCs und demineralisierter Knochenmatrix zu untersuchen. Die osteogene Differenzierung wurde histologisch durch eine Alizarin Rot-Färbung nachgewiesen. Zusätzlich wurde der Calciumgehalt der Proben mittels CT bestimmt. Bilateral wurden im Durchmesser 5 mm große Defekte einerseits mit demineralisierter Knochenmatrix und andererseits mit USSCs beimpfter demineralisierter Knochenmatrix behandelt. Nach sechs Wochen zeigte

sich im CT bei den USSCs enthaltenden Probekörpern eine Knochenentwicklung, die bei der zellfreien Kontrolle nicht nachgewiesen werden konnte. 12 Wochen *post implantationem* waren 78,19 % (\pm 6,45 %) des Defektes in den USSCs aufweisenden Proben geheilt. Bei der Implantation der reinen Knochenmatrix ließ sich nur eine randständige Knochenentwicklung nachweisen. Auch die Histologie zeigte nach 12 Wochen einen deutlichen Unterschied. So wiesen die USSC-Proben trabekuläre Knochenverbindungen auf, während die Kontrollproben rein fibröse Verbindungen entwickelt hatten [Liu et al., 2010]. Diese Untersuchung bestärkt die in dieser Arbeit gemachten positiven Beobachtungen im Bereich des osteogenen Tissue Engineerings unter Verwendung humaner Nabelschnurblutstammzellen.

Es lassen sich weitere Beispiele in der Literatur finden, die ebenfalls positive Ergebnisse mit Stammzellen aus Nabelschnurblut im Bereich des Tissue Engineerings erzielen konnten. Chang et al. konnten bereits 2006 nachweisen, dass das osteogene Potential von mesenchymalen Zellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden, höher ist als das von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark [Chang et al., 2006].

Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird Tissue Engineering in Zukunft eine wichtige Bedeutung in der regenerativen Medizin und im Bereich der rekonstruktiven Verfahren erlangen. Dabei werden pluripotente Stammzellen von entscheidender Relevanz sein. Nabelschnurblutstammzellen verfügen über diverse positive Eigenschaften, die sie als Zellen zur Grundlage für das Tissue Engineering interessant machen. Ihre hohe Differenzierungskapazität und ihr großes Selbsterneuerungspotential bieten optimale Voraussetzungen für Tissue Engineering. Verglichen mit mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe oder Knochenmark entsteht bei der Entnahme von USSCs keine zusätzliche Morbidität für den Patienten. Außerdem fällt bei den USSCs die Proliferation, die bei MSCs nötig ist, weg. Sie stehen quasi ab dem Entnahmezeitpunkt zur Verwendung bereit. Eine Herausforderung, der sich die medizinische Forschung in den nächsten Jahren stellen muss, liegt in der Frage der Immunogenität von USSCs. Die aktuelle Datenlage zur Toleranz von transplantierten Nabelschnurblutstammzellen durch einen immunkompetenten Empfänger ist viel versprechend [Bradstock et al., 2006; Kleen et al., 2005]. In diesen Arbeiten zeigten die Autoren auch bei HLA-inkompatibler Transplantation nur gering ausgeprägte Immunreaktionen. Des Weiteren lassen die positiven Erfahrungen, die bereits in der Leukämiebehandlung

mit HLA-identischen USSC-Transplantationen gemacht wurden [Bachanova et al., 2008; Ishimura et al., 2005], darauf hoffen, dass die Nabelschnurblutstammzellen bereits in naher Zukunft auch Einzug in die klinischen Verfahren zur Knochenregeneration finden. Allerdings müssen die Entartungstendenzen von USSCs intensiver erforscht werden, um einen ungefährlichen Einsatz im medizinischen Alltag gewährleisten zu können. Die Datenlage dazu ist bisher noch relativ begrenzt, lässt aber auch in diesem Bereich auf ein positives Outcome hoffen [Kögler et al., 2004; Mann, 2007].

Bereits heute werden in den Blutbanken tausende routinemäßig HLA-gematchte Nabelschnurblutproben aufbewahrt, die entweder dem eigenen Spender oder aber auch fremden Empfängern mittels verschiedener Therapiemöglichkeiten dienen könnten. In der José Carreras Stammzellbank der Universität Düsseldorf befinden sich 16.000 kryokonservierte Präparate, mit Hilfe derer schon 561 Patienten behandelt wurden [<http://www.test.stammzellbank.de/>]. Die einfache Entnahmemethode bietet die Grundlage, diese Blutbanken weiter auszubauen und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit, HLA-gematchte Zellen für zukünftige Empfänger bereitstellen zu können.

5.5 Vergleich zwischen USSCs und USSC-Mikromassen

In den Versuchen zum osteogenen Tissue Engineering *in vivo* wurden sowohl Nabelschnurblutstammzellen, die in einer 2D Kultur kultiviert wurden, als auch so genannte Mikromassen verwendet. Dadurch sollte ein Vergleich des Potentials zur Knochenbildung zwischen den beiden Zellformen hergestellt werden. Die Mikromassen wurden getestet, da man sich einige Vorteile im Bereich des Tissue Engineerings erhofft. So könnte ihre Verwendung die Möglichkeit eröffnen, dass in Zukunft auf die umstrittenen Scaffolds verzichtet werden kann. Darüber hinaus präsentierten die Mikromassen in bisherigen Studien einige Verhaltensweisen, aufgrund derer wir sie für unsere Versuche als potentiell geeigneter eingestuft haben als die „normalen“ USSCs. Verglichen mit Monolayerkulturen spiegeln sie eher die *In-vivo*-Bedingungen der Zellen wider. Außerdem demonstrieren sie eine schnellere und ausgeprägtere osteoblastäre Differenzierung. Es lassen sich zusätzlich eine

erhöhte Alkalische Phosphatase Aktivität und eine gesteigerte Osteocalcin Expression aufweisen und die Mikromassen zeigen eine früher einsetzende Mineralisationsbereitschaft [Gerber et al., 2002].

Unsere Versuchsergebnisse wiesen allerdings einheitlich auf einen Vorteil der USSCs in Form der zweidimensionalen Zellkulturen hin. Sowohl in der radiologischen Untersuchung als auch im Osteocalcingehalt präsentierten die USSCs höhere Werte in Bezug auf die Mineralisierung als die USSC-Mikromassen. Ein Erklärungsmodell dafür liefert ein Aussprossungsversuch zu den USSC-Mikromassen, der ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde [Langenbach et al., 2009]. Dabei wurden angezüchtete Mikromassen, teilweise mit DAG osteogen vordifferenziert, in der Mitte von 24-well Zellkulturschalen platziert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Entfernung der ausgewanderten Zellen zu eben diesem Mittelpunkt der Kulturschalen gemessen. Es zeigte sich, dass die USSC-Mikromassen eine starke Tendenz zur Mineralisierung haben. Beobachtet wurde weiterhin, dass USSC-Mikromassen mit der Zeit zu einer Abnahme der Zellmigration neigen. Dabei ließ sich eine Abhängigkeit der Zellaussprossung von der Dauer der DAG-Inkubation nachweisen. Die Mikromassen, die nur einen Tag mit DAG vordifferenziert wurden, zeigten eine Aussprossung von 2568 μm (\pm 936 μm). Nach fünftägiger DAG-Inkubation wanderten die Zellen nur 1796 (\pm 652) μm von ihrer ursprünglichen Lokalisation aus. Zusätzlich konnte eine signifikant geringere Aussprossung bei den mit DAG vordifferenzierten Mikromassen verglichen mit den nicht-osteogen vordifferenzierten Mikromassen nachgewiesen werden. Es lässt sich also schlussfolgern, dass die Kultivierung mit DAG zwar die Mineralisierung fördert, gleichzeitig aber die Fähigkeit zum Auswandern herabsetzt. Gründe dafür können Kalziumeinlagerungen oder Akkumulation von Extrazellulärmatrix sein. Auch eine Veränderung der Zellproliferation durch die osteogene Differenzierung wäre eine Möglichkeit [Langenbach et al., 2009]. Die dargestellten Ergebnisse geben eine mögliche Erklärung dafür ab, warum die USSC-Mikromassen, die aufgrund ihrer vielen positiven Eigenschaften primär den Monolayer-USSCs überlegen zu sein scheinen, trotzdem die schlechteren Ergebnisse in dieser Arbeit erzielten. Es ist anzunehmen, dass die Zellen vermehrt in den Mikromassen eingeschlossen wurden und deswegen nur in geringerer Zahl in die Umgebung auswandern und dort als Osteoblasten Knochengewebe generieren konnten. Diese Annahme liefert eine Erklärung dafür, dass die dreidimensionalen USSC-Mikromassen trotz oben

Diskussion - *Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung in vivo*

genannter scheinbarer Vorteile im Bereich des osteogenen Tissue Engineering verglichen mit den zweidimensionalen USSCs schlechter abschneiden.

6 Zusammenfassung

Knochendefekte im Kiefer-/Gesichtsbereich führen häufig zu Funktionseinschränkung und zu einer ästhetischen Beeinträchtigung der Betroffenen. Die knöcherne Rehabilitation der Patienten stellt eine große Herausforderung für den behandelnden Arzt dar. Derzeitige Forschungsbestrebungen zielen auf die Suche nach alternativen Möglichkeiten zum autologen Knochentransplantat. Zellbasierte Knochenregenerations- und Knochenrekonstruktionsansätze sind dabei in den Fokus gerückt.

Die vorliegende Arbeit untersuchte das knöcherne Tissue Engineering mittels pluripotenter humaner Nabelschnurblutstammzellen (USSCs). Bei annähernd gleicher Potenz bestehen hier weniger ethische Vorbehalte und gesetzliche Restriktionen verglichen mit embryonalen Stammzellen (ESCs). Des Weiteren zeigten USSCs kein erhöhtes Entartungspotential und eine nur geringe Immunogenität. Dadurch ließen sie sich theoretisch auch für allogene Transplantationen nutzen. Nabelschnurblutstammzellen scheinen also optimale Voraussetzungen für das osteogene Tissue Engineering zu bieten.

Um die *In-vivo*-Bedingungen besser zu simulieren, wurden in der vorliegenden Arbeit neben den 2D USSC-Kulturen auch USSC-Mikromassen eingesetzt. Durch die in der Mikromassentechnik gebildete Extrazellulärmatrix hofft man, auf die kontrovers diskutierten Trägergerüste in Zukunft verzichten zu können. Zudem konnten positive Einflüsse bei der osteogenen Differenzierung osteoblastenähnlicher Zellen in Mikromassenkulturen nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit untersuchte das Potential der trägerbasierten Knochenbildung von USSCs verglichen mit ESCs und zellfreien Probenkörpern *in vivo*. Dazu wurden 27 RNU-Ratten jeweils 4 ICBM-Probenkörper mit osteogen vordifferenzierten USSCs, USSC-Mikromassen, ESCs und zellfreie ICBM-Träger als Kontrolle in eine Muskeltasche implantiert. Die Auswertung erfolgte sowohl radiologisch als auch histologisch.

Mittels Computertomographie wurde der Calciumhydroxylapatitgehalt (CaHa) in den Proben zu verschiedenen Zeitpunkten *post implantationem* ermittelt. Die Messungen wiesen eine eindeutige Korrelation zwischen CaHa-Menge und Implantationstyp nach. In den USSCs und USSC-Mikromassen enthaltenden Proben konnte hochsignifikant mehr CaHa nachgewiesen werden als in der Gruppe der ESCs oder in der Kontrollgruppe. Entgegen den Erwartungen enthielten die USSCs jedoch mehr

Calciumhydroxylapatit als die USSC-Mikromassen.

Die histologische Auswertung umfasste eine immunhistochemische Osteocalcin-Darstellung als osteoblastenspezifischer Marker und einen Nachweis von Osteoid durch die Masson-Goldner-Färbung. Die histologische Auswertung bestätigte die radiologischen Ergebnisse.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die humanen Nabelschnurblutstammzellen eine ausgeprägte Bereitschaft zur osteogenen Differenzierung und einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung haben. Entgegen den Erwartungen zeigte sich radiologisch und histologisch ein Vorteil auf Seiten der Monolayer-USSCs verglichen mit den ursprünglich als vorteilhafter eingeschätzten USSC-Mikromassen. Es ist anzunehmen, dass Tissue Engineering in Zukunft in der regenerativen Medizin und im Bereich der rekonstruktiven Verfahren an Bedeutung gewinnen wird. Dabei werden pluripotente Stammzellen von entscheidender Relevanz sein. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass Nabelschnurblutstammzellen aufgrund diverser positiver Eigenschaften eine viel versprechende Zellart für die Grundlage des Tissue Engineerings darstellen.

7 Literaturverzeichnis

Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004). Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. Clin Orthop Relat Res. 419:30-7.

Abbott, A (2003). Cell culture: biology's new dimension. Nature. 424, 870.

Aubin JE, Liu F (1996). The osteoblast lineage. In: Principles of Bone Biology. Bilezikian J, Raisz L, Rodan GA editors. San Diego: Academic Press, pp. 51-67.

Bachanova V, Weisdorf D (2008). Unrelated donor allogeneic transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: a review. Bone Marrow Transplant 41(5):455-64

Bilezikian J, Raisz L, Rodan GA (1996). Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press, Inc.

Binderman I, Fin N (1990). Bone substitutes organic, inorganic, and polymeric: Cell material interactions. In: CRC Handbook of Bioactive Ceramics. Yamamuro T, Hench L, Wilson J editors. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 45-51.

Benito, AI, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Sevilla J, Madero L (2004). Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. Bone Marrow Transplant. 33(7): 675-90.

Boudreau NJ, Jones PL (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. Biochem J. 339 (Pt 3) 481-8.

Bradstock KF, Hertzberg MS, Kerridge IH, Svenilson J, McGurgan M, Huang G, Antonenas V, Gottlieb DJ (2006). Unrelated umbilical cord blood transplantation for adults with haematological malignancies: results from a single Australian centre. Intern Med J 36(6):355-61.

- Chang YJ, Tseng CP, Hsu LF, Hsieh TB, Hwang SM (2006). Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. Cell Biol Int. 30(6):495-9.
- Chehroudi B, McDonnell, D, Brunette DM (1997). The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. J. Biomed. Mater. Res. 34: 279–90.
- Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL, Scott EW, Petersen BE (2003). An overview of stem cell research and regulatory issues. Mayo Clin Proc 78(8):993-1003.
- Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD (2005). Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. Exp. Cell Res 309:340-4.
- Davies JE (1996). *In vitro* modeling of the bone/implant interface. Anat Rec. 245(2):426-45.
- Degistirici O, Jäger M, Knipper A (2008). Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts. Cell Prolif 41(3):421-440.
- Depprich R, Handschel J, Sebald W, Kübler NR, Würzler KK (2005). Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants. Mund Kiefer Gesichtschir. 9:363-8.
- D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res. 14(7):1115-22.
- Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC, Edwards CC, Levine AM (1992). Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from posterior iliac crest for spinal fusion. Spine (Phila Pa 1976) 17(12): 1474-80.

Frenkel G, Niederdellmann H (1975). Use of compact aluminum oxide ceramics for reconstruction of the temporomandibular joint. Quintessenz 26(11):37-44.

Gerber I, ap Gwynn I (2001). Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells *in vitro*. Eur Cell Mater 2:10-20.

Gerber I, ap Gwynn I (2002). Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures. Eur Cell Mater. 3:19-30.

Hall BK, Miyake T (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays 22(2):138-47.

Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U (2002). TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. Biomaterials 23(7):1689-95.

Handschel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kübler NR, Meyer U (2006). Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. Int J Oral Maxillofac Implants 21(6):890-8.

Handschel J (2007a). Untersuchungen zur Eignung embryonaler Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen (Habilitationsschrift). Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.

Handschel J, Depprich R, Kubler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U (2007b). Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. Head Face Med. 3:4.

Handschel J, Berr K, Depprich RA, Kübler NR, Naujoks C, Wiesmann HP, Ommerborn MA, Meyer U (2008). Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. Head Face Med. 4:10.

- Handschel J, Berr K, Depprich R, Naujoks C, Kübler NR, Meyer U, Ommerborn M, Lammers L (2009). Compatibility of embryonic stem cells with biomaterials. J Biomater Appl. (6):549-60
- Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C (2002). Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. Neurosurgery 50(3):510-6; discussion 516-7.
- Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage *in vitro*. J Bone Miner Res. 19(9):1379-94.
- Holmes SB, Lloyd T, Coghlan KM, Newman L (2002). Distraction osteogenesis of the mandible in the previously irradiated patient. J Oral Maxillofac Surg. 60:305-9.
- Horch HH (1998). Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II. 3. Auflage. Verlag: Urban&Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore.
- Hutmacher DW (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 21(24):2529-43.
- In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells 22:1338-45.
- Ishimura M, Ohga S, Nomura A, Toubou T, Morihana E, Saito Y, Nishio H, Ide M, Takada H, Hara T (2005). Successful umbilical cord blood transplantation for severe chronic active Epstein-Barr virus infection after the double failure of hematopoietic stem cell transplantation. Am J Hematol 80(3):207-12.
- Jäger M, Degistirici O, Knipper A, Fischer J, Sager M, Krauspe R (2007). Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. J Bone Miner Res. 22(8):1224-33.

- Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM (2001). A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. Dentomaxillofac Radiol. 30:157-61.
- Kleen TO, Kadereit S, Fanning LR, Jaroscak J, Fu P, Meyerson HJ, Kulchyski L, Slivka LF, Kozik M, Tary-Lehmann M, Laughlin MJ (2005). Recipient-specific tolerance after HLA-mismatched umbilical cord blood stem cell transplantation. Transplantation 80(9):1316-22.
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med. 200(2):123-35.
- Kübler NR, Reuther JF, Faller G, Kirchner T, Ruppert R, Sebald W (1998). Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. Int J Oral Maxillofac Surg. 27(4):305-9.
- Langenbach F, Naujoks C, Kersten-Thiele PV, Berr K, Depprich R, Kübler N, Kögler G, Handschel J (2009). Osteogenic differentiation influence stem cell migration out of scaffold free microspheres. Tissue Eng Part A. [Epub ahead of print]
- Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. Science 260(5110):920-6.
- Leake DL, Habal MB (1976). Craniofacial contour defect reconstruction with a dacron/urethane composite: an alloplastic tray for bone induction fabrication and application. J Biomed Mater Res. 10(4):555-60.
- Liu GP, Li YL, Sun J, Cui L, Zhang WJ, Cao YL (2010). Repair of calvarial defects with human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells and demineralized bone matrix in athymic rats. Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi (Chinese journal of plastic surgery). 26(1):34-8

Löffler G, Petrides PE (2003). Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg - New York.

Lüllmann-Rauch R (2003). Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.

Mann, Jin (2007). Untersuchung des Differenzierungspotenzials der USSC *in vitro* und *in vivo* im Hühnerembryomodell (Promotionsschrift). Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Markaki AE, Clyne W (2004). Magneto-mechanical stimulation of bone growth in a bonded array of ferromagnetic fibres. Biomaterials 25(19): 4805-15.

Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B (2007). Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. Stem Cells Dev 16(1):53-73.

McCulloch CA, Strugurescu M, Hughes F, Melcher AH, Aubin JE (1991). Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. Blood 77(9):1906-11.

Meyer U, Meyer T, Wiesmann HP, Stratmann U, Kruse-Losler B, Maas H, Joos U (1999a). The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. J Oral Maxillofac Surg. 57(11):1331-9; discussion 1340-1.

Meyer U, Wiesmann HP, Kruse-Losler B, Handschel J, Stratmann U, Joos U (1999b). Strain-related bone remodeling in distraction osteogenesis of the mandible. Plast Reconstr Surg. 103(3):800-7.

Meyer U, Joos U, Wiesmann HP (2004). Biological and biophysical principles in extracorporeal tissue engineering Part II . Int J Oral Maxillofac Surg. 33:523-30.

- Meyer U, Wiesmann HP (2005). Tissue Engineering: a challenge of today's medicine. Head Face Med. 1:2.
- Moosmann S, Hutter J, Moser C, Krombach F, Huss R (2005). Milieuadopted *in vitro* and *in vivo* differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs* 179:91-101.
- Naujoks C, Depprich R, Handschel J (2008). Aktueller Stand des osteogenen Tissue Engineerings. Zahnärztliche Mitteilungen 98(19):44-51.
- Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich R, Kübler N, Meyer U, Handschel J (2010). Biocompatibility of Osteogenic Predifferentiated Human Cord Blood Stem Cells with Biomaterials and the Influence of the Biomaterial on the Process of Differentiation. J Biomater Appl OnlineFirst
- Ng AM, Saim AB, Tan KK, Tan GH, Mokhtar SA, Rose IM, Othman F, Idrus RB (2005). Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. J Orthop Sci. 10(2):192-9
- Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW (2001). Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. Clin Oral Implants Res. 12(5):495-502.
- Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW (2004). Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. Int J Oral Maxillofac Surg. 33(2):157-63.
- Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT (2009). Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. Panminerva Med. 51:25-41.

- Penolazzi L, Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Vesce F, Gambari R, Piva R (2008). Evaluation of chemokine and cytokine profiles in osteoblast progenitors from umbilical cord blood stem cells by BIO-PLEX technology. Cell Biol Int 32(2):320-5.
- Perry CR (1999). Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. Clin Orthop Relat Res. (360):71-86.
- Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2006). Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering. Int J Oral Maxillofac Implants 21(2):225-31.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284:143-7.
- Pochon JP, Kloti J (1991). Cranioplasty for acquired skull defects in children - a comparison between autologous material and methylmethacrylate 1974-1990. Eur J Pediatr Surg. 1(4):199-201.
- Pretorius JA, Melsen B, Nel JC, Germishuys PJ (2005). A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. Int J Oral Maxillofac Implants 20(3):387-98.
- Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch (2007). 261. Auflage. Verlag: Walter de Gruyter GmbH&CoKG, Berlin - New York.
- Quarto R, Thomas D, Liang CT (1995). Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. Calcif Tissue Int. 56(2):123-9.
- Rocha V, Gluckman E (2007). Outcomes of transplantation in children with acute leukaemia. Lancet 369(9577):1906-8.
- Rodan GA (1992). Introduction to bone biology. Bone 13 Suppl 1:3-6.

- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Ichinose S, Shinomiya K, Muneta T (2004). Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. Blood 104:2728-35.
- Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C (2005). Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. J Spinal Disord Tech. 18 Suppl 77-81.
- Schwenzer N, Ehrenfeld M (2002). Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. Band 2. Spezielle Chirurgie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 364:149-55.
- Smolka W, Eggensperger N, Carollo V, Ozdoba C, Iizuka T (2006). Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. Clin Oral Implants Res. 17:149-55.
- Smolka W, Iizuka T (2005). Surgical reconstruction of maxilla and midface: clinical outcome and factors relating to postoperative complications. J Craniomaxillofac Surg. 33(1):1-7.
- Stein, GS, Lian JB, Owen TA (1990). Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB 4:3111-23.
- Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S, Polak JM (2004). Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. J Cell Biochem. 93(3):454-62.

- Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR (2001). Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. Int J Oral Maxillofac Surg. 30(5): 373-9.
- Trounson A (2002). Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. Reprod Biomed Online 4 Suppl 1:58-63.
- van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB (2002). Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. Osteoarthritis Cartilage 10(8):631-7.
- Welsch (2006). Lehrbuch Histologie. 2. Auflage. ©Elsevier, Urban&Fischer Verlag, München - Jena.
- Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. Int J Oral Maxillofac Surg. 33(6):523-30.
- Wulf GG, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G, Trümper L (2004). Mesengenic progenitor cells derived from human placenta. Tissue Eng 10(7-8):1136-47.
- Würzler, Kristian (2003). Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochengewebe in ausgedehnten Defekten (Habilitationsschrift). Würzburg, Julius-Maximilians-Universität
- Zernik J, Twarog K, Upholt WB (1990). Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. Differentiation 44(3):207-15.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001). *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19(12):1129-33.

zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ (2005). Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. BMC Dev Biol. 5:1.

8 Anhang

Übersichtstabelle

Nummer	OP-Tag:	Opfertag:	vorne links	hinten links	vorne rechts	hinten rechts	Besonderheit:
1	01.10.2007	07.12.2007	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
2	01.10.2007	07.12.2007	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
3	01.10.2007	07.12.2007	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
4	01.10.2007	04.01.2008	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
5	01.10.2007	04.01.2008	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
6	01.10.2007	04.01.2008	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	Vorne rechts kein PK gefunden
7	01.10.2007	02.04.2008	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
8	01.10.2007	02.04.2008	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	
9	01.10.2007	02.04.2008	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	Vorne links und hinten links fehlt
10	02.10.2007	04.01.2008	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	vorne rechts klinisch V.a. Tumor
11	02.10.2007	04.01.2008	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
12	02.10.2007	04.01.2008	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
13	02.10.2007	08.02.2008	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
14	02.10.2007	08.02.2008	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
15	02.10.2007	08.02.2008	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
16	02.10.2007		PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	Ratte verstorben
17	02.10.2007	07.12.2007	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
18	02.10.2007	07.12.2007	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	PK-USSC Mikr.	
19	04.10.2007	08.02.2008	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	
20	04.10.2007	02.04.2008	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	Vorne links, vorne rechts, hinten rechts fehlt
21	04.10.2007		PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	Ratte verstorben
22	04.10.2007	04.01.2008	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	
23	04.10.2007	04.01.2008	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	
24	04.10.2007	04.01.2008	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	
25	04.10.2007	07.12.2007	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	
26	04.10.2007	07.12.2007	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	Teratom hinten rechts, kein PK auffindbar
27	04.10.2007	07.12.2007	PK-USSC Mikr.	PK-USSC	PK-Kontrolle	PK-ESC	

Radiologische Auswertung

Ca-Gehalt	1 Wo	1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate	
USSC	0	29,1	27,8	29,8	32,2	Mittelw
USSC	0	2,3	2,9	2,9	2,6	Stabw
USSC-Mikronn	0	22,6	22,2	20,1	20	Mittelw
USSC-Mikronn	0	2,4	2,7	3,1	4,2	Stabw
ESC	0	0,3	1	0,7	1,8	Mittelw
ESC	0	0,1	0,4	0,4	1,3	Stabw
Kontrolle	0	0,1	0,1	0,1	0,1	Mittelw
Kontrolle	0	0,1	0,07	0,07	0,1	Stabw

Osteocalcin Auswertung

0: 0-10 % angefärbt

1: 10-50 % angefärbt

2: mehr als 50 % des Kollagens angefärbt

Leerprobe

07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
0	0	2	2
0	0	2	0
0	0		
0	0		
1	0		
1	0		
0	0		
0	1		

USSC

07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
0	0	2	2
0	1	2	2
0	1	1	1
1	0		2
1	1		
0	2		
1	1		
	1		

USSC-Mikromassen

07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
1	0	1	2
0	1	0	1
1	1	1	1
0	1		
1	1		
0	1		
	1		

Masson-Goldner Auswertung

ESC

07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
1,35	18,55	3,78	0,84
3,2	7,8	17,17	10,72
18,41	2,53	11,51	
34,28	2,8		
	8,73		
	55,47		
	16,06		
	1,86		
	7,95		
14,31	13,53	10,82	5,78 Mittelwert
15,35	16,77	6,72	6,99 Standardabw
235,67	281,24	45,18	48,81 Varianz

Leerprobe

07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
5,07	30,35	13,38	6,37
0,74	8,39	0,88	0,8
16,06	39,93	2,29	
11,56	14,82		
9,07	41,38		
0,64	60,8		
3,83	7,64		
32,05	2,46		
9,88	25,72	5,52	3,59 Mittelwert
10,43	20,65	6,85	3,94 Standardabw
108,83	426,61	46,87	15,51 Varianz

USSC

07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
0,00	42,80	6,20	7,47
51,22	16,41	0,33	16,35
5,57		29,68	29,07
15,82	0,17	23,84	45,36
20,12	41,70		
19,87	21,81		
51,19	2,74		
25,08	4,69		
	13,06		
23,61	17,92	15,01	24,56 Mittelwert
18,88	16,67	13,98	16,46 Standardabw
356,41	278,01	195,43	270,82 Varianz

Anhang - Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung in vivo

USSC-Mikromassen

	07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
	1,18	33,75	11,58	6,48
	4,26	21,28	22,83	9,07
	19,90	9,62	14,29	8,93
	47,51	42,63	25,57	
	11,61	21,73		
	22,85	42,56		
	27,05	9,93		
	4,72	31,04		
	17,39	26,57	18,57	8,16 Mittelwert
	15,43	13,10	6,69	1,46 Standardabw
	237,96	171,53	44,78	2,12 Varianz

Statistik der histologischen Auswertung

Masson-Goldner-Färbung

Mittelwerte	07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
Leerprobe	9,88	25,72	5,52	3,59
ESC	14,31	13,53	10,82	5,78
USSC	23,61	17,92	15,01	24,56
USSC Mikr	17,39	26,57	18,57	8,16

Osteocalcin-Detektion

Kruskal-Wallis Test	07. Dez	04. Jan	08. Feb	02. Apr
p-Wert	5,33	14,16	3,32	5,87
	0,149	0,003	0,345	0,118

Whitney-Mann U Test

Leerprobe vs. ESC	-0,510	-1,155	-1,091	-0,775
Leerprobe vs. USSC	-2,199	-0,525	-0,707	-1,852
Leerprobe vs. USSC Mikr	-1,155	-0,630	-1,768	-1,732

	04. Jan
Leerprobe vs. USSC	-2,152931
Leerprobe vs. USSC Mikr	-2,372414

p-Wert

Leerprobe vs. ESC	0,309	0,125	0,138	0,221
Leerprobe vs. USSC	0,014	0,305	0,242	0,032
Leerprobe vs. USSC Mikr	0,125	0,268	0,039	0,042

Leerprobe vs. USSC	0,016
Leerprobe vs. USSC Mikr	0,009

T-Test

Leerprobe vs. ESC	-0,589	1,342	-0,957	-0,387
Leerprobe vs. USSC	-2,322	0,831	-1,083	-1,777
Leerprobe vs. USSC Mikr	-1,140	-0,098	-2,528	-1,833

p-Wert

Leerprobe vs. ESC	---	---	0,340	---
Leerprobe vs. USSC	0,035	---	0,310	0,115
Leerprobe vs. USSC Mikr	0,272	---	0,035	0,100

9 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir bei der Erstellung der Arbeit geholfen haben. In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Jörg Handschel für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Naujoks für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung über die gesamte Zeit meiner Arbeit. Auch Frau Dr. Karin Berr, Frau Juliane Hartmann und Herrn Fabian Langenbach möchte ich danke sagen, da sie immer da waren, wenn Fragen im Labor auftraten.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. G. Kögler, José Carreras Stammzellbank der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf für die Bereitstellung der USSCs bedanken und bei Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer, Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, der freundlicherweise die murinen ESCs zur Verfügung stellte.

Und nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und bei meinem Freund, Markus Klevers, für den Rückhalt während der Zeit, in der ich mich mit dieser Arbeit befasst habe.

10 Lebenslauf

Vorname: Malin Johanna
Nachname: Roeb
Geburtsdatum: 19.08.1984
Geburtsort: Aachen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1995 – 2004 Viktoriaschule Aachen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/ 2001 - 02/2002 HB Woodlawn High School, Arlington, Virginia, USA

Studium

10/2004 - 05/2011 Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02 – 06/2009 Auslandssemester, Università degli Studi di Parma, Italien
02 – 06/2010 1. Tertial des Praktischen Jahres, Anästhesiologie, Universitätsklinik Düsseldorf
06 - 10/2010 2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Università degli Studi di Verona, Italien
10/2010 - 01/2011 3. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Universitätsklinik Düsseldorf
05/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinische Ausbildung

07/2005 Pflegepraktikum im St. Franziskus Krankenhaus, Aachen
02 – 03/2006 Pflegepraktikum in der Itertal-Klinik, Aachen
02/2007 Famulatur, Klinik für Frauenheilkunde, Senologie und Geburtshilfe, Marienhospital Aachen
07/2007 Famulatur, Klinik für Frauenheilkunde, Senologie und Geburtshilfe, Marienhospital Aachen

Lebenslauf - *Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung in vivo*

08/2007	Famulatur, Notaufnahme des Universitätsklinikum Aachen
02/2008	Gynäkologiepraktikum im Evangelischen Krankenhaus, Düsseldorf
03/2008	Famulatur, Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf
07/2008	Famulatur, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Aachen
08/2008	Famulatur, Notaufnahme des Universitätsklinikum Aachen
08/2009	Hausarztpraktikum, Erkelenz

Fremdsprachen

Englisch (verhandlungssicher)

Italienisch (fortgeschritten, Level B2 abgeschlossen)

Französisch (Grundkenntnisse)