

Aus der Klinik für Orthopädie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Krauspe

**Effekte von Rivaroxaban und Enoxaparin auf die osteogene
Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Silvia Jasmin Mrotzek

2017

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Krauspe

Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Germing

We all have dreams. But in order to make dreams come into reality, it takes an awful lot of determination, dedication, self-discipline, and effort.

James Cleveland "Jesse" Owens (Amerikanischer Leichtathlet, 1913-1980)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Mrotzek SJ*, Pilge H*, Fröbel J*, Fischer JC, Prodinge PM, Zilkens C, Bittersohl B, Krauspe R. *Effects of thromboprophylaxis on mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation: an in-vitro study comparing enoxaparin with rivaroxaban. BMC musculoskeletal disorders 2016;17:108. (*contributed equally)*

Pilge H, Fröbel J, Prodinge PM, **Mrotzek SJ**, Fischer JC, Zilkens C, Bittersohl B, Krauspe R. *Enoxaparin and rivaroxaban have different effects on human mesenchymal stromal cells in the early stages of bone healing. Bone & joint research 2016;5:95–100.*

Zusammenfassung: Besonders in der Orthopädie und Unfallchirurgie ist die Thromboseprophylaxe nach Operationen sehr wichtig, da bei Immobilisation ein deutlich erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer venösen Thromboembolie besteht. Bis vor einigen Jahren wurden hierzu vor allem niedermolekulare Heparine wie Enoxaparin verwendet. Seit 2008 ist allerdings nach Hüft- und Kniegelenksersatz auch der orale Faktor Xa-Antagonist Rivaroxaban zugelassen. Rivaroxaban hat Vorteile in der pharmakokinetischen und -dynamischen Wirkungsweise. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der beiden genannten Antikoagulantien auf die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen und damit auf einen Teil der Knochenheilung untersucht. Hierzu wurden humane mesenchymale Stromazellen drei Wochen *in vitro* mit drei Konzentrationen von Rivaroxaban oder Enoxaparin und entsprechenden Kontrollen ohne Wirkstoff osteogen differenziert. Zu drei definierten Zeitpunkten (Tag 7, 14, 21) wurden jeweils die Proliferation sowie per quantitativer *real-time* reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion die Genexpression und durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression osteogener Marker bestimmt. Außerdem wurde die Ausbildung des osteogenen Phänotyps mittels Anfärbungen der Alkalischen Phosphatase und Alizarin-Rot-positiver Kalzifizierungen untersucht. Unter Einfluss von Enoxaparin zeigte sich nach 7 Tagen osteogener Differenzierung ein signifikanter Anstieg der Proliferationsrate. Außerdem wurde sowohl die Expression von osteogenen Markern auf Genebene (unter anderem *bone morphogenic protein 2*, Osteocalcin, *runt-related transcription factor 2*), als auch die Ausbildung von für die osteogene Differenzierung wichtiger Oberflächenmoleküle (CD92, CD49e, CD10) unter Enoxaparin gehemmt. Im Vergleich dazu hatte Rivaroxaban keinen Einfluss auf die Proliferationsrate und weniger Effekte auf die Gen- und Protein-Expression. Die Färbung der Alkalischen Phosphatase zeigte an Tag 7 und 21 unter Einfluss der höchsten Konzentration von Enoxaparin eine signifikant verminderte Färbeintensität. Für Rivaroxaban zeigte sich nur an Tag 7 unter Einfluss der höchsten Konzentration eine im Vergleich zur Kontrolle geringere Färbeintensität. Die Anfärbung der Kalzifizierungen mit Alizarin-Rot zeigte wiederum nach Zugabe von Enoxaparin eine signifikante Verringerung der Färbeintensität an Tag 21, während Rivaroxaban keinen Einfluss hatte. Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Studien, die einen negativen Einfluss von Enoxaparin auf den Knochenstoffwechsel beschreiben. Für Rivaroxaban ist dieser Einfluss in geringerem Maße oder gar nicht vorhanden. In der vorliegenden Studie konnte dies für die frühe Phase der Knochenheilung gezeigt werden. Ob sich diese *in-vitro* Ergebnisse im klinischen Alltag widerspiegeln, müssen weitere Studien zeigen, die die Auswirkungen der beiden Antikoagulantien *in vivo* und klinisch randomisiert unter physiologischen Bedingungen testen.

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (10 ⁻⁶)	
Abb.	Abbildung	
ALP	Alkalische Phosphatase	
ALPL	Alkalische Phosphatase, Leber/Knochen/Niere-Typ	<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney-type</i>
APC	Allophycocyanin	
B2M	β-2-Mikroglobulin	
BGLAP		<i>bone γ-carboxy-glutamic acid-containing protein</i>
BMAC	Knochenmark-Aspirat-Konzentrat	<i>bone marrow aspirate concentrate</i>
BMP2 bzw.	Knochenmorphogenetisches Protein 2 beziehungsweise	<i>bone morphogenic protein 2</i>
°C	Grad Celsius	
ca.	circa	
Ca ²⁺	freie Kalziumionen	
CD	Differenzierungsmarker; immun- phänotypisches Zelloberflächenmerkmal	<i>cluster of differentiation</i>
CDH11	Cadherin-11	
cDNA	komplementäre DNA	<i>complementary DNA</i>
COL1A1	Kollagen I A1	<i>collagen I A1</i>
CryaB	Alpha-B-Crystallin	<i>alpha-B-crystallin</i>
C _t		<i>cycle threshold</i>
CXCR4	C-X-C Chemokinrezeptor Typ 4	<i>C-X-C chemokine receptor Type 4</i>
DKK1	Dickkopf Wnt-Signalweg Inhibitor 1	<i>dickkopf Wnt-signaling pathway inhibitor 1</i>
DMEM	Medium nach Dulbecco und Eagle	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	
dsDNA	doppelsträngige DNA	<i>double-stranded DNA</i>
DTI	Direkter Thrombininhibitor	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
eng.	englisch	
et al.	und andere	<i>et aliis</i>
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fötale Rinderserum	<i>fetale bovine serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	
FSC	Vorwärtsstreulicht	<i>forward scatter</i>
g	Gramm	
g	mittlere Erdbeschleunigung	
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	

G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
h	Stunde	<i>hour</i>
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie	
HKG	nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen	<i>housekeeping gen</i>
I.E.	Internationale Einheiten	
Ig	Immunglobulin	
IGF2	Insulinartiger Wachstumsfaktor 2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IGFBP2	Insulinartiger Wachstumsfaktor Bindungsprotein 2	<i>insulin-like growth factor binding protein 2</i>
IL	Interleukin	
INR		<i>international normalized ratio</i>
KE	Kontrolle Enoxaparin	
KM	Knochenmark	
KR	Kontrolle Rivaroxaban	
l	Liter	
LE	Lungenembolie	
m	Meter	
mg	milligramm (10^{-3} Gramm)	
ml	milliliter (10^{-3} Liter)	
min	Minute(n)	
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSC(s)	Mesenchymale Stromazelle(n)	<i>mesenchymal stem cell(s)</i>
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
n	Anzahl (der Wiederholungen, Proben, Generationen...)	
N	Zellzahl	
N ₀	eingesetzte Zellzahl	
ng	nanogramm (10^{-9} Gramm)	
NK	Negativkontrolle	
NMH	Niedermolekulares Heparin	
OCN	Osteocalcin	
OP	Operation	
OPG	Osteoprotegerin	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin	
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll-Cyanin 5.5	
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Phospholipide	
PPSB	Prothrombinkomplex-Konzentrat	
PRKCa	Proteinkinase C alpha	
PSG	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	
PTT	Partielle Thromboplastinzeit	<i>partial thromboplastin time</i>

qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	<i>quantitative real-time reverse transkriptase polymerase chain reaction</i>
RANKL		<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkriptase	
Runx2		<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde(n)	
SDF-1		<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts	<i>standard error of the mean</i>
SP7	SP7 (Transkriptionsfaktor)	
SSC	Seitwärtsstreulicht	<i>side scatter</i>
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β	<i>transforming growth factor- β</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TVT	Tiefe Venenthrombose	
UFH	Unfraktioniertes Heparin	
USA	Vereinigte Staaten von Amerika	<i>united states of america</i>
VTE	Venöse Thromboembolie	
z.B.	zum Beispiel	

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Gerinnung und Thromboseprophylaxe.....	1
1.1.1. Notwendigkeit einer Thromboseprophylaxe	1
1.1.2. Das Gerinnungssystem.....	4
1.1.3. Maßnahmen zur Prophylaxe venöser Thromboembolien	5
1.1.4. Entwicklung und Eigenschaften von Enoxaparin.....	7
1.1.5. Entwicklung und Eigenschaften von Rivaroxaban.....	8
1.1.6. Vergleich zwischen den verschiedenen Antikoagulantien	11
1.2. Knochenstoffwechsel und Frakturheilung	15
1.2.1. Aufbau des Knochens.....	15
1.2.2. Osteogenese	15
1.2.3. Frakturheilung.....	17
1.2.4. Wirkungen von Antikoagulantien auf Knochen: <i>In vivo</i> Studien.....	19
1.2.5. Wirkungen von Antikoagulantien auf Knochen: <i>In vitro</i> Studien	20
1.3. Ziele der Arbeit	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1. Gewinnung der mesenchymalen Stromazellen.....	23
2.1.1. Patientenkollektiv.....	23
2.1.2. Operative Beschaffung des Knochenmarks	23
2.2. Isolation und Expansion der mesenchymalen Stromazellen	26
2.2.1. Aufbereitung der mesenchymalen Stromazellen.....	26
2.2.2. Anzucht der Zellen bis P2.....	27
2.3. Osteogene Differenzierung.....	28
2.3.1. Zellkultur über 21 Tage.....	28
2.3.2. Analyse der Proliferation mittels Zellzählung.....	30
2.4. Transkriptionelle Analyse.....	31
2.4.1. Einleitung.....	31
2.4.2. RNA-Isolierung	31

2.4.3. Reverse Transkription.....	32
2.4.4. Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.5. Immunphäotypisierung mittels Durchflusszytometrie	37
2.5.1. Markierung der Zellen.....	37
2.5.2. Messung.....	38
2.6. Histochemische Analyse.....	40
2.6.1. Durchführung der Färbungen.....	40
2.6.2. Mikroskopie und Bildauswertung	41
2.7. Statistische Auswertung	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Effekte auf die Proliferation.....	43
3.2. Effekte auf die Genexpression.....	45
3.2.1. Veränderung der Genexpression durch osteogene Differenzierung.....	45
3.2.2. Effekte der Medikamente auf die Expression osteogener Marker	47
3.3. Effekte auf den Immunphäotyp.....	53
3.3.1. Unbeeinflusste Oberflächenmoleküle.....	53
3.3.2. Änderung in der Expression von Oberflächenmolekülen.....	56
3.4. Effekte auf die osteogene Differenzierung/Färbungen	60
3.4.1. Alkalische Phosphatase.....	60
3.4.2. Alizarin-Rot.....	62
4. Diskussion.....	64
4.1. Zusammenhang von Knochenheilung und VTE-Prophylaxe	64
4.2. Beeinflussung der Proliferation	67
4.3. Beeinflussung der Differenzierung.....	69
4.4. Einordnung der Ergebnisse in den Kontext.....	79
4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick	85
5. Literaturverzeichnis	86
6. Anhang.....	104

1. Einleitung

1.1. Gerinnung und Thromboseprophylaxe

1.1.1. Notwendigkeit einer Thromboseprophylaxe

Bei einer Thrombose handelt es sich um eine im menschlichen Gefäßsystem ablaufende, lokalisierte Gerinnung von Blutbestandteilen. Sie tritt am häufigsten im venösen Bereich auf, kann aber auch arteriell oder kardial entstehen. Die Ursachen wurden von Rudolf Virchow mit drei pathogenetischen Faktoren beschrieben. Diese lauten Gefäßwandveränderungen, Blutstromveränderungen und veränderte Blutzusammensetzung mit gesteigerter Gerinnungsaktivität (Thrombophilie) ¹. Bei den venösen Thrombosen kommen tiefe Venenthrombosen (TVT) in den Bein- und Beckenvenen am häufigsten vor (>90% aller venösen Thrombosen) ². Durch die Gerinnung des Blutes kann es zum kompletten oder partiellen Gefäßverschluss kommen. In der Folge entstehen ein Rückstau des Blutes und eine Steigerung des venösen Druckes, wodurch sich Ödeme entwickeln können. Es kommt zu Schwellung, Überwärmung, zyanotischer Verfärbung der Haut und Schmerzen. Typische klinische Zeichen einer Unterschenkelthrombose sind der Wadenkompressionsschmerz (Meyer-Zeichen), Schmerz bei Dorsalflexion des Fußes (Homann-Zeichen), Druckschmerz im Bereich der medialen Fußsohle (Payr-Zeichen) und eine vermehrte Venenzeichnung (Pratt'sche Warnvenen) ³. Außerdem können Dysfunktionen der Venenklappen und eine sekundäre *Varikosis* entstehen, da das Blut retrograd über einen Kollateralkreislauf in die oberflächlichen Venen strömt. Als Komplikation kann es zur Lösung eines Thrombus kommen, welcher als Embolus in andere Teile des Gefäßsystems gelangen und diese verschließen kann. Dieser Vorgang wird als venöse Thromboembolie (VTE) bezeichnet. Ein Verschluss im pulmonalarteriellen Gefäßsystem ist eine Lungenembolie (LE). Diese kann eine Rechtsherzinsuffizienz und ein Rechtsherzversagen zur Folge haben und letal enden. Ungefähr 80 % der tödlichen Lungenembolien treten sogar ohne vorherige klinische Thrombosezeichen auf ⁴. Weitere Komplikationen einer Thrombose sind das postthrombotische Syndrom und die *Phlegmasia coerulea dolens*, bei der durch Verschluss aller Venen einer Extremität mit nachfolgender Ödembildung auch das arterielle Gefäßsystem komprimiert wird ⁵.

1. Einleitung

Die VTE ist nach Herzinfarkt und Schlaganfall die dritthäufigste kardiovaskuläre Erkrankung. Cohen *et al.* gaben für Europa nach einer Studie in sechs europäischen Ländern (Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Spanien, Italien und Schweden) bei insgesamt 310,4 Millionen Einwohnern die Inzidenz des Auftretens einer nicht tödlich verlaufenden TVT mit 148 pro 100.000 Personenjahre an. Für das Auftreten einer LE wurden 95 auf 100.000 Personenjahre festgestellt. Außerdem wurde beschrieben, dass (über ein Jahr verteilt) 370.012 Todesfälle auf VTE zurückzuführen sind, was 12 % aller Todesfälle in den sechs untersuchten Ländern ausmacht ⁶. International wird die VTE-Inzidenz mit etwa 70-200 pro 100.000 Personenjahre angegeben (120 in der Q-VTE Studie). Bei ca. 62 % der Fälle konnte hierbei in der kanadischen Q-VTE-Studie ein Risikofaktor gefunden werden, über 29 % hatten sogar mehr als einen Risikofaktor ⁷. Die Identifikation dieser Risikofaktoren und die Entscheidung für eine Thromboembolieprophylaxe sind somit entscheidend für das *Outcome* der Patienten.

Bei der venösen Thromboembolieprophylaxe unterscheidet man zwischen Primär- und Sekundärprophylaxe. Ziel bei der Primärprophylaxe ist, eine Thrombose bei Patienten mit einem erhöhten Risiko zu verhindern. Bei der Sekundärprophylaxe soll das Auftreten einer erneuten Thrombose verhindert werden. Das individuelle Thrombose-Risiko setzt sich hierbei aus expositionellen (zeitlich begrenzten) und dispositionellen (patientenspezifischen, dauerhaften) Risikofaktoren zusammen ⁸. Beispiele für beide Gruppen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammensetzung des individuellen Thrombose-Risikos. Beispiele für expositionelle und dispositionelle Risikofaktoren.

Expositionelle Risikofaktoren	Dispositionelle Risikofaktoren
Art und Umfang eines operativen Eingriffs	Angeborene/ Erworbene Störung im Gerinnungssystem
Art und Umfang eines Traumas	Hormonell: Schwangerschaft, Östrogen-, Steroideinnahme
Akute Krankheit mit Immobilisation	Adipositas
Immobilisation anderer Ursache (Reisen, Lähmung...)	Tumorzerfall bei maligner Erkrankung
	Erhöhte Blutviskosität: Exsikkose, Polyglobulie
	Lokale Abflussbehinderung
	Stattgehabte TVT/ LE

Je nach Vorhandensein dieser Risikofaktoren werden die Patienten in die drei Risikogruppen niedrig, mittel und hoch eingeteilt, wobei als Maßstab für die Einteilung das Auftreten einer VTE ohne Prophylaxe angewendet wird ⁸. Beispiele für die Einteilung in die drei Risikokategorien bei operativer Versorgung sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Indikationsstellung für Art und Umfang einer Prophylaxe erfolgt dann

1. Einleitung

individuell unter Abwägung der Vor- und Nachteile einer Therapie. Blutungen sind hierbei die häufigsten Komplikationen einer medikamentösen Thromboembolieprophylaxe⁹.

Tabelle 2: Risiko für eine venöse Thromboembolie (VTE) bei Operationen. Beispiele für die Einteilung in die drei Risikokategorien (niedrig, mittel, hoch).⁸

	Risiko für eine venöse Thromboembolie (VTE)		
	niedrig	mittel	Hoch
Operation (Op)	Kleine Op	Längere Op	Große Op an Wirbelsäule, Becken, Hüft-/Kniegelenk
	Kein/Geringer Weichteilschaden	Gelenkübergreifende Op mit Immobilisation der unteren Extremität	Große Op der Brust-, Bauch- oder Beckenregion besonders bei maligner oder entzündlicher Erkrankung
		Arthroskopische Op der unteren Extremität	Op bei Polytrauma

Operationen sind ein häufiger Risikofaktor für die Entstehung einer VTE. Nach einer Operation ist die Durchführung einer Thromboembolieprophylaxe daher essentiell um eine VTE zu vermeiden. Ohne Thromboembolieprophylaxe beträgt das Risiko nach einer großen orthopädischen Operation der unteren Extremität eine VTE zu erleiden 40-60 %^{10,11}. Dies zeigt, dass besonders orthopädische Operationen ein hohes Risiko bergen. Mit dem Einsatz einer medikamentösen Thromboembolieprophylaxe, sogenannten Antikoagulantien, kann dieses Risiko deutlich gesenkt werden. Unter Therapie mit Enoxaparin sinkt das Auftreten einer größeren VTE nach Hüftgelenktotalersatz auf 2,0 %, unter Einnahme von Rivaroxaban auf 0,2 %. In Bezug auf die primären Endpunkte, definiert als jede TVT, nicht-fatale LE und Tod, sinkt das Auftreten auf 3,7 % unter Enoxaparin und 1,1 % unter Rivaroxaban¹².

Doch auch trotz Thromboembolieprophylaxe haben bei Entlassung aus dem Krankenhaus immer noch ca. 30 % (25 - 40 %) der Patienten nach Hüftgelenksersatz eine asymptomatische TVT, die anhand bilateraler Venographie detektiert werden kann. In einer 3-monatigen *Follow-up* Studie nach Operation entwickelten aber nur 1,3 - 3 % eine symptomatische VTE¹⁰. Etwa 20 - 40 % der Patienten entwickeln erst nach Verlassen des Krankenhauses Thromben, die in einer Venographie nachgewiesen werden können, wobei die meisten wiederum asymptomatisch sind¹³. Bis mindestens zum 35. postoperativen Tag nach Hüftgelenksersatz bleibt das Risiko einer spät auftretenden TVT jedoch hoch, wobei eine ambulante Fortführung der Thromboseprophylaxe mit Enoxaparin zu einer Reduktion des VTE-Risikos führt^{14,15}. Eine Langzeittherapie mit Rivaroxaban über 31 - 39 Tage nach Hüftgelenksersatz kann

das postoperative Risiko für eine symptomatische VTE im Vergleich zu einer kurzzeitigen Enoxaparin-Anwendung (10 - 14 Tage) ebenfalls senken¹⁶.

Auch bei erhöhtem Risiko für arterielle oder kardiale Thrombenbildung ist gegebenenfalls eine langfristige Thromboembolieprophylaxe indiziert. Hierzu gehört beispielsweise die dauerhafte Antikoagulation bei Vorhofflimmern, um die Gefahr eines Schlaganfalls zu reduzieren¹⁷. Neben dem prophylaktischen Einsatz sind Antikoagulantien auch zur Behandlung von bereits entstandenen Thromben bei TVT und LE¹⁸ oder zur akuten Therapie bei einem arteriellen Gefäßverschluss¹⁹ indiziert.

1.1.2. Das Gerinnungssystem

Um die Wirkungsweise der verschiedenen Antikoagulantien zu verstehen, ist es zunächst wichtig, die möglichen Angriffspunkte im Gerinnungssystem zu kennen. Das Gerinnungssystem besteht aus der primären und der sekundären Blutstillung (Hämostase). Bei der primären Hämostase kommt es zur Aggregation von Blutplättchen (Thrombozyten), die den sogenannten Abscheidungsthrombus bilden. Dieser entsteht an einem Defekt der Gefäßwand (Endotheldefekt) und haftet dieser an²⁰. Die sekundäre Hämostase besteht aus der plasmatischen Gerinnungskaskade. Die Gerinnungsfaktoren liegen zunächst in inaktiver Form, als Proenzyme, vor. Die Gerinnungskaskade wird entweder endogen über Kontaktaktivierung durch Endothelschäden (intrinsisches System) oder exogen über einen Gewebeschaden (extrinsisches System) aktiviert. Über die Aktivierung mehrerer Gerinnungsfaktoren, die als Serinproteasen ihre enzymatische Wirkung entfalten, kommt es zur Aktivierung des Schlüsselfaktors X, der gemeinsam mit aktiviertem Faktor V, Kalzium (Ca^{2+}) und Phospholipiden (PI) den Prothrombinase-Aktivator-Komplex bildet²¹. Dieser Komplex aktiviert Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa)^{22,23}. Ein Molekül Faktor Xa führt hierbei zu einer Bildung von über 1000 Molekülen Thrombin^{24,25}. Thrombin spaltet wiederum Fibrinogen, wodurch schließlich Fibrin als Endprodukt der Gerinnungskaskade entsteht. Das Fibrin stabilisiert den primären Thrombozytenthrombus durch zusätzlichen Einschluss von roten Blutkörperchen.

Das stabilisierte, unlösliche Fibrin wird wiederum von Plasmin, das vorher aus Plasminogen entsteht, in lösliche Bestandteile gespalten. Diesen Vorgang nennt man Fibrinolyse. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse. Bei der Entstehung einer Thrombose ist dieses Gleichgewicht zugunsten der Gerinnung gestört. Ursachen können die von Virchow beschriebenen, oben genannten, pathogenetischen Faktoren sein¹. Bei Strömungsverlangsamung, pathologischer Veränderung der Blutzusammensetzung oder Veränderung der

Gefäßwand kann es so auch ohne Gefäßverletzung zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade mit der Entwicklung eines Thrombus kommen. Auch eine Verminderung des fibrinolytischen Potenzials kann die Entwicklung einer Thrombose begünstigen^{26,27}.

1.1.3. Maßnahmen zur Prophylaxe venöser Thromboembolien

Zu den Basismaßnahmen zur Vorbeugung von venösen Thromboembolien gehören Frühmobilisation, zum Beispiel nach einer Operation, und die Durchführung von Bewegungsübungen. Außerdem können zusätzlich physikalische Maßnahmen, wie das Tragen von Thrombose-Prophylaxe-Strümpfen, angewandt werden. Es wird vermutet, dass durch den zirkulären Druck der Strümpfe die Geschwindigkeit und das Volumen des Flusses in den tiefen Beinvenen erhöht, der Rückfluss des Blutes zum Herzen gefördert und dadurch die Entstehung von Thromben verhindert wird^{28,29}. Ab einem mittleren bis hohen Thrombose-Risiko sind medikamentöse Maßnahmen indiziert. Hierfür stehen verschiedene Gruppen von Antikoagulantien zur Verfügung, die an unterschiedlichen Stellen des Gerinnungssystems angreifen (siehe Abbildung (Abb.) 1).

Eine dieser Gruppen bilden die Heparine. Man unterscheidet zwischen unfractioniertem (UFH) und niedermolekularem Heparin (NMH). Die antikoagulatorische Wirkung von Heparin beruht auf einer Wirkverstärkung von Antithrombin, wodurch besonders die aktivierten Gerinnungsfaktoren II (Thrombin) und X, in geringerem Maße auch IX, XI und XII, gehemmt werden^{30,31}. Heparin bindet an Antithrombin und steigert dadurch die hemmende Wirkung des Antithrombins. Bei Heparinen, die aus mehr als 18 Zuckereinheiten bestehen (UFH), wird über die Bindung an Antithrombin und eine zusätzliche Bindung an Thrombin sowohl Thrombin als auch Faktor Xa gehemmt. Heparine, die kleiner als 18 Zuckereinheiten sind (NMH), hemmen über die Bindung an Antithrombin fast ausschließlich Faktor Xa³². NMH sind aktuell Mittel der Wahl zur peri- und postoperativen Thromboembolieprophylaxe und außerdem erste Wahl zur Therapie bei tiefer Becken- und Beinvenenthrombose^{33,34}. Zu den NMH zählen unter anderem Enoxaparin (Clexane[®]), Dalteparin (Fragmin[®]), Certoparin (Mono-Embolex[®]) und Nadroparin (Fraxiparin[®]). Enoxaparin hat sich dabei als günstigste Lösung gezeigt und wurde als Leitsubstanz definiert, wobei bisher keine signifikanten Vorteile in der Wirkungsweise gegenüber den anderen NMH festgestellt wurden³⁵. Eine Alternative zu den NMH ist Fondaparinux. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Heparin-Analogon, das ebenfalls über eine Bindung an Antithrombin wirkt, aber zu einer selektiven und starken Hemmung von Faktor Xa führt³⁶. Alle Heparine werden parenteral appliziert.

Eine weitere Gruppe stellen die sogenannten neuen oralen Antikoagulantien dar. Ein wichtiger Vertreter ist das Rivaroxaban (Xarelto®). Rivaroxaban ist ein selektiver und direkter Faktor Xa-Inhibitor^{37,38}. Auf die Entwicklung und Wirkungsweise von Rivaroxaban und Enoxaparin und den Vergleich mit anderen Antikoagulantien wird in den folgenden Kapiteln noch intensiver eingegangen.

Daneben gibt es direkte Thrombin-Inhibitoren (DTIs), wie zum Beispiel Dabigatran. Dabigatran hemmt direkt und selektiv Thrombin und kann zur Thromboembolieprophylaxe nach Hüft- oder Kniegelenktotalersatz eingesetzt werden. Es wird oral eingenommen³⁹. Ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der DTIs ist Melagatran, das allerdings wegen Leberschädigung nicht mehr zugelassen ist⁴⁰. Argatroban ist ein parenteraler DTI. In Abb. 1 sind die Angriffspunkte von Rivaroxaban, Heparin und den DTIs im Kontext der Gerinnungskaskade dargestellt.

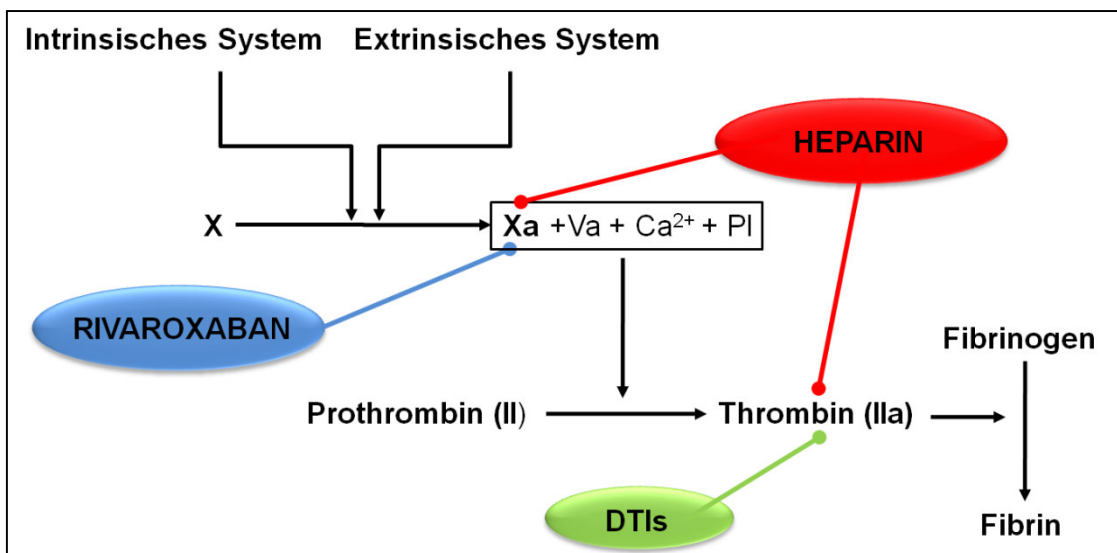


Abb. 1: Angriffspunkte von Rivaroxaban, Heparin und direkten Thrombin-Inhibitoren (DTIs) auf die Gerinnungskaskade.

Über das intrinsische und extrinsische System wird Faktor X aktiviert. Im Komplex mit Faktor Va, Kalzium (Ca²⁺) und Phospholipiden (PI) aktiviert Faktor Xa Prothrombin (II), so dass Thrombin (IIa) entsteht. Thrombin spaltet wiederum Fibrinogen, wobei Fibrin als Endprodukt erreicht wird. Rivaroxaban und Heparin hemmen die Wirkung von Faktor Xa und führen somit zu einer verminderten Bildung von Thrombin. Heparin hemmt zusätzlich auch Thrombin, welches von den direkten Thrombin-Inhibitoren (DTIs) selektiv gehemmt wird.

Zur längerfristigen Prävention von venösen Thromboembolien bei vorhandener Phlebothrombose oder zur Prävention systemischer Embolien bei Vorhofflimmern oder künstlichen Herzklappen ist häufig die Gabe von Kumarinderivaten indiziert. Diese wirken über eine Hemmung der Synthese (γ -Carboxylierung) der Vitamin-K abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktor II, VII, IX, X). Zu dieser Gruppe gehören Warfarin und das in Deutschland häufiger eingesetzte Phenprocoumon

(Marcumar®)^{39,41}. Es gibt noch einige weitere Medikamente, die zur Thromboseprophylaxe eingesetzt werden können, auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eingegangen werden kann.

1.1.4. Entwicklung und Eigenschaften von Enoxaparin

NMH wurden in den 1980er Jahren entwickelt. Sie werden durch chemische oder enzymatische Depolymerisation von Heparin produziert²⁵, nachdem das ursprüngliche Heparin aus der Darmschleimhaut von Schweinen gewonnen wurde. Heparin wird bei oraler Gabe nicht ausreichend resorbiert und muss daher parenteral, entweder intravenös oder subkutan, appliziert werden. Über die Wirkverstärkung von Antithrombin werden die Gerinnungsfaktoren II (Thrombin) und Xa (wenig auch IX, XI und XII) gehemmt^{30,31}. NMH haben das UFH in den letzten Jahren bei vielen Indikationen abgelöst. Durch ihre höhere Spezifität für die Hemmung von Faktor Xa (via Antithrombin) werden Nebeneffekte, die durch die unspezifische Bindung an andere Plasmaproteine auftreten können, vermieden. Dadurch ist beispielsweise das Risiko einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) kleiner, welche durch eine direkte Wechselwirkung des Heparins mit den Thrombozyten (HIT Typ I) oder durch eine unspezifische Bindung von Heparin an Plättchenfaktor 4 (HIT Typ II) entsteht. Außerdem ist die Halbwertszeit der NMH länger und somit ist eine ein- oder zweimal tägliche Gabe ausreichend. Im Vergleich mit UFH wurde für NMH in verschiedenen Studien seit 1984 eine gute Wirksamkeit zur VTE-Prävention bei vergleichbarem Blutungsrisiko festgestellt^{32,42}.

Ein Vertreter der NMH ist Enoxaparin, welches seit 1989 in Deutschland zugelassen ist. Der Wirkstoff ist ein wasserlösliches Natriumsalz. Es liegt als Injektionslösung mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen vor und wird subkutan appliziert. Die Bioverfügbarkeit beträgt 92 %. Im Blutkreislauf wird Enoxaparin zu etwa 80 % an Plasmaproteine gebunden. Nach einmaliger Gabe wird die maximale Anti-Xa-Aktivität nach 3 - 5 Stunden erreicht. Bei Anwendung von 40 mg Enoxaparin einmal täglich wird am zweiten Tag ein *steady-state* erreicht. Die therapeutische Plasmakonzentration von Enoxaparin liegt zwischen 0,8 und 1,2 Internationalen Einheiten (I.E.)/ml, was einer Plasmakonzentration von 8 bis 12 µg/ml (100 I.E. in 1 mg) entspricht⁴³. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei etwa 4,5 Stunden nach einmaliger Gabe bzw. 7 Stunden nach mehrfacher Gabe. Enoxaparin wird hauptsächlich von der Leber metabolisiert und abgebaut und zu 40 % über die Nieren eliminiert^{31,44}.

Enoxaparin besitzt ein breites Indikationsspektrum, sowohl zur VTE-Prävention (prophylaktische Indikation) als auch zur Behandlung bei bereits vorhandenen

1. Einleitung

Thromben (therapeutische Indikation). Außerdem kommt es zur Gerinnungshemmung während der Durchführung einer Hämodialyse zum Einsatz, um die Koagulation in den Schläuchen zu verhindern. In der Anwendung nach Myokardinfarkt zeigte sich Enoxaparin gegenüber UFH überlegen. Das Risiko für Tod oder erneuten Myokardinfarkt ist bei Enoxaparin-Einnahme niedriger, ohne dabei das Blutungsrisiko zu erhöhen ⁴⁵. Die Indikationen mit entsprechenden Dosierungen zur klinischen Anwendung sind in Tabelle 3 aufgelistet ⁴⁶.

Tabelle 3: Indikationen und entsprechende Dosierung für den Einsatz von Enoxaparin.

Dosierung	Indikation
20 mg	- Prävention von Thrombosen während und nach Operationen bei Patienten mit niedrigem/mittlerem Thrombose-Risiko - individuell bei Hämodialyse
40 mg	- Prävention von Thrombosen während und nach Operationen bei Patienten mit hohem Risiko - Vorbeugung von Thrombosen bei nicht operierten Patienten mit mittlerem/hohem Thrombose-Risiko - individuell bei Hämodialyse
60, 80 oder 100 mg	- Behandlung von tiefen Venenthrombosen mit oder ohne Lungenembolie - Behandlung bei akutem Myokardinfarkt

Zur Abschwächung der gerinnungshemmenden Wirkung von Enoxaparin, beispielsweise bei Blutungskomplikationen, kann diese durch die intravenöse Applikation von Protamin antagonisiert werden. Dabei kann die Anti-Faktor-Xa-Aktivität nur bis maximal 60 % gehemmt werden ^{46,47}.

1.1.5. Entwicklung und Eigenschaften von Rivaroxaban

Bayer *Health Care* begann 1998 mit der Suche nach einem neuen Stoff, der eine hohe Anti-Faktor-Xa-Potenz besitzt und gleichzeitig eine hohe orale Bioverfügbarkeit aufweist. 1999 wurde Rivaroxaban als erster direkter Faktor Xa Inhibitor entdeckt ^{38,48}. Damit entfaltet es seine Wirkung an einem Schlüsselpunkt im Gerinnungssystem, an dem sich intrinsisches und extrinsisches System kreuzen ⁴⁹. Indem es sowohl die freie als auch die *Clot*-gebundene Form von Faktor Xa hemmt, wird weniger Thrombin gebildet. Damit wird zum Einen die plasmatische Gerinnung gehemmt und zum Anderen indirekt auch die Thrombin-vermittelte Aggregation von Blutplättchen. Die vorhandene Menge an Thrombin bleibt hierbei unbeeinflusst ⁵⁰.

Im Rahmen von präklinischen Studien wurde zunächst *in vitro* die gerinnungshemmende Wirkung von Rivaroxaban bestätigt ^{38,51}. Außerdem wurde an

Ratten, Hasen und Mäusen *in vivo* ein venöses oder arterielles Thrombus-Wachstum induziert, wobei gezeigt wurde, dass Rivaroxaban dieses Wachstum hemmt^{51,52}.

2002 begannen klinische Phase-I-Studien, die ein gutes pharmakokinetisches und -dynamisches Profil sowie eine gute Verträglichkeit von Rivaroxaban zeigten⁵³. Im Blutkreislauf des Menschen wird es zu 92-95 % an Plasmaproteine gebunden, in erster Linie an Albumin⁵⁴. Rivaroxaban hat eine über 10.000-fach höhere Selektivität für Faktor Xa als für andere Serinproteasen^{38,48}. Die orale Bioverfügbarkeit ist hoch. Sie liegt bei Einnahme der 10 mg Dosis bei 80-100 %, ohne Wechselwirkungen mit Lebensmitteln³⁷. Bei Einnahme der 20 mg Tablette sinkt die Bioverfügbarkeit aufgrund schlechter Löslichkeit auf ca. 66 %^{55,56}. Nach der Einnahme setzt die Wirkung sehr schnell ein, die maximale Plasmakonzentration wird nach 2-4 Stunden erreicht, gefolgt von einem *steady-state*. Die Halbwertszeit liegt, abhängig vom Alter des Patienten, zwischen 9 und 13 Stunden, wobei eine Einschränkung der Nierenfunktion die Halbwertszeit verlängert^{37,50,57}. Rivaroxaban wird über drei verschiedene Wege aus dem Körper eliminiert. Etwa ein Drittel wird unverändert über den Urin ausgeschieden, ein Drittel wird über die Niere verstoffwechselt und ein Drittel wird hepatobiliär verstoffwechselt über den Faeces ausgeschieden^{58,59}. Die maximalen Plasmakonzentrationen bei einer täglichen Einnahme von 5 - 60 mg Rivaroxaban lagen in Studien bei 40 - 400 µg/l, minimale Plasmakonzentrationen lagen bei 8-160 µg/l^{60,61,62}. Bei der einmal täglichen Einnahme von 10 mg Rivaroxaban, wie es nach orthopädischen Operationen zur VTE-Prophylaxe indiziert ist, lag die Plasmakonzentration bei 9 - 125 µg/l⁶⁰. Rivaroxaban zeigt eine vorhersehbare und dosisabhängige Pharmakokinetik, die auch zwischen verschiedenen Patientengruppen ähnlich ist^{54,63,64}. Ein regelmäßiges Monitoring ist daher nicht notwendig. Es gibt jedoch die Möglichkeit über *Anti-factor-Xa chromogenic assays* die Plasmakonzentration von Rivaroxaban zu überprüfen. Im Notfall kann auch die Thromboplastinzeit (*prothrombin time test*, PTT) zur Überprüfung herangezogen werden⁶⁰.

Derzeit gibt es mehrere Forschungsansätze, um Möglichkeiten zu finden, mit denen in Notfallsituationen die gerinnungshemmende Wirkung von Rivaroxaban unterbunden werden kann. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass rekombinant aktivierter Faktor VII und aktiviertes Prothrombin Komplex Konzentrat (enthält die aktivierten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X) die Gerinnungshemmung von Rivaroxaban zum Teil, allerdings nur zu maximal 50 %, auflösen können⁶⁵.

Nach den klinischen Phase-I-Studien folgten insgesamt sechs Phase-II-Dosisfindungsstudien, in die insgesamt mehr als 4000 Patienten eingeschlossen wurden. Vier davon wurden unter dem Namen ODIXa (**O**ral **D**irect factor **X**a)-Programm durchgeführt, in dem verschiedene Konzentrationen von Rivaroxaban für die Prävention von VTE nach großen orthopädischen Operationen (Knie- und Hüftgelenksersatz) eingesetzt wurden⁶¹. Es zeigte sich, dass 10 mg Rivaroxaban einmal täglich postoperativ das beste Risiko-Nutzen-Verhältnis aufweist⁶⁶. Auf dieser Grundlage begannen 2005 mit dem RECORD (**RE**gulation of **CO**agulation in major **Orthopaedic surgery reducing the Risk of DVT and PE**)-Programm die Phase-III-Studien. In vier großen randomisierten Doppelblind-Studien mit insgesamt 12.500 Patienten wurde die orale Einnahme von 10 mg Rivaroxaban mit der subkutanen Anwendung von 40 mg Enoxaparin verglichen. Patienten erhielten bei der Operation entweder einen Hüftgelenksersatz (RECORD 1 und 2) oder einen Kniegelenksersatz (RECORD 3 und 4). Es zeigte sich, dass Rivaroxaban bei ähnlichem Sicherheitsprofil zur VTE-Prophylaxe besser wirksam war als Enoxaparin^{12,16,67,68}. Nach der Veröffentlichung der Ergebnisse von RECORD 1 und 3 erfolgte 2008 die Zulassung von Rivaroxaban in der EU und Kanada für die VTE-Prophylaxe nach Hüft- oder Kniegelenksersatzoperation⁴⁸.

Es wurden weitere Phase-III-Studien durchgeführt, um den Einsatz von Rivaroxaban für andere Indikationen zu testen. In den EINSTEIN-Studien ging es um den Vergleich von Rivaroxaban und Vitamin-K-Antagonisten zur Behandlung von VTE^{69,70}. In der ROCKET AF (**R**ivaroxaban **O**nce daily oral direct factor **X**a inhibition **C**ompared with **vitamin K** antagonism for prevention of stroke and **E**mbolism **T**rial in **A**trial **F**ibrillation)-Studie wurde Rivaroxaban zur Prävention von Schlaganfällen bei Patienten mit Vorhofflimmern getestet⁴¹. Bei der ATLAS (**A**nti-**X**a-**T**herapy to **L**ower cardiovascular events in addition to **A**spirin with/without thienopyridine therapy in subjects with acute coronary **S**yndrome)-Studie handelte es sich um eine Phase-II-Studie zur Dosisfindung von Rivaroxaban beim Einsatz zur Sekundärprävention nach akutem Koronarsyndrom in Kombination mit Aspirin (ASS) oder mit ASS und zusätzlich Clopidogrel, einem Thrombozytenaggregationshemmer⁷¹. Des Weiteren wurde die MAGELLAN (**M**ulticenter, **r**andomized, **p**arallel **G**roup **E**fficacy and safety study for prevention of **VTE** in hospitalized medically **ILL** patients comparing rivaroxab**AN** with enoxaparin)-Studie durchgeführt, die die Wirksamkeit von Rivaroxaban zur VTE-Prophylaxe bei bettlägerigen internistischen Patienten untersucht hat⁷².

Eine aktuelle, nicht interventionelle Phase-IV-Studie untersuchte im klinischen Setting die Wirksamkeit und die Komplikationen von Rivaroxaban verglichen mit dem

1. Einleitung

Krankenhausstandard beim Einsatz nach operativer Versorgung einer Fraktur der unteren Extremität. Sie lief unter dem Namen XAMOS (***X**Arelto in the prophylaxis of post-surgical venous thromboembolism after elective **M**ajor **O**rthopaedic **S**urgery of hip or knee*). Es zeigte sich drei Monate nach der Operation eine gute Wirksamkeit von Rivaroxaban bei einer Inzidenz von 0,57 % für symptomatische thromboembolische Ereignisse, im Vergleich zu 1,14 % bei der Kontrollgruppe. Größere Blutungen traten unter Einsatz von Rivaroxaban in 0,29 % der Fälle auf und in 0,45 % der Fälle bei Einnahme eines anderen Antikoagulanz ⁷³.

Die Indikationen, für die Rivaroxaban aktuell zugelassen ist, und entsprechende Dosierungen sind in Tabelle 4 zusammenfasst ⁷⁴.

Tabelle 4: Indikationen und entsprechende Dosierung für den Einsatz von Rivaroxaban.

Dosierung	Indikation
2,5 mg; 2x/Tag	- Sekundärprävention nach akutem Koronarsyndrom (in Kombination mit ASS oder ASS+Clopidogrel)
10 mg; 1x/Tag	- Prävention von VTE nach Hüft- oder Kniegelenkersatz bei Erwachsenen
20 mg; 1x/Tag	- Schlaganfall- und Embolieprävention bei Patienten mit Vorhofflimmern und Risikofaktoren - Behandlung und Sekundärprävention von TVT und LE

1.1.6. Vergleich zwischen den verschiedenen Antikoagulantien

Der perfekte Gerinnungshemmer sollte effizient wirken und keine Nebeneffekte, vor allem wenig Blutungskomplikationen, auslösen. Wirksamkeit und Sicherheit sollten möglichst gleichermaßen hoch sein. Für eine gute Patientencompliance sollte er oral einnehmbar sein und kein regelmäßiges Monitoring benötigen. Er sollte mit keinen anderen Medikamenten oder mit Lebensmitteln interagieren und für jeden Patienten bei den gleichen Indikationen in der gleichen Dosierung einsetzbar sein ²⁵. Rivaroxaban erfüllt viele dieser Ziele, jedoch bieten auch andere Antikoagulantien Vorteile, die ihren Einsatz bei bestimmten Indikationen rechtfertigt.

Die Vorteile von UFH sind die schnell und effizient einsetzende Wirkung, bei intravenöser Gabe innerhalb von Minuten, und die lange Erfahrung im klinischen Einsatz ⁷⁵. Zudem hat sich der Einsatz bei Niereninsuffizienz bewährt, da es wenig akkumuliert, weil es auch über die Leber verstoffwechselt werden kann ⁷⁶. Daher wird UFH häufig im intensivmedizinischen Bereich eingesetzt, wo es kontinuierlich intravenös oder zwei- bis dreimal täglich subkutan appliziert werden kann ⁷⁷. Allerdings hat UFH viele Nebenwirkungen, denn nur 30 % der Inhaltsstoffe haben einen Effekt auf die Antikoagulation ⁷⁸. Über unspezifische Proteinbindung können so beispielsweise

Thrombozytopenien (HIT I und II)⁷⁹ oder auch Osteoporose^{80,81} (siehe Kapitel 1.2.5) entstehen. Um Blutungskomplikationen zu vermeiden und die Wirkung zu überprüfen ist außerdem regelmäßiges Labormonitoring mittels PTT nötig⁸². UFH ist nicht plazenta- und muttermilchgängig und daher auch während Schwangerschaft und Stillzeit anwendbar. Die Wirkung von UFH ist abhängig vom Vorhandensein von Antithrombin³².

Im Gegensatz dazu treten beim Einsatz von NMH weniger Blutungskomplikationen und weniger Nebenwirkungen auf, da weniger Plasmaproteine unspezifisch gebunden werden⁴⁴. Durch die längere Halbwertszeit und daher nur einmal am Tag benötigte Applikation sind die NMH außerdem für eine ambulante Therapie besser geeignet^{32,33}. Durch die Notwendigkeit der subkutanen Applikation ist die Compliance der Patienten aber geringer, als beispielsweise bei Rivaroxaban, das oral eingenommen wird. Durch den immer kürzer werdenden Krankenhausaufenthalt der Patienten nach Operationen besteht die Gefahr, dass die subkutane Injektion nach Entlassung nicht konsequent durch den Patienten selber durchgeführt wird⁸³. Ein weiterer Nachteil der NMH gegenüber Rivaroxaban ist die indirekte Antikoagulation, da Antithrombin als Cofaktor notwendig ist. Außerdem werden von NMH keine *Clot*-gebundenen Gerinnungsfaktoren gehemmt⁸⁴. Da beide Medikamente zum Teil über die Niere eliminiert werden, muss bei schwerer Niereninsuffizienz eventuell eine Dosisanpassung erfolgen, da sonst Blutungskomplikationen auftreten können⁷⁶. Beispiele für die Vor- und Nachteile des Einsatzes von Rivaroxaban gegenüber dem NMH Enoxaparin sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Beispiele für Vor- und Nachteile von Rivaroxaban und Enoxaparin.

	Vorteile	Nachteile
Rivaroxaban	<ul style="list-style-type: none"> - orale Einnahme mit hoher Bioverfügbarkeit - hemmt selektiv sowohl freien als auch <i>Clot</i>-gebundenen Faktor Xa - sehr gutes Wirksamkeits-/Blutungs-Verhältnis - schnelles Einsetzen der Wirkung - keine signifikante Akkumulation 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Monitoring</i> schwierig - noch keine Langzeitfolgen bekannt - keine komplette Antagonisierung möglich
Enoxaparin	<ul style="list-style-type: none"> - Langzeitergebnisse im klinischen Einsatz - gute Wirksamkeit bewiesen - rasche Antagonisierung mit Protamin möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - parenterale Applikation, geringere Compliance - Risiko Heparin-induzierter Thrombozytopenie - indirekte Wirkung, Antithrombin-abhängig - keine Hemmung von <i>Clot</i>-gebundenen Gerinnungsfaktoren

Fondaparinux ist ein Antithrombin-bindendes Pentasaccharid, welches die Anti-Faktor-Xa-Aktivität von Antithrombin ohne Effekte auf Thrombin verstärkt. Als synthetisches Heparin-Analogon sollen Nebenwirkungen weiter minimiert werden, zum Beispiel ist das HIT-Risiko sehr gering. In mehreren großen randomisierten Doppelblind-Studien wurde gezeigt, dass Fondaparinux Enoxaparin nach Hüft- und Kniegelenksersatz sowie nach Hüftgelenksfraktur zur VTE-Prophylaxe überlegen ist ³⁶. Im Vergleich mit Rivaroxaban war Fondaparinux allerdings unterlegen. Unter Einsatz von Fondaparinux wurden ein höheres Auftreten symptomatischer VTEs (5,6 % zu 2,1 %) und eine höhere Rate an größeren, signifikanten Blutungen (4,9 % zu 2,9 %) festgestellt ⁸⁵. Besonders bei Patienten, die unter einer Niereninsuffizienz leiden, kann es vermehrt zu Blutungskomplikationen kommen ⁸⁶. Fondaparinux ist seit 2002 zugelassen.

Im Vergleich dazu sind Kumarine seit über 60 Jahren in Gebrauch. Sie waren bis vor einigen Jahren die einzigen zugelassenen oralen Antikoagulantien ⁴⁸. Allerdings bietet ihre Anwendung viele Nachteile, wie beispielsweise eine unvorhersehbare Pharmakokinetik, ein langsames Ein- und Aussetzen der Wirkung, ein schmales therapeutisches Fenster und viele Interaktionen mit Medikamenten oder Lebensmitteln. Inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Dosisreaktion führen dazu, dass unter ständigem *Monitoring* der Gerinnung (INR-Kontrolle, *international normalized ratio*) die Dosis bei jedem Patienten entsprechend angepasst werden muss. Der INR-Zielbereich, in dem das beste Verhältnis von Wirksamkeit zu Sicherheit festgestellt wurde, liegt zwischen 2,0 und 3,0 ³⁹. Vorteil der Kumarine ist, dass sie bei Blutungskomplikationen antagonisiert werden können. Für eine langsame Antagonisierung stehen Vitamin K-Präparate (beispielsweise Konaktion[®]) zur Verfügung. Im Notfall können direkt die Gerinnungsfaktoren, mittels Gabe von Frischplasma oder Prothrombinkomplex-Konzentrat (PPSB), ersetzt werden. Nach Hüft- und Kniegelenksersatz zeigte sich der Einsatz von Enoxaparin im Gegensatz zum Kumarinderivat Warfarin mit einer absoluten Risikodifferenz für TVTs von 14,8 % bzw. 6 % überlegen, bei vergleichbarem Auftreten von Blutungskomplikationen ^{87,88}.

Auch die direkten Thrombin-Inhibitoren (DTIs) wirken Antithrombin-unabhängig und hemmen gebundenes und freies Thrombin. Zu den parenteralen DTIs gehört Hirudin, unter dessen Einsatz allerdings ein erhöhtes Blutungsrisiko festgestellt wurde und bei dem individuelle Dosierung und Labormonitoring notwendig sind. Besser geeignet zeigten sich in bisherigen Studien Argatroban oder Bivalirudin. Durch reversible Bindung an Thrombin ist ihr Einsatz sicherer. Allerdings müssen diese DTIs parenteral appliziert werden ^{32,89}.

Besonders orale DTIs stehen momentan neben Rivaroxaban im Fokus der Forschung⁹⁰. Ximelagatran wurde wegen Hepato- und Kardiotoxizität vom Markt genommen^{40,91}, aber Dabigatran ist für die VTE-Prophylaxe nach Hüft- und Kniegelenkersatz zugelassen worden⁹². Phase-III-Studien laufen momentan. Vorteil von Dabigatran ist ein schnelles Einsetzen der gerinnungshemmenden Wirkung, wobei die maximale Plasmakonzentration schon 1,5 Stunden nach Einnahme erreicht wird⁹³. Allerdings haben einige Studien gezeigt, dass Dabigatran zusätzlich den antikoagulatorischen Effekt des Thrombin-Thrombomodulin/ Aktiviertes Protein C-Systems hemmt, da es den negativen Feedback-Mechanismus verhindert. Dadurch kann es zu unerwünschter Hyperkoagulabilität kommen⁹⁴. Im Vergleich zu den DTIs hemmt Rivaroxaban diesen negativen Feedback-Mechanismus über aktiviertes Protein C nicht⁹⁵.

Ein Vergleich zwischen dem Kumin Warfarin, dem DTI Ximelagatran, dem NMH Enoxaparin, dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und dem Faktor Xa-Hemmer Rivaroxaban zeigte für Rivaroxaban das beste Wirkungs-Blutungs-Verhältnis⁹⁶.

1.2. Knochenstoffwechsel und Frakturheilung

1.2.1. Aufbau des Knochens

Ein erwachsener Mensch besitzt insgesamt 213 Knochen, die für die Körperstruktur, die Bewegung, den Schutz innerer Organe, aber auch für den Stoffwechsel wichtige Funktionen ausüben⁹⁷. Makroskopisch besteht das menschliche Skelett zu 80 % aus kompaktem und zu 20 % aus spongiösem Knochen. Kompakter Knochen ist dicht, stabil und peripher in den einzelnen Knochen gelegen. Währenddessen bildet spongiöser Knochen ein Netzwerk sich verzweigender Knochenbälkchen (Trabekel) und befindet sich im Inneren der einzelnen Knochen. In den Zwischenräumen befindet sich Knochenmark oder Fettgewebe und durch die Ausrichtung der Trabekel wird eine gute Stabilität bei geringerem Gewicht erreicht. Beide Knochengewebearten bestehen aus Osteonen. Osteone bestehen aus Knochenlamellen, die sich konzentrisch um eine Lichtung, den so genannten Havers-Kanal, anordnen. Im Havers-Kanal befinden sich Bindegewebe und Blutgefäße zur Versorgung des Knochens. Außen ist der Knochen von Periost umgeben, in dem Blutgefäße, Nervenfasern und Knochenzellen zu finden sind. Die innere Oberfläche des Knochens ist von Endost bedeckt. Dieses steht mit dem Knochenmark in Verbindung und enthält ebenfalls Blutgefäße und Knochenzellen^{97,98}.

Das Knochengewebe besteht zu 50-70 % aus einer festen mineralischen Phase, zu 20-40 % aus einer organischen Matrix, zu 5-10 % aus Wasser und zu <3 % aus Fetten. Die mineralische Phase sorgt für die Festigkeit des Knochens, da sie zum größten Teil aus Hydroxylapatitkristallen (Ablagerungsform von Kalziumphosphat) besteht. Außerdem enthält sie kleinere Mengen Natrium und Magnesium. Die organische Matrix besteht zu 90-95 % aus Typ-I-Kollagen, welches in Form von parallel angeordneten Fasern in den Lamellen der Osteone für Biege- und Zugstabilität sorgt. Nicht-kollagene Proteine in der organischen Matrix sind beispielsweise Albumin, Alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OCN) und weitere, die für den Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen⁹⁹.

1.2.2. Osteogenese

Das Knochengewebe unterliegt einem ständigen Umbau. Um seine Stärke beizubehalten, sich auf wechselnde Belastungen einzustellen und das Gleichgewicht im Mineralienhaushalt aufrechtzuerhalten, wird es das ganze Leben lang ständig erneuert. Hierbei gibt es vier wichtige Zelltypen, die für den Knochenstoffwechsel entscheidend sind: Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und

Osteoklasten. Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteozyten sind verschiedene Stufen eines Zelltyps. Sie entstehen aus pluripotenten mesenchymalen Stromazellen (MSCs = *mesenchymal stromal cells*), die sich sowohl zu Knochen-, als auch zu Knorpel-, Muskel- oder Fettzellen entwickeln können¹⁰⁰. MSCs befinden sich im Knochenmark, welches beim Erwachsenen noch im Becken und in den langen Röhrenknochen wie Femur und Tibia vorhanden ist. Außerdem befinden sich einige MSCs im Endost und Periost. Bei Frakturen werden die MSCs stimuliert, sodass sie zum Verletzungsort wandern und sich über mehrere Schritte zu Knochenzellen entwickeln (siehe Kapitel 1.2.3.). Zuerst werden sie zu Osteoprogenitorzellen (schmale und hellkernige Vorläuferzellen). Diese können sich dann weiter zu Osteoblasten entwickeln (kubisch geformt und mit einem großen hellen Kern). Osteoblasten synthetisieren die Knochenmatrix, besonders das Typ-I-Kollagen, und kontrollieren die Mineralisierung über die Synthese von OCN, Osteonektin und anderen Proteinen. Osteoblasten, die in der Knochensynthese aktiv sind, bilden außerdem vermehrt ALP. Aus den Osteoblasten können sich wiederum ruhende ausdifferenzierte Knochenzellen (Osteozyten) entwickeln (siehe Abb. 2), die mit 90 % aller Knochenzellen den größten Anteil ausmachen. Sie unterstützen Knochenstruktur und -metabolismus^{98,100,101}.

Auf die Entwicklung der MSCs zu Osteoprogenitorzellen und weiter zu Osteoblasten haben verschiedene Signalwege einen Einfluss, wobei viele Details noch nicht komplett verstanden und erforscht sind. Bekannt ist, dass der *Bone morphogenic protein* (BMP)-Signalweg (TGF β -Superfamilie), der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und der Notch-Signalweg eine Rolle spielen¹⁰². Während der osteogenen Differenzierung ändern dabei die Zellen ihre Form, Struktur und Funktion. Zu Beginn haben die Zellen eine hohe Potenz zur Proliferation, die immer weiter abnimmt, je reifer die Zellen werden. Das Differenzierungspotenzial nimmt im Vergleich dazu immer weiter zu (siehe Abb. 2)¹⁰³.

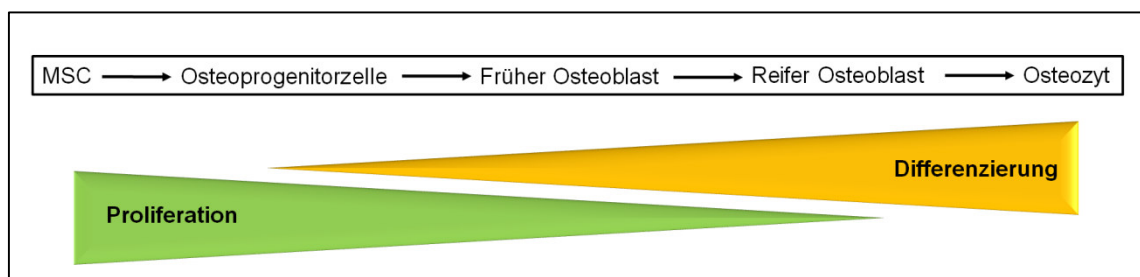


Abb. 2: Osteogene Differenzierung.

Die Mesenchymale Stromazelle (MSC) entwickelt sich zur Osteoprogenitorzelle und dann weiter zu Osteoblast und Osteozyt, wobei das Proliferationspotenzial über die Zeit abnimmt, während das Differenzierungspotenzial zunimmt¹⁰³.

Osteoklasten sind Zellen, die Knochen abbauen können. Sie entwickeln sich aus hämatopoietischen Stammzellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie. Unter Einfluss des *Macrophage colony-stimulating factor* (= Monozytenkolonien-stimulierender Faktor, M-CSF) und anderen Faktoren entsteht zunächst die Osteoklastenvorläuferzelle. Aus dieser differenziert sich der, zuerst noch mononukleäre (einkernige), Osteoklast. Durch Fusion mehrerer mononukleärer Osteoklasten entsteht der fertige mehrkernige Osteoklast¹⁰⁴. Für die Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten spielen neben M-CSF auch der *Receptor Activator of NF-κB Ligand* (RANKL)¹⁰⁵ und verschiedene Interleukine (IL-1, IL-6, IL-11) eine entscheidende Rolle. Über RANKL wird außerdem die knochenabbauende Aktivität der Osteoklasten vermittelt¹⁰⁶. Im Gegensatz dazu bindet Osteoprotegerin (OPG) an RANKL und hemmt seine Wirkung und damit die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. OPG und RANKL können von Osteoblasten exprimiert werden, welche so die Osteoklastenaktivität mit steuern können¹⁰⁷. Osteoklasten bauen den Knochen zum einen dadurch ab, dass sie einen niedrigen *potentia hydrogenii* (pH)-Wert durch Protonentransport schaffen, durch den die Mineralsalze des Knochens aufgelöst werden. Zum anderen geben sie proteolytische Enzyme ab, die die kollagene Knochenmatrix auflösen. Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau. Bei Ungleichgewicht zugunsten des Knochenabbaus kommt es zu einer Verringerung der Knochenmasse, wodurch es zur Entwicklung von Osteoporose kommt. Dabei spielt zum einen eine verminderte Aktivität der Osteoblasten und zum anderen eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten eine Rolle¹⁰⁸. Die Ursachen sind vielfältig. Bei der primären Osteoporose findet man keine erkennbare Ursache. Sie tritt vor allem im Alter auf. Änderungen im Hormonhaushalt (besonders postmenopausal) führen vermutlich zu einer erhöhten Knochenresorption ohne adäquate Kompensation durch Knochenaufbau¹⁰⁹. Bei der sekundären Osteoporose kann eine spezifische Ursache definiert werden. Dazu gehören beispielsweise endokrine Erkrankungen, Tumorerkrankungen oder Nebenwirkungen durch Medikamente. Durch die verminderte Knochendichte besteht bei Osteoporose eine erhöhte Frakturgefahr¹¹⁰.

1.2.3. Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein sehr komplexer Vorgang. Viele verschiedene Zellen, Moleküle und Signalstoffe sind daran beteiligt¹¹¹. Grundsätzlich teilt man die Frakturheilung in eine indirekte und eine direkte Form ein. Die indirekte oder auch sekundäre Frakturheilung kommt dabei häufiger vor. Sie tritt normalerweise nach nicht-operativer Frakturbehandlung, sowie bei bestimmten operativen Versorgungsmethoden (zum

Beispiel durch Marknagel oder Fixateur externe) auf. Hierbei ist keine exakte anatomische Rekonstruktion notwendig und es ist noch ein gewisses Maß an Bewegung zwischen den Frakturrenden vorhanden ¹¹².

Die Knochenheilung ist ein dynamischer Prozess, welcher aus den Stadien der Inflammation, Reparatur und *Remodeling* besteht. Im ersten Schritt nach Auftreten der Fraktur bildet sich ein Bluterguss (Frakturhämatom), der Zellen aus dem peripheren und intramedullären Blut, sowie aus dem Knochenmark, enthält. Es kommt zur Gerinnung und zur Formierung eines Kallus. Durch die akute Entzündungsreaktion kommt es zur Ausschüttung verschiedener Entzündungsstoffe wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-11 und IL-18 ^{112,113}. Diese Moleküle locken weitere Entzündungszellen an und regen die Entwicklung von Blutgefäßen (Angiogenese) an. TNF- α induziert außerdem die osteogene Differenzierung von MSCs. Nach dem initialen Entzündungsprozess werden die MSCs zum Ort des Traumas rekrutiert, was durch BMP7, *stromal cell-derived factor-1* (SDF 1) und die *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4)-Expression beeinflusst wird ¹¹⁴. SDF-1 bindet dabei an seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4 auf der MSC-Oberfläche und aktiviert so intrazelluläre Signalwege, die unter anderem die Wanderung der MSCs zur Frakturstelle bewirken (Chemotaxis) ¹¹⁵. Die MSCs kommen vermutlich aus dem umliegenden Gewebe, dem Knochenmark, von systemisch zirkulierenden MSCs und dem Periost. Es formiert sich dann zunächst ein knorpeliger Kallus, der später durch Knochen ersetzt wird. Hierbei spielen verschiedene Proteine eine wichtige Rolle. BMP2 ist beispielsweise essentiell für die Knochenheilung (Initialisierung der Knochenheilungskaskade und Formierung des Kallus), wobei die genaue Funktion noch unbekannt ist ¹¹⁶. Währenddessen wird vermutet, dass BMP5 und BMP6 die Zellproliferation induzieren ¹¹⁷. M-CSF, RANKL, OPG und TNF- α haben wichtige Funktionen bei der Resorption des Knorpels (TNF- α führt unter anderem zur Apoptose von Chondrozyten), wodurch der Knorpel durch Knochensubstanz ersetzt werden kann. Außerdem fördern diese Proteine die Rekrutierung von Knochenzellen und MSCs zum Ort der Fraktur. Die Differenzierung der pluripotenten MSCs zu Osteoblasten wird von Wnt-Familie-Molekülen reguliert. IGF1, IGF2 und BMP2 sind hochreguliert ^{118,119}. Danach führen die reifen Osteoblasten den *Remodeling*-Prozess durch ¹¹².

Die direkte Frakturheilung benötigt eine anatomisch korrekte und stabile Lage der Frakturrenden zueinander, ohne dass eine Lücke vorhanden ist. Diese Situation tritt meistens nur nach einer offenen operativen Behandlung mit innerer Fixierung der Fraktur (durch Platten, Schrauben, Drähte oder ähnliches) ein. Der Knochen kann sich

dann durch Umbau direkt verbinden, ohne dass eine Kallus-Bildung stattfindet. Osteoklasten und Osteoblasten bilden neue Osteone, die den Frakturspalt durchbauen. Bis eine komplette Heilung eintritt dauert es Monate bis Jahre ¹¹².

1.2.4. Wirkungen von Antikoagulantien auf Knochen: *In vivo* Studien

Für Heparin wurde in vielen Studien gezeigt, dass die Anwendung zu einem Verlust von Knochensubstanz führen kann. Dadurch kommt es zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose und zu einem gehäuften Auftreten von Frakturen. In klinischen Studien wurde bei Patienten mit Langzeiteinnahme von Heparin die Knochendichte gemessen. Dabei zeigte sich besonders bei Einnahme von UFH eine deutliche Reduktion der Knochendichte. Barbour *et al.* wiesen bei 36 % der untersuchten schwangeren Frauen mit Langzeiteinnahme von UFH eine Reduktion der Knochendichte um 10 % nach ¹²⁰. Aber auch klinische Studien mit Enoxaparin zeigten eine signifikante Reduktion der Knochendichte. Bei Schwangeren beschrieben Nelson-Piercy *et al.* 1997 eine signifikante Reduktion der Knochendichte bei 30 % aller untersuchten Schwangeren ¹²¹. Währenddessen haben Wawryzyska *et al.* 2003 bei nicht-schwangeren Patienten nach Therapie mit Enoxaparin eine Abnahme der Knochendichte im Femur um 4,8 % und in der Lendenwirbelsäule um 3,8 % beschrieben ¹²². Tierstudien zeigten für UFH zum einen eine Abnahme der Knochenbildung und zum anderen eine Zunahme des Knochenabbaus. Muir *et al.* zeigten, dass der Verlust der Knochensubstanz besonders in den ersten acht Tagen der Behandlung mit UFH groß ist. In Tierversuchen mit Ratten nahm hier die Osteoblastenoberfläche um 37 % ab, während die Osteoklastenoberfläche um 43 % gesteigert wurde ⁸⁰. Als Ursachen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Einerseits wird vermutet, dass Heparin eine direkte Wirkung auf Osteoblasten, im Sinne einer Aktivitätshemmung, und auf Osteoklasten, im Sinne einer Aktivitätssteigerung, hat ⁸⁰. Andererseits wird postuliert, dass Heparin durch Bindung an Wachstumsfaktoren (wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2) oder Zytokine (wie BMPs, TNF- α), die osteogene Differenzierung beeinflusst ^{123,124}. Desweiteren ist beschrieben, dass Heparin Kalziumionen bindet, wodurch das Kalziumlevel im Körper sinkt, was über Hormonaktivierung zu einer Demineralisierung des Knochens führt ⁸¹. Als Ursache für ein geringeres Osteoporoserisiko beim Einsatz von NMH wird vermutet, dass bei diesen die steigernde Wirkung der UFH auf den Knochenabbau fehlt. Die hemmende Wirkung auf die Knochenbildung in Form einer geringeren Zahl und verminderten Aktivität von Osteoblasten wurde aber auch bei NMH gefunden ¹²⁵. Zur Untersuchung von Frakturheilung unter Einfluss von Heparin gibt es bisher wenige Studien. In einem Tiermodell mit Hasen wurde gezeigt das Enoxaparin die

Knochenheilung einer geschlossenen Rippenfraktur im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert ¹²⁶.

Auch für die Wirkung von Rivaroxaban auf die Frakturheilung *in vivo* wurde vor kurzem eine Studie veröffentlicht. Klüter *et al.* untersuchten die Knochenheilung nach Femur-Frakturen bei Ratten unter täglicher Gabe von Rivaroxaban. Dabei zeigten sich in Bezug auf Knochenstabilität, Kallus- und Knochenvolumen sowie Dichte der Mineralisierung (*tissue mineral density*) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe ¹²⁷. Xia *et al.* beschrieben, ebenfalls nach Untersuchungen an Ratten, weniger negative Auswirkungen auf die Knochenmikrostruktur nach Gabe von Rivaroxaban über vier Wochen im Vergleich mit Heparin ¹²⁸.

1.2.5. Wirkungen von Antikoagulantien auf Knochen: *In vitro* Studien

In verschiedenen *in vitro* Studien wurde die Wirkung unterschiedlicher Antikoagulantien auf Osteoblasten untersucht. Handschin *et al.* verglichen 2005 das NMH Dalteparin mit Fondaparinux. Sie zeigten eine signifikante Reduktion der Genexpression von ALP und OCN in Osteoblasten für Dalteparin in Konzentrationen von 300 µg/ml und 900 µg/ml. Außerdem sank die Gesamt-Protein-Konzentration unter Einfluss von Dalteparin. Für Fondaparinux wurden keine signifikanten Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel festgestellt ¹²⁹. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch NMH sowohl die OCN-Expression, als auch die *Runt-related transcription factor 2* (Runx2)-Expression vermindert wird. Die Tatsache, dass Heparin die Expression von Genen hemmt, die notwendig für die Osteoblasten-Funktion sind, lässt einen direkten negativen Effekt von Heparin auf die Knochenbildung vermuten ¹³⁰. Ähnliche Ergebnisse zeigten Winkler *et al.* bei einem Vergleich zwischen UFH, dem NMH Dalteparin und dem direkten Thrombin-Inhibitor Melagatran. Die ALP-Aktivität in humanen Osteoblasten wurde hier unter Einfluss von UFH auf 32 % gesenkt, unter Melagatran auf 66 % und unter Dalteparin auf 70 % (in den höchsten eingesetzten Konzentrationen von 50 I.E./ml bzw. 50 nmol/ml). Die Proliferation der Osteoblasten wurde unter niedrigen Konzentrationen von UFH und NMH gesteigert, bei der höchsten Konzentration allerdings deutlich gehemmt. Melagatran führte nur in der höchsten Konzentration zu einer geringen Hemmung der Proliferation, hatte also insgesamt geringere Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel als die beiden getesteten Heparine ¹³¹. Auch Kock und Handschin zeigten 2002 einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von Osteoblasten von vier verschiedenen NMH (Certoparin, Nadroparin, Enoxaparin und Dalteparin). Alle NMH wurden mit einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt und die Osteoblasten wurden 48 oder 96 Stunden kultiviert ¹³².

Der Einfluss von Rivaroxaban auf Osteoblasten wurde *in vitro* bisher von zwei Arbeitsgruppen untersucht. Gigi *et al.* zeigten eine signifikante Hemmung des Wachstums der eingesetzten humanen Osteoblasten-Zelllinie SaO₂ unter Rivaroxaban sowie einen signifikanten Abfall der Aktivität der ALP. Effekte auf die Mineralisierung wurden nicht festgestellt^{133,134}. Solayar *et al.* verglichen die Wirkung von Rivaroxaban und Enoxaparin auf humane Osteoblasten *in vitro*. Sie zeigten, dass die Lebensfähigkeit der Zellen nicht negativ beeinflusst wurde, aber die Osteoblastenfunktion unter Einfluss beider Medikamente gehemmt wurde. Dies wurde durch Abnahme der Aktivität der ALP, sowie einer geringeren Genexpression verschiedener Knochenmarker (OCN, Runx2 und BMP2) beschrieben¹³⁵. In der Diskussion (siehe Kapitel 4.3) wird auf diese Studien noch genauer eingegangen.

1.3. Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Rivaroxaban und Enoxaparin auf die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen und damit auf die frühe Phase der Knochenheilung. Beide Medikamente werden momentan unter anderem nach orthopädischen Operationen oder bei Immobilisation, beispielsweise aufgrund von Frakturen, zur VTE-Prophylaxe eingesetzt. Der Einsatz fällt daher auch besonders in einer Phase, in der Knochenheilung ablaufen sollte.

Bisher sind die Auswirkungen beider Medikamente auf Proliferation, Differenzierung und Kalzifizierung von mesenchymalen Stromazellen weitgehend unbekannt. Bei Enoxaparin kann aufgrund der bisherigen Studienergebnisse ein negativer Einfluss vermutet werden, wobei dieser bisher nicht für die Phase während der Entwicklung von MSCs zu Osteoblasten gezeigt wurde. Bisherige Studien zeigten vornehmlich die Wirkung von Heparin auf reife Osteoblasten. Im Vergleich dazu ist Rivaroxaban erst seit einigen Jahren zugelassen und insgesamt weniger erforscht worden. Die bisherige Studienlage lässt noch keine Aussage darüber zu, ob Rivaroxaban ähnlich negative Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel hat. Mit der Untersuchung der Einflüsse auf die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten sollten Auswirkungen beider Medikamente auf einen entscheidenden Teil der Knochenheilung gezeigt werden. Dies sollte durch die Wahl der Untersuchungsmethoden auf verschiedenen Ebenen gezeigt werden. Die Änderung der Expression von Oberflächenmolekülen wurde hierbei erstmals in diesem Zusammenhang bestimmt. Da beide Antikoagulantien ähnliche Indikationen haben, könnten weniger negative Effekte auf den Knochenstoffwechsel durch eines der Antikoagulantien seinen Einsatz, besonders im orthopädischen Bereich, unterstreichen.

2. Material und Methoden

2.1. Gewinnung der mesenchymalen Stromazellen

2.1.1. Patientenkollektiv

Vor Beginn der Studie wurde ein Ethikvotum der Uniklinik Düsseldorf erteilt (Nummer 3899). Die Patienten wurden vor der Operation über die zusätzliche Entnahme von Knochenmark aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis dazu. Insgesamt wurden 9 Patienten in die Studie eingeschlossen (4 weiblich, 5 männlich). Das Alter lag zwischen 11 und 80 Jahren. Der Mittelwert betrug 32 (± 7) Jahre, der Median lag bei 25 Jahren.

Die MSCs wurden bei elektiven Operationen entweder aus dem Darmbein oder aus Hüftpfanne und proximalem Femur gewonnen. Dabei gab es drei Gruppen von Patienten. Bei einem Teil der Patienten handelte es sich um Knochenmarkspender. Bei einem weiteren Teil wurde Knochenmark zur Herstellung von *Bone Marrow Aspirate Concentrate* (BMAC) benötigt, um damit einen Knochendefekt aufzufüllen. Außerdem wurde Knochenmark aus Material von Patienten gewonnen, die einen elektiven Hüftgelenkersatz erhielten. Bei keinem dieser Patienten war eine Erkrankung des Knochenmarks bekannt.

2.1.2. Operative Beschaffung des Knochenmarks

Bei vier in der vorliegenden Studie aufgenommenen Patienten handelte es sich um Knochenmarkspender, bei weiteren vier Patienten wurde Knochenmark zur Herstellung von BMAC entnommen. Beim BMAC handelt es sich um konzentriertes Knochenmark, welches besonders reich an MSCs ist. Die Patienten, bei denen BMAC angewendet wird, haben einen Knochendefekt, beispielsweise eine Knochenzyste, der unter Zusatz des konzentrierten Knochenmarks wieder aufgefüllt werden soll. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass es durch das BMAC zu einer Neubildung von Knochensubstanz in dem vorhandenen Knochendefekt kommt^{136,137,138}. In dieser Studie wurde das *SmartPReP™ 2* BMAC System von *Harvest Technologies GmbH* (München, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde den Patienten Knochenmark entnommen, wobei der Ablauf der Entnahme bei Knochenmarkspendern und BMAC-Patienten equivalent ist. Hierzu wurde eine Jamshidi-Trokarnadel in einem Winkel von 30° zur Horizontalen etwa 5 cm tief an der Spina iliaca anterior superior (oder posterior superior) ins Becken gebohrt (siehe Abb. 3). Mit Hilfe einer Spritze, die vorher mit

2. Material und Methoden

Heparin (Liquemin, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) durchspült wurde, konnten durch Aspiration insgesamt 60-120 ml Knochenmark - bei Knochenmarkspendern bis zu 1500 ml - entnommen werden. Nach vorherigem Einverständnis wurden für die Versuche einige Milliliter des Knochenmarks von vier Knochenmarkspendern verwendet.



Abb. 3: Entnahme des Knochenmarks aus dem Darmbein bei einem operativen Eingriff. Eine Trokarnadel wird etwa 5 cm tief ins Becken gebohrt (hier im Bereich der Spina iliaca anterior superior). Mit Hilfe einer Spritze kann dann das Knochenmark aspiriert werden.

Für die Herstellung des BMAC wurde dieses Knochenmark dann mit Hilfe des *SmartPreP™ 2 Centrifuge-Systems* konzentriert. Hierbei werden im ersten Zentrifugationsdurchlauf die schweren roten Blutkörperchen von den leichteren nukleären Zellen, den Blutplättchen und dem Blutplasma getrennt. Die nukleären Zellen werden gemeinsam mit den Blutplättchen und dem Blutplasma automatisch in eine zweite Kammer überführt. Hier werden sie erneut durch Zentrifugation konzentriert und ein Teil des Blutplasmas wird entfernt. Die zellulären Bestandteile werden dann mit dem restlichen Blutplasma vermischt und es bleiben von den ursprünglichen 60 ml etwa 7-20 ml BMAC übrig. Dieses BMAC wird in der Folge aus der von außen

unsterilen Spritze über einen sterilen Aufsatz in eine sterile Spritze am Operationstisch überführt ¹³⁸. Vermischt mit bovinem Knochenersatzmaterial (Orthoss[®], Geistlich *Biomaterials*, Baden-Baden, Deutschland) als Trägersubstanz wird das BMAC in den vorhandenen Knochendefekt gefüllt (siehe Abb. 4). Durch die Stammzellen kommt es in den folgenden Wochen zu einer Neubildung von Knochen ^{138,139}.



Abb. 4: Bone Marrow Aspirate Concentrate (BMAC) vermischt mit Knochenersatzmaterial (Orthoss[®]).

Mit diesem Gemisch kann nun ein Knochendefekt aufgefüllt werden.

Für diese Studie wurde bei vier Patienten etwas mehr Knochenmark abgenommen und dadurch mehr BMAC als benötigt hergestellt. Aus diesem BMAC konnten nun die MSCs für die Versuche angezüchtet werden (siehe Kapitel 2.2.).

Eine dritte Quelle für die Gewinnung von Knochenmark für unsere Studien war Material, das beim Hüftgelenkersatz mit Einsatz einer Hüfttotalendoprothese anfällt. Hierbei wurde eine Patientin in unsere Studie eingeschlossen. Bei dem Ersatz des Hüftgelenks durch eine Endoprothese wird der alte Hüftkopf osteotomiert und anschließend verworfen. Außerdem werden die Hüftpfanne und der innere Femurschaft aufgefräst. Hierbei fällt Knochensubstanz an, in der neben Spongiosa auch Knochenmark enthalten ist. Aus diesem Material können, nach Entfernung der festen Bestandteile, wiederum MSCs isoliert werden.

2.2. Isolation und Expansion der mesenchymalen Stromazellen

2.2.1. Aufbereitung der mesenchymalen Stromazellen

Zur Anzucht der mesenchymalen Stromazellen wurde das Knochenmark zunächst 1:1 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; Sigma-Aldrich, St Louis, *united states of america* (USA)) verdünnt. In einem 50 ml-Röhrchen (*Becton, Dickinson and Company*, Heidelberg, Deutschland) wurden 15 ml Lymphozyten-Separations-Medium (*PAA Laboratories GmbH*, Cölbe, Deutschland) vorgelegt, auf die dann bis zu 35 ml des Knochenmark-PBS-Gemisches aufgeschichtet wurden. Durch Zentrifugation der Probe (20 min, 690g, 20°C, ohne Bremse; *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf) entstanden mehrere Phasen. Oben sammelte sich Serum, unten die schweren Erythrozyten und in der Mitte eine Interphase bestehend aus mononukleären Zellen. Diese wurden in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde bis 50 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (5 min, 560g, 20°C). Danach wurde das PBS dekantiert und das Zellpellet wurde zur Erythrozytenlyse in 10 ml NH₄Cl resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 ml PBS gestoppt. Die Probe wurde nun erneut zentrifugiert (5 min, 560g, 20°C), dekantiert und noch einmal mit 50 ml PBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Basalmedium resuspendiert. Die Zusammensetzung des Basalmediums ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Basalmediums.

Stoff	Menge	Firma
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) <i>low glucose</i>	ad 600 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
<i>Fetale Bovine Serum</i> (FBS) <i>Superior</i>	100 ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
10.000 Einheiten Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin/ 200 mM L-Glutamin (PSG) in 0,9 % Natriumchlorid	5 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, USA

Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung (*Trypan Blue Solution*, 0,4 %, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) vermischt. Hierdurch kann man zwischen vitalen und toten Zellen unterscheiden. Die vitalen Zellen bleiben ungefärbt, während bei den toten Zellen der Farbstoff durch die zerstörte Zellmembran eindringen kann und diese blau färbt ¹⁴⁰.

10 µl dieser Suspension wurden in eine Neubauerkammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) überführt. Die äußeren vier Großquadrate wurden meanderförmig ausgezählt und über Bestimmung des Mittelwerts wurde die Zellzahl berechnet. Je nach Zellzahl wurde die Zellsuspension auf Gewebekulturflaschen

(Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) entsprechender Wachstumsoberfläche aufgeteilt.

2.2.2. Anzucht der Zellen bis P2

Nach etwa einer Woche erfolgte ein Mediumwechsel, durch den nicht adhärenente Zellen verworfen wurden und frisches Basalmedium auf die Zellen gegeben wurde. Hierbei konnte ausgenutzt werden, dass MSCs plastikadhärent sind, während die meisten hämatopoitischen Zellen in Suspension bleiben¹⁴¹. Wenn sich genügend große Kolonien von über 50 Zellen gebildet hatten, wurden die Zellen nach zwei Wochen enzymatisch passagiert. Dazu wurde auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) gegeben. Durch das Trypsin werden adhärenente Zellen vom Boden der Gewebekulturflaschen gelöst, da extrazelluläre Proteine gespalten werden. Um eine Schädigung der Zellen zu verhindern, wurde nach einer Inkubationszeit von 3-5 Minuten bei 37°C die Reaktion durch Zugabe der gleichen Menge Basalmedium gestoppt. Nach Überführung der Suspension in ein 50 ml-Röhrchen erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation (560g, 20°C). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in Basalmedium resuspendiert. Mithilfe einer Neubauerkammer wurde, wie oben beschrieben, die Zellzahl bestimmt.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4000-5000 Zellen pro cm² in Gewebekulturflaschen neu ausplattiert. Die Zellen wuchsen nun als Monolayer und wurden nach etwa einer Woche erneut passagiert. Die Zellen befanden sich somit in Passage 2. Nach Zellzählung wurden die Zellen in Einfriermedium (FBS + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, St Louis, USA)) in Cryo-Röhrchen (CRYO.STM, Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt, wobei sich maximal 2 x 10⁶ Zellen pro ml Einfriermedium befanden. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff (N₂; MVE Cryosystem 4000) konserviert.

2.3. Osteogene Differenzierung

2.3.1. Zellkultur über 21 Tage

Für die osteogene Differenzierung wurden die MSCs aufgetaut. Dazu wurden die Cryo-Röhrchen im Wasserbad angetaut und dann in ein, mit vorgewärmtem Basalmedium gefülltes, 50 ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde zentrifugiert (5 min, 560g, 20°C), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 10 ml Basalmedium resuspendiert. Nach der Zellzählung wurden ca. 3000 Zellen/cm² in Gewebekulturflaschen (Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bzw. auf 12-*well*-Platten (Nunclon™ *Surface*, Nunc™, *Fisher Scientific*, Schwerte, Deutschland) ausgesät. Außerdem wurden Zellen für die transkriptionelle Analyse und für die durchflusszytometrische Messung vor Differenzierung abgenommen (weiteres Vorgehen siehe Kapitel 2.4. und 2.5.).

Zunächst wurden die Zellen in Basalmedium kultiviert (Tag -3). Am ersten Tag wurde ein Wechsel des Basalmediums durchgeführt, um nicht adhärente (beim Einfrier- und Auftauprozess gestorbene) Zellen zu beseitigen. Am dritten Tag (Tag 0) erfolgte die Induktion der osteogenen Differenzierung durch den Wechsel auf ein speziell darauf abgestimmtes Medium, dessen Zusammensetzung in Tabelle 7 dargestellt ist.

Tabelle 7: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.

Stoff	Menge	Firma
DMEM <i>low glucose</i>	ad 500 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
FBS	100 ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PSG	5 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
20 mM β -Glycerolphosphat	10 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
100 nM Dexamethason	5 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
50 μ M Ascorbinsäure-2-phosphat	500 μ l	Sigma-Aldrich, St Louis, USA

Außerdem wurden nun die jeweiligen Medikamentenkonzentrationen hinzugefügt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Medikamentenkonzentrationen.

Name	Abkürzung	Konzentration
Kontrolle Enoxaparin	KE	Keine Zusätze
Enoxaparin	E1	2 μ g/ml
	E2	10 μ g/ml
	E3	50 μ g/ml

2. Material und Methoden

Name	Abkürzung	Konzentration
Kontrolle Rivaroxaban	KR	0,1 % DMSO
Rivaroxaban	R1	20 ng/ml
	R2	100 ng/ml
	R3	500 ng/ml

Um die jeweilige Konzentration des Medikaments zu erreichen, wurde zunächst eine *Stock-Lösung* hergestellt. Enoxaparin (Clexane® *multidose*, Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland) lag in Form von Injektionsflüssigkeit mit einer Konzentration von 100 mg/ml vor und wurde zum besseren Gebrauch 1:10 mit *Aqua ad injectabilia* (Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt, sodass eine Konzentration von 10 mg/ml vorlag. Von dieser wurden dem Medium bei der Medikamentenzugabe für E1 0,02 %, für E2 0,1 % und für E3 0,5 % bezogen auf das jeweilige Volumen zugefügt, sodass oben genannte Konzentrationen erreicht wurden.

Rivaroxaban wurde freundlicherweise in Form von in DMSO lösbarem Salz von der Firma Bayer bereitgestellt. Eine *Stock-Lösung* von 5 mg Rivaroxaban/ 1 ml DMSO wurde hergestellt. Aus dieser wurden Verdünnungen für die jeweilige Rivaroxaban-Konzentration hergestellt. Für R1 wurde die *Stock-Lösung* 1:250 (500 µg/ml) mit DMSO verdünnt, für R2 1:50 (100 µg/ml) und für R3 1:10 (20 µg/ml). Dadurch konnte bei der Medikamentenzugabe immer das gleiche Volumen, nämlich 0,1 % der jeweiligen Lösung, hinzugefügt werden, um die gewünschten Konzentrationen zu erzielen. Das entspricht der Kontrolle von 0,1 % DMSO.

Die eingesetzten Konzentrationen entsprechen den Plasmakonzentrationen in der klinischen Anwendung beider Medikamente. Die therapeutischen Plasmakonzentrationen liegen bei Enoxaparin zwischen 8 und 12 µg/ml^{43,142} und bei Rivaroxaban zwischen 9 und 125 ng/ml^{60,66}.

Die Zellen wurden dann für 7, 14 oder 21 Tage kultiviert. Hierbei wurde zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel inklusive Zugabe des jeweiligen Medikaments durchgeführt. Für jeden Messpunkt wurden Zellkulturflaschen bzw. *well*-Platten mit allen verschiedenen Konzentrationen der Medikamente sowie der beiden Kontrollen angesetzt. Abb. 5 zeigt den zeitlichen Ablauf der Zellkulturarbeit.

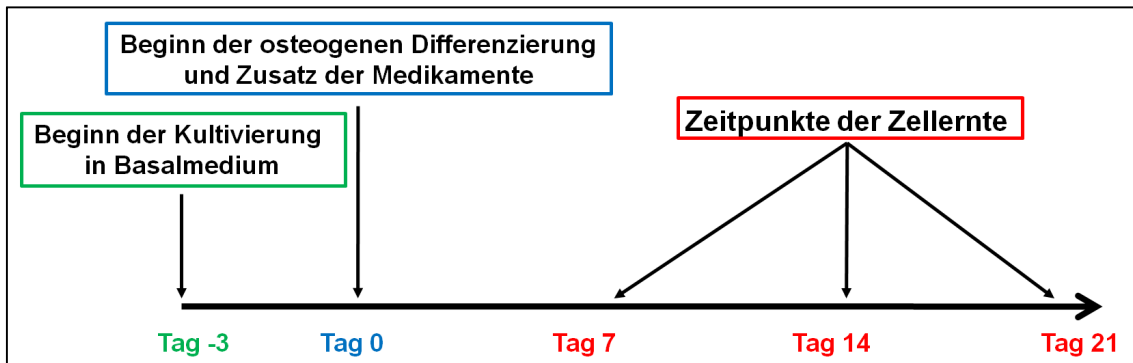


Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Zellkulturarbeit.

Zunächst erfolgte der Beginn der Kultivierung der Mesenchymalen Stromazellen (MSCs) in Basalmedium für drei Tage, bevor die osteogene Differenzierung und der Zusatz der Medikamente an Tag 0 stattfanden. An Tag 7, 14 und 21 wurden jeweils Zellen geerntet und die verschiedenen Messungen wurden durchgeführt.

2.3.2. Analyse der Proliferation mittels Zellzählung

An den Tagen 7, 14 und 21 nach Beginn der osteogenen Differenzierung wurde von jeder Medikamentenkonzentration und den Kontrollen jeweils eine T75-Gewebekulturflasche geerntet. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit Trypsin-EDTA inkubiert, mit frischem Basalmedium abgestoppt und zusätzlich mit Hilfe eines Zellschabers (*Cell-scraper*, Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) von der Oberfläche gelöst. Die 12-*well*-Platten wurden nicht passagiert, da bei diesen Färbungen an den adhärennten Zellen durchgeführt wurden (siehe 2.6.).

Es erfolgte die Zellzählung mithilfe der Neubauerkammer wie oben beschrieben. Aus dieser Zellzahl (N) wurde jeweils in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl (N_0) die Generationszahl (n) berechnet. Diese beschreibt, wie viele Generationen sich bis zu diesem Zeit entwickelt haben und berechnet sich folgendermaßen:

$$n = (\log(N) - \log(N_0)) / \log(2).$$

Danach wurden die Zellen aufgeteilt. Ein Teil wurde für die durchflusszytometrische Analyse verwendet, während der andere Teil für die transkriptionelle Analyse in RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Zusatz von 10 $\mu\text{l/ml}$ 2-Mercaptoethanol (VWR, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen wurde. Hierzu wurden die Zellen zunächst pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in einem adäquaten Volumen RLT-Puffer ($< 5 \times 10^6$ Zellen: 350 μL ; $< 1 \times 10^7$ Zellen: 600 μL) resuspendiert. Durch den RLT-Puffer kommt es zur Lyse der Zellen, wodurch die zu untersuchende RNA freigesetzt wird. Die Probe wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C eingefroren.

2.4. Transkriptionelle Analyse

2.4.1. Einleitung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Detektion und Vervielfachung spezifischer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnitte, welches mit Hilfe von DNA-Polymerasen *in vitro* durchgeführt wird. In dieser Arbeit wurde die so genannte quantitative *real-time* Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) verwendet. Dies ist eine Form der PCR, bei welcher die Daten bezüglich der Amplifikation der DNA-Stränge während der Reaktion in Echtzeit (*real-time*) gesammelt werden. Damit kann eine Aussage getroffen werden, wie viel von einer bestimmten Boten-Ribonukleinsäure (*messenger RNA*, mRNA) in der Probe vorhanden war. Die mRNA ist ein Transkript der DNA, welches in eukaryotischen Zellen im Zellkern entsteht, dann ins Zytoplasma transportiert wird und dort die Synthese bestimmter Proteine kodiert. Bei der PCR werden aber DNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt, welche entsprechend einer DNA-Matrize DNA-Stränge herstellen. Dies bedingt, dass die mRNA, nachdem diese isoliert wurde, zunächst zu einem komplementären DNA-Strang (*complementary DNA*, cDNA) transkribiert werden muss. Dieses Verfahren wird mit Hilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, den so genannten Reversen Transkriptasen (RT) durchgeführt. Diese cDNA ist anschließend Ausgangsprodukt für die qRT-PCR.

2.4.2. RNA-Isolierung

Für den ersten Schritt, die RNA-Isolierung, wurde das *RNeasy Mini-Kit* in Verbindung mit dem RNase-freiem DNase-Set, jeweils von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung der RNA an eine Siliciumdioxidmembran, während DNA und Zellbestandteile in mehreren Waschschrritten ausgetragen und die RNA schließlich mit Wasser eluiert wird. Vor dem Gebrauch der im Kit enthaltenen Puffer muss der RPE-Puffer im Verhältnis 1:4 mit 100 % Ethanol verdünnt und dem RLT-Puffer 10 µl/ml β-Mercaptoethanol zugesetzt werden. Zunächst wurde die in RLT-Puffer aufgenommene und bei -80°C eingefrorene Probe aufgetaut, auf eine *QIAshredder*-Säule pipettiert und zentrifugiert (2 min, 16440g, 20°C; *MIKRO 22R*, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Dies bewirkt eine Fragmentierung hochmolekularer Substanzen wie DNA im Säulenfilter und verringert die Viskosität der Lösung. Zu dem Lysat wurde nun das gleiche Volumen 70 %iges Ethanol gegeben, um beim anschließenden Auftragen der Probe auf die im Kit enthaltene Säule (*RNeasy*

Mini Spin Column) die Bindung an die Siliciumdioxidmembran zu ermöglichen. Die beladene Säule wurde danach zentrifugiert (1 min, 9730g, 10°C) und der Durchfluss wurde verworfen. In der Folge wurden die empfohlenen Waschschriffe mit den im Kit enthaltenen Puffern durchgeführt. Während dieser Waschungen wurde ein zusätzlicher Schritt zur DNA-Degradation durch DNasen mit Hilfe des RNase-freien DNase-Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Durchfluss und Sammelröhrchen wurden anschließend verworfen und die *RNeasy*-Säule auf ein neues 2 ml Sammelröhrchen gesetzt. Danach folgte eine Zentrifugation mit offenen Deckeln (5 min, 16440g, 20 °C), um den restlichen Puffer von der Membran zu entfernen. In einem frischen 1,5 ml Auffanggefäß (*Eppendorf Tube*, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde 1 µl RNasin® (*Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor*, Promega, Madison, WI, USA) vorgelegt, bevor die *RNeasy*-Säule auf dieses Gefäß gesetzt wurde. Dann wurden je nach Zahl der vorher in RLT-Puffer aufgenommenen Zellen 30-50 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert. Bei bis zu 1×10^6 Zellen wurden 30 µl, bei $1-1,5 \times 10^6$ Zellen 40 µl und bei über $1,5 \times 10^6$ Zellen 50 µl RNase-freies Wasser verwendet. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (1 min, 9730g, 10°C) wurde anschließend die isolierte RNA eluiert. Die *RNeasy*-Säule wurde verworfen. 1,5 µl des Eluats wurden zur RNA-Konzentrationsbestimmung auf den *NanoDrop 2000* (Peqlap, Erlangen, Deutschland) pipettiert. Dieser kann über eine spektrophotometrische Messung die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe berechnen (Software: *Thermo Fisher Scientific Inc.* Version 1.4.2). Danach wurden alle Proben bei -80°C eingefroren.

2.4.3. Reverse Transkription

Den nächsten Schritt bildet die Herstellung der cDNA, da RNA von den in der qRT-PCR eingesetzten DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, wie oben beschrieben, nicht abgelesen werden kann. Um gezielt die in der Lösung enthaltenen mRNA-Stränge umzuschreiben, werden Oligo(dT)-Primer eingesetzt. Diese lagern sich an den poly(A)-Schwanz der mRNA-Stränge an und stellen so die als Startpunkt für die Transkription benötigte Hydroxygruppe zur Verfügung. Die Reverse Transkriptase (RT) bildet dann durch die Anlagerung von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) den cDNA-Strang. Der Vorgang ist in Abb. 6 anschaulich dargestellt. Die Ausführungen beruhen auf den Erkenntnissen von Sambrook und Russell¹⁴³.

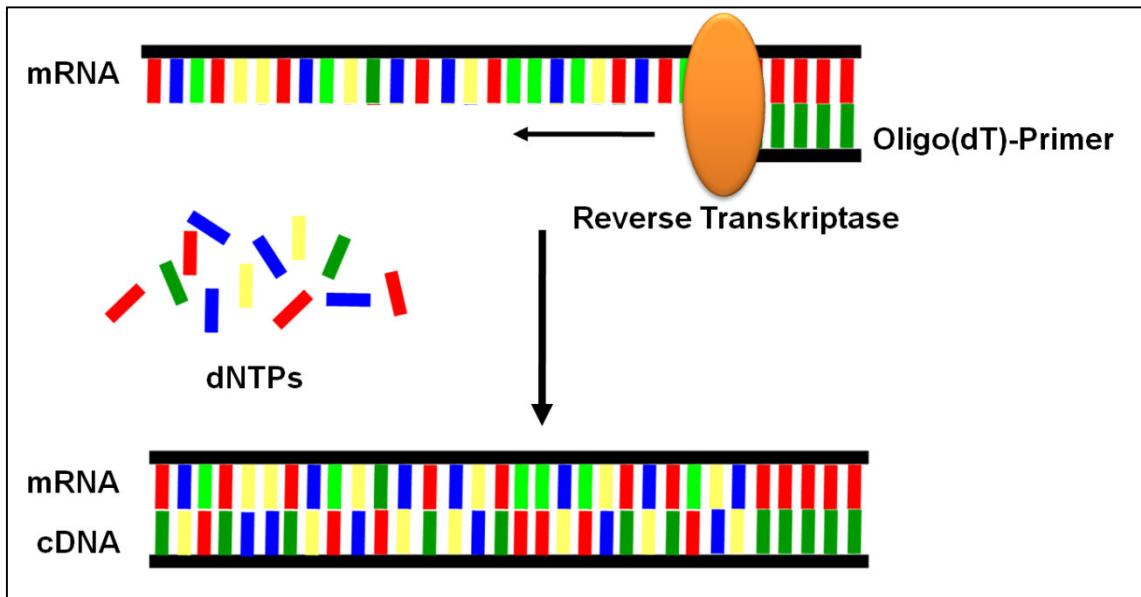


Abb. 6: Prinzip der Reversen Transkription.

Oligo(dT)-Primer lagern sich an den Poly(A)-Schwanz der mRNA-Stränge an und stellen so die als Startpunkt für die Transkription benötigte Hydroxygruppe zur Verfügung. Die Reverse Transkriptase (RT) bildet dann durch die Anlagerung von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) den cDNA-Strang.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Synthese der cDNA das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen (Hilden, Deutschland) benutzt. 1 µg der RNA wurde gemäß des Schemas (Tabelle 9) mit gDNA Puffer (7 x) und RNase-freiem Wasser in einem 8er PCR-Streifen 0,2 ml (Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gemischt. Im *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Wesseling, Deutschland) wurden die Proben zwei Minuten lang auf 42°C erhitzt. Danach wurden RT-Puffer, RT und RT-Primer (Oligo(dT)-Primer) zur Probe pipettiert. Diese 20 µl wurden nun 15 Minuten bei 42°C erhitzt und im letzten Schritt drei Minuten bei 95°C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

Tabelle 9: Pipettierschema für die cDNA-Synthese.

Lösung	Volumen pro Reaktionsansatz
RNA (1 µg)	x µl
gDNA Puffer (7x)	2 µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl
RT-Puffer	4 µl
RT	1 µl
RT-Primer	1 µl

2.4.4. Polymerase-Kettenreaktion

Nun folgte die eigentliche Vervielfachung der DNA. Dazu benötigt die DNA-Polymerase einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, welches entsprechend verlängert wird. Ein solches für den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt, der für ein bestimmtes Protein kodiert, spezifisches Oligonukleotid von ca. 20 Basen Länge (Primer) wird dem Reaktionsansatz zugefügt. Die Primer lagern sich an die cDNA an (Primerhybridisierung) und werden von der Polymerase durch die Anlagerung von freien dNTPs verlängert (Elongation). Durch anschließende Denaturierung der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge, können neue Primermoleküle hybridisieren und der Prozess wiederholt sich. Durch Zugabe von zwei verschiedenen Primern (*forward* und *reverse*), von denen einer am sogenannten *sense*- und einer am *antisense*-Strang bindet, erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts (siehe Abb. 7). Ein Amplifikationszyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, welche bei drei unterschiedlichen Temperaturen stattfinden. Die Verwendung temperaturstabiler DNA-Polymerasen ermöglicht einen Ablauf der gesamten Reaktion ohne Unterbrechung.

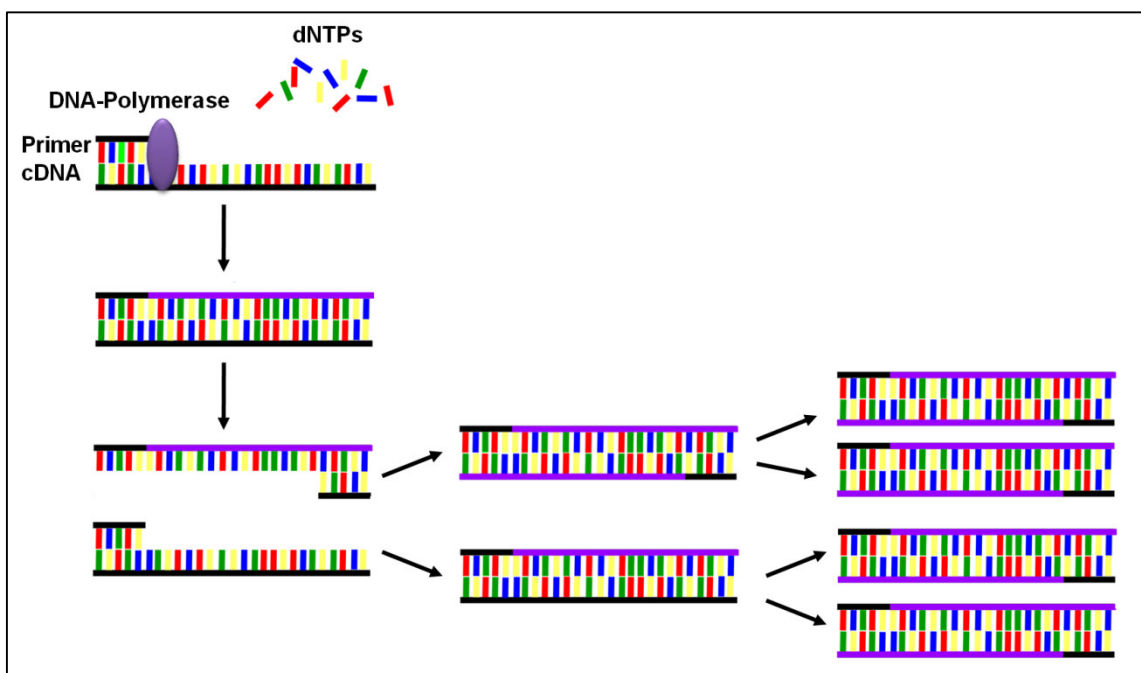


Abb. 7: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.

Ein spezifischer Primer lagert sich an die cDNA an (Primerhybridisierung) und wird von der DNA-Polymerase, durch die Anlagerung von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), verlängert (Elongation). Durch anschließende Denaturierung der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge, können neue Primermoleküle hybridisieren und der Prozess wiederholt sich. Durch Zugabe von zwei verschiedenen Primern (*forward* und *reverse*), von denen einer am sogenannten *sense*- und einer am *antisense*-Strang bindet, erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde zur Durchführung der qRT-PCR ein *StepOne Real-Time PCR* System unter Nutzung des *SYBR Green PCR Master Mix* (beide von *Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA*) verwendet. In einem 500 µl-Eppendorf-Tube wurden für jede Reaktion 12,5 µl *SYBR Green PCR Master Mix* mit 50 ng cDNA und der entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser (*Millipore Corporation, Billerica, USA*) vermischt, um ein Volumen von 23 µl pro Reaktion zu erhalten. Je 1 µl Primer wurde in ein well der 48-well-Platte (*MicroAmp™, Fast optical 48-well reaction plate* (0,1 ml), *Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA*) vorgelegt, bevor die hergestellte Mischung in die wells pipettiert wurde. Jede Messung wurde im Doppelansatz durchgeführt. Zusätzlich wurde für jede Probe eine Kontrollmessung ohne Primer und für jeden Primer eine Kontrollmessung ohne cDNA durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Primer mit der Beschreibung, für welches Protein dieser Teil der mRNA kodiert, ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer.

Name	Beschreibung	forward (5'-3')	reverse (3'-5')
ALPL	<i>Alkaline Phosphatase, liver/bone/kidney</i>	CTGGGAGATGGGATGGGTG	GTGCCCTCATTGGCCTTCA
B2M	β -2-Mikroglobulin	GGCTATCCAGCGTACTCCAA	GACAAGTCTGAATGCTCCACTT
BGLAP	<i>Osteocalcin / bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP)</i>	GAGCCCTCACACTCCTCG	TCAGCCAACTCGTCACAGT
BMP2	<i>bone morphogenetic protein II</i>	CAGCCGAGCCAACACTGT	AGGTGATAAACTCCTCCGTGG
CDH11	<i>Cadherin-11 (Osteoblastencadherin)</i>	ACAGCCCGATAAGGTATTCCATC	ATGCCGATTGTGGATTCTGC
COL1A1	<i>Collagen I A1</i>	Qiagen Hs_COL1A1_1_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	
DKK1	<i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>	CGTCACGCTATGTGCTGC	ACCTTCTTGTCTTTGGTGTGA
GAPDH	<i>Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase</i>	GAAGGCTGGGGCTCATTTG	CAGGAGGCATTGCTGATGATC
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>	Qiagen Hs_IGF2_1_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	
IGFBP2	<i>insulin-like growth factor binding protein 2</i>	Qiagen Hs_IGFBP2_1_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	
PRKCa	<i>Proteinkinase C alpha</i>	Qiagen Hs_PRKCa_1_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	
RANKL	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11</i>	Qiagen Hs_TNFSF11_1_SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>	
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>	AGTGGACGAGGCAAGAGTTT	TGTCTGTGCCTTCTGGGTTT
SP7	<i>Osterix / Sp7 transcription factor</i>	CTGCTTGAGGAGGAAGTTCAC	AAGGAGCCCATTAGTGCTTGTA

Die verwendeten Primer stammten entweder von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) oder von der Firma Biolegio (Nimwegen, Niederlande).

Das Cycler-Programm begann mit 10 min initialer Denaturierung bei 95°C. Dann folgten 40 Zyklen jeweils 15 sek bei 95°C und 1 min bei 60°C. Am Ende folgte eine Schmelzkurve zur Qualitätskontrolle der vervielfältigten DNA-Stücke. Dazu wurde die Temperatur von 60°C bis 95°C in 0,5°C-Schritten erhöht und dazwischen jeweils die Fluoreszenzstärke des *SYBR-Green* gemessen. Mit Hilfe der *Step-One-Software* wurden nun die C_t -Werte bestimmt. Der C_t -Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus) beschreibt bei der qRT-PCR die Anzahl an Zyklen, die benötigt werden, damit das Fluoreszenzsignal des *SYBR-Green*, welches durch die Bindung an doppelsträngige DNA entsteht, über einen definierten Fluoreszenzwert steigt. Ist mehr doppelsträngige DNA in der Ausgangsprobe vorhanden, entstehen mehr Kopien in den Polymerisierungszyklen und es kommt schneller zur Überschreitung des Schwellenwertes. Die C_t -Werte der Zielgene werden dann mit den Werten sogenannter *Housekeeping-Gene* (HKG) verglichen (ΔC_t -Wert). HKG werden ubiquitär und homogen exprimiert. Dadurch können technische Fehler, die gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen, eliminiert werden. Als HKG wurde bei dieser Arbeit entweder B2M oder GAPDH verwendet. Unterschiede im Expressionslevel der Zielgene zwischen den einzelnen Proben wurden dann zur Bestimmung der relativen Genexpression mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, bezogen auf die jeweilige Kontrolle (KE bzw. KR), bestimmt¹⁴⁴.

2.5. Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

2.5.1. Markierung der Zellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Eigenschaften von Zellen, wie Größe, Form, Granularität und Struktur, analysiert werden. Zusätzlich kann die Expression von Oberflächenmolekülen (Proteine nach der CD-Klassifizierung, *CD = cluster of differentiation*) auf Zellen bestimmt werden. Hierzu binden Fluorochrom-markierte Antikörper an den Antigenen der entsprechenden Zellen.

An Tag 0 und an den Messpunkten (Tag 7, 14, 21) wurde die entsprechende Zellzahl in Medium abgenommen, so dass für jeden Ansatz 2×10^5 Zellen vorlagen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 560g, 5°C) und der Überstand danach entfernt. Das Zellpellet wurde mit 400 µl Isotone II (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) resuspendiert und dann auf vier Röhrchen aufgeteilt (BD *Falcon, Polystyrene Round-Bottom Tube*, BD *Biosciences*, Heidelberg, Deutschland). Nun folgte die Zugabe der Antikörper nach den Volumina, die in Tabelle 11 angegeben sind. Die Markierung erfolgte mit den vier verschiedenen Farbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll-Cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5) oder Allophycocyanin (APC). Es handelt sich um humane Antikörper aus dem Wirt Maus. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Antikörper.

Nummer	Antikörper	Typ	Markierung	Klon	Volumen	Hersteller
Marker 1	CD92	IgG _{2b}	FITC	VIM-15b	10 µl	Acris <i>Antibodies</i> GmbH (Herford)
	CD49e	IgG ₁	PE	IIA1	10 µl	BD <i>Biosciences</i> (Heidelberg)
	CD34	IgG ₁	PerCP-Cy 5.5	8G12	10 µl	BD <i>Biosciences</i>
	CD45	IgG ₁	APC	2D1	3 µl	BD <i>Biosciences</i>
Marker 2	CD10	IgG ₁	FITC	HI10a	10 µl	BD <i>Biosciences</i>
	CD73	IgG ₁	PE	AD2	3 µl	BD <i>Biosciences</i>
	CD105	IgG ₁	PerCP-Cy 5.5	266	3 µl	BD <i>Biosciences</i>
	CD90	IgG ₁	APC	5E10	3 µl 1:10 verdünnt	BD <i>Biosciences</i>
Isotyp 1	Isotyp	IgG _{2b}	FITC	27-35	10 µl	BD <i>Biosciences</i>
	Isotyp	IgG ₁	PE	MOPC-21	10 µl	BD <i>Biosciences</i>
	Isotyp	IgG ₁	PerCP-Cy 5.5	MOPC-21	10 µl	BD <i>Biosciences</i>
	Isotyp	IgG ₁	APC	MOPC-21	10 µl	BD <i>Biosciences</i>

2. Material und Methoden

Nummer	Antikörper	Typ	Markierung	Klon	Volumen	Hersteller
Isotyp 2	Isotyp	IgG ₁	FITC	MOPC-21	10 µl	BD Biosciences
	Isotyp	IgG ₁	PE	MOPC-21	10 µl	BD Biosciences
	Isotyp	IgG ₁	PerCP-Cy 5.5	MOPC-21	10 µl	BD Biosciences
	Isotyp	IgG ₁	APC	MOPC-21	10 µl	BD Biosciences

Danach wurden zur Fixierung der Zellen und zum Auswaschen ungebundener Antikörper 2 ml Isotone II mit 0,1 % Formaldehyd (*methanol-free, ultrapure, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland*) zugegeben. Die Röhren wurden zentrifugiert (5 min, 560g, 5°C), der Überstand dekantiert und es wurden etwa 200 µl frisches Isotone II zugegeben. Innerhalb der folgenden zehn Tage wurde die Messung durchgeführt.

2.5.2. Messung

Die Messung erfolgte mit einem FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Hierbei wird die Zellsuspension von einer Kapillare angesaugt und die Zellen gelangen einzeln in die sogenannte Durchflusszelle. In dieser werden sie im Falle des BD FACSCalibur-Systems von zwei Lasern, einem blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einem roten Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm, angeregt. Detektoren messen dann zum einen die Lichtstreuung und zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Farbstoffe (Fluorochrome), die, gebunden an die eingesetzten Antikörper, an den Antigenen der Zelle binden. Bei der Lichtstreuung wird einerseits das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*), das von der Größe der Zelle abhängig ist, und das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*), das von der Granularität der Zelle anhängt, detektiert. In einem sogenannten Punktwolkendiagramm wird jede Zelle als Punkt dargestellt. Die Lage dieses Punktes hängt von Größe und Granularität ab, da das Vorwärtsstreulicht auf der x-Achse und das Seitwärtsstreulicht auf der y-Achse aufgetragen wird. Zellen einer Population, die ähnliche Streueigenschaften haben, bilden so eine Punktwolke. Es kann dadurch eingegrenzt werden, welche Zellen für die Messung berücksichtigt werden sollen (siehe Abb. 8a). Für die hier durchgeführten Versuche wurden so die lebenden MSCs, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten ausgewählt.

Die Messung des Fluoreszenzlichtes erfolgt mit Hilfe von vier Fluoreszenzkanälen. Wenn der passende Laserstrahl auf die Fluorochrome trifft, die über die Antikörper an den Antigenen der Zellen binden, entsteht wiederum Licht in der Wellenlänge des jeweiligen Fluorochroms. Dieses Licht wird dann, je nach Wellenlänge, in einem

2. Material und Methoden

anderen Fluoreszenzkanal von Multiplikatoren in ein elektrisches Signal umgewandelt. Mit dem FACSCalibur gelingt die Messung von vier verschiedenen Fluorochrome unterschiedlicher Emissionsspektren gleichzeitig.

Die Auswertung erfolgte wiederum mit Hilfe eines Punktwolkendiagramms, in dem die Fluoreszenzintensität der Zelle, gleichbedeutend mit der Expression des entsprechenden Oberflächenmarkers, auf der x-Achse gegen das Seitwärtsstreulicht auf der y-Achse aufgetragen wurde. Positive Zellen mussten über der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Isotypenkontrolle des eingesetzten Farbstoffes liegen (siehe Abb. 8b). Die Lage der Trennlinie wird durch die Messung der jeweiligen Isotypenkontrolle festgelegt. Außerdem erfolgte eine Auswertung mit Hilfe eines Histogramms. Hierbei wurde die Fluoreszenzintensität auf der x-Achse gegen die Zellzahl auf der y-Achse aufgetragen (siehe Abb. 8c). Mit dieser Methode konnte der Median der Fluoreszenzintensität der Zellen der jeweiligen Probe bestimmt werden. Je größer die Expression des gemessenen Oberflächenmarker war, desto mehr Fluorochrom-markierte Antikörper haben an den Zellen gebunden und desto größer war der Median der Fluoreszenzintensität.

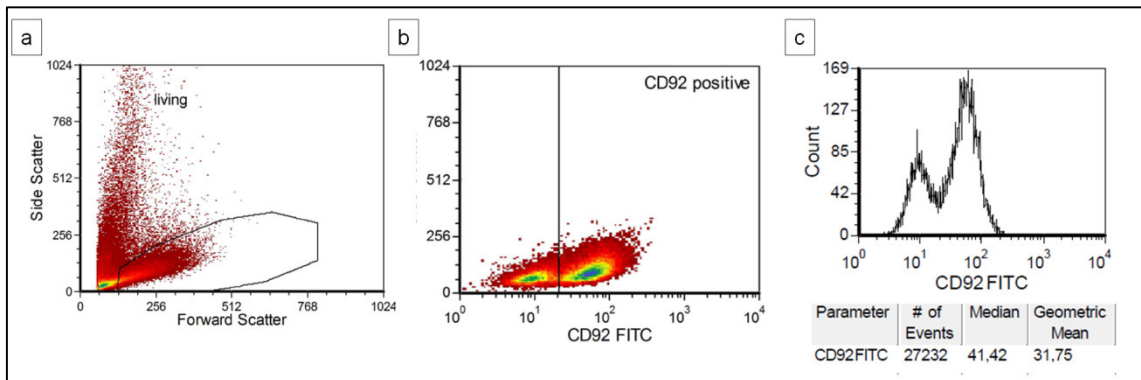


Abb. 8: Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.

Zunächst werden die Zellen anhand der Lichtstreuung in einem Punktwolkendiagramm dargestellt (a). Zellen mit ähnlichen Streueigenschaften bilden eine Punktwolke und so können die lebendigen Zellen der osteogenen Entwicklungsreihe für die weitere Analyse ausgewählt werden. Nach Bindung Fluoreszenz-markierter Antikörper auf Antigenen der Zellen, wie beispielsweise CD92, kann die Fluoreszenzintensität als Maß der Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls bestimmt werden. Hierzu kann die Auswertung mittels Punktwolkendiagramm (b) oder mittels Histogramm (c) erfolgen. CD = *cluster of differentiation*, FITC = Fluoresceinisothiocyanat

Zur Auswertung wurde die *FCS Express V3 Software* (De Novo Software, Los Angeles, USA) verwendet.

2.6. Histochemische Analyse

2.6.1. Durchführung der Färbungen

12-*well*-Platten wurden nach dem in Abb. 9 dargestellten Schema mit Zellen, Medium und Medikamenten beladen und für 7, 14 oder 21 Tage kultiviert. In je ein *well* der Platte wurde die entsprechende Konzentration eines der beiden Medikamente gegeben. Außerdem wurden die beiden Kontrollen durchgeführt und zusätzlich wurde ein *well* als Negativkontrolle (NK) mit Basalmedium und nicht mit dem osteogenen Differenzierungsmedium gefüllt.

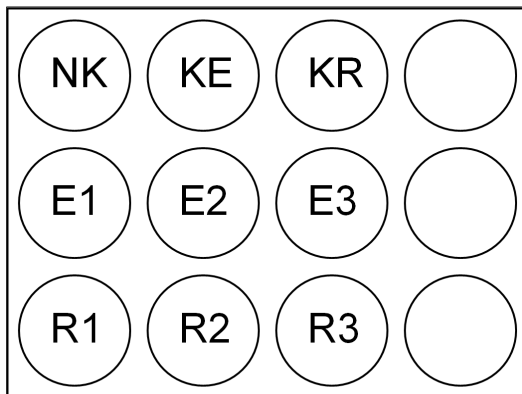


Abb. 9: Belegung der 12-*well*-Platten für die Durchführung der Färbungen.

Für die Färbungen mit Alizarin-Rot und Alkalischer Phosphatase wurden jeweils 2 Platten mit mesenchymalen Stromazellen (MSCs) beladen und über 7, 14 oder 21 Tage kultiviert.

Jedes *well* wurde mit einer anderen Medium- bzw. Medikamentenzusammensetzung befüllt. NK = Negativ-Kontrolle (Basalmedium), KE = Kontrolle Enoxaparin = Osteogenes Differenzierungsmedium ohne Zusätze. KR = Kontrolle Rivaroxaban = Osteogenes Differenzierungsmedium + DMSO. E1 = 2 µg/ml, E2 = 10 µg/ml, E3 = 50 µg/ml Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

Für die Durchführung der Färbungen an den Kinetiktagen wurde zuerst der Kulturüberstand in den *wells* abpipettiert und die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden alle *wells* mit phosphatgepufferter Formaldehydlösung 4 % (Roti[®]-Histofix, säurefrei, pH 7, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt und die Zellen so fixiert. Nach 10 minütiger Wartezeit wurden die *wells* mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde bei einer 12-*well*-Platte die Alkalische-Phosphatase-Färbung und an einer anderen Platte die Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt.

Für die Färbung der Alkalischen Phosphatase wurde das *Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit* (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) verwendet. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 2 Tropfen von jedem Reagenz des Kits in 5 ml Tris pH 8 (Tris Base (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) gelöst in destilliertem Wasser und dann mit Chlorwasserstoff auf pH 8 eingestellt) gemischt. Von der Färbelösung wurden

500 µl in jedes *well* gegeben. Nach 20-30 minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PBS bedeckt bei 4°C gelagert.

Für die Alizarin-Rot-Färbung wurden 500 µl Alizarin Rot S (40 mM, pH 4,1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in ein *well* gegeben und die Platte 10 min auf einem Orbitalschüttler (3017, GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Danach wurde sie dreimal mit PBS gewaschen, bis kein Farbabgang mehr sichtbar war. Kalzifizierungen bleiben dabei rot angefärbt (Bindung des Farbstoffs an Kalzium)¹⁴⁵. Zur Lagerung wurden die Zellen mit PBS bedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C aufbewahrt.

2.6.2. Mikroskopie und Bildauswertung

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem Stereomikroskop (*SteREO Discovery.V8*) mit einem Achromat S 0.3 x FWD 236 mm Objektiv. Als Software wurde *Axio Vision Software* Version 4.8.1 verwendet (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

Zur Auswertung der aufgenommenen Bilder wurde *ImageJ 1.47v* (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA*) verwendet. Dazu wurden die Aufnahmen der *wells* in dem Programm geöffnet und zunächst kreisförmig die Fläche markiert, die ausgewertet werden sollte. Dann wurde das Bild in einen 16-bit-Typ konvertiert. Dadurch wird das Bild in eine Grauskala umgerechnet, die 256 Stufen enthält. Zur Auswertung wurde der Mittelwert (*Mean*) bestimmt. Ein größerer Mittelwert steht dabei für eine geringere Färbeintensität, da pures Schwarz einem Wert von 0 und pures Weiß einem Wert von 255 entspricht¹⁴⁶. Anschließend wurde der Kehrwert des Mittelwerts berechnet, so dass ein hoher Wert für eine hohe Färbeintensität spricht.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit *GraphPad Prism* (Version 5.01, *GraphPad Software Inc.*, USA) durchgeführt. Die Daten wurden in Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die statistische Untersuchung wurden Kolmogorov-Smirnov-Tests für die Probenverteilung und Friedman *one-way* ANOVA für gepaarte Stichproben mit *post-hoc Dunn's multiple comparison* verwendet. Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn $*p < 0,05$ war. Bei $**p < 0,01$ bzw. $***p < 0,001$ wurden Unterschiede als hoch signifikant bzw. sehr hoch signifikant gewertet. Die bereinigten p-Werte werden im Text genannt, während in den Abbildungen Sternchen verwendet werden, um das Signifikanzniveau anzuzeigen.

3. Ergebnisse

3.1. Effekte auf die Proliferation

Als Parameter für die Proliferation wurde die Generationszahl bestimmt. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass die Proliferation besonders in der ersten Woche nach Beginn der osteogenen Differenzierung hoch ist. In den folgenden Wochen findet Proliferation in geringerem Ausmaß statt, da die Phasen der Matrixbildung und Mineralisierung folgen¹⁴⁷. Daher sind die Generationszahlen nach 21 Tagen Zellkultur nur geringfügig größer als an Tag 7. Bei der Kontrolle ohne Zusätze (KE) lag der Mittelwert der Generationszahl an Tag 7 bei 2,78, stieg dann nach Tag 14 auf 3,10 und an Tag 21 auf 3,30.

Enoxaparin erhöhte die Proliferation in der ersten Woche osteogener Differenzierung dosisabhängig. Bei der niedrigsten Enoxaparin-Konzentration von 2 µg/ml (E1) lag die Generationszahl mit 3,00 über dem Wert der Kontrolle (2,78). Bei 10 µg/ml (E2) und 50 µg/ml (E3) Enoxaparin wurde eine signifikante Steigung der Generationszahl im Vergleich zur Kontrolle auf 3,28 und 3,52 festgestellt (p 0,0278 und 0,0004). Rivaroxaban zeigte in der ersten Woche keinen signifikanten Einfluss auf die Generationszahl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (KR), die bei 2,92 lag. Die Generationszahlen stiegen nur geringfügig auf 3,03, 3,00 und 3,06 für 20 ng/ml (R1), 100 ng/ml (R2) und 500 ng/ml (R3) Rivaroxaban an.

Nach zwei Wochen osteogener Differenzierung wurde die Proliferation der mit Enoxaparin bzw. Rivaroxaban behandelten Zellen nicht signifikant verändert. Bei der niedrigsten Konzentration Enoxaparin stieg die Generationszahl leicht auf 3,27 an, während sie bei den höheren Konzentrationen dosisabhängig in Bezug auf die Kontrolle, die 3,10 betrug, sank (bei E2 auf 3,03 und bei E3 auf 2,98). Die Generationszahl unter Einfluss von 20 ng/ml Rivaroxaban betrug 3,09, der Wert für 100 ng/ml Rivaroxaban war 2,95 und für 500 ng/ml Rivaroxaban ergab sich eine Generationszahl von 2,75. Die DMSO-Kontrolle ergab eine Generationszahl von 2,89.

In der dritten Woche zeigten sich wiederum weder bei Zugabe von Enoxaparin noch bei Zugabe von Rivaroxaban signifikante Änderungen der Generationszahlen. Im Vergleich zu den Kontrollen KE mit 3,30 und KR mit 3,04 lagen sie für Enoxaparin in ansteigender Konzentration bei 3,16, 3,07 und 3,41 und für Rivaroxaban bei 3,00, 3,07 und 3,03. Die Probenzahl betrug an Tag 7 und 14 $n = 7$ und an Tag 21 $n = 5$.

3. Ergebnisse

Die Mittelwerte aus den Generationszahlen für die verschiedenen Proben an den drei Messtagen sind in Abb. 10 dargestellt.

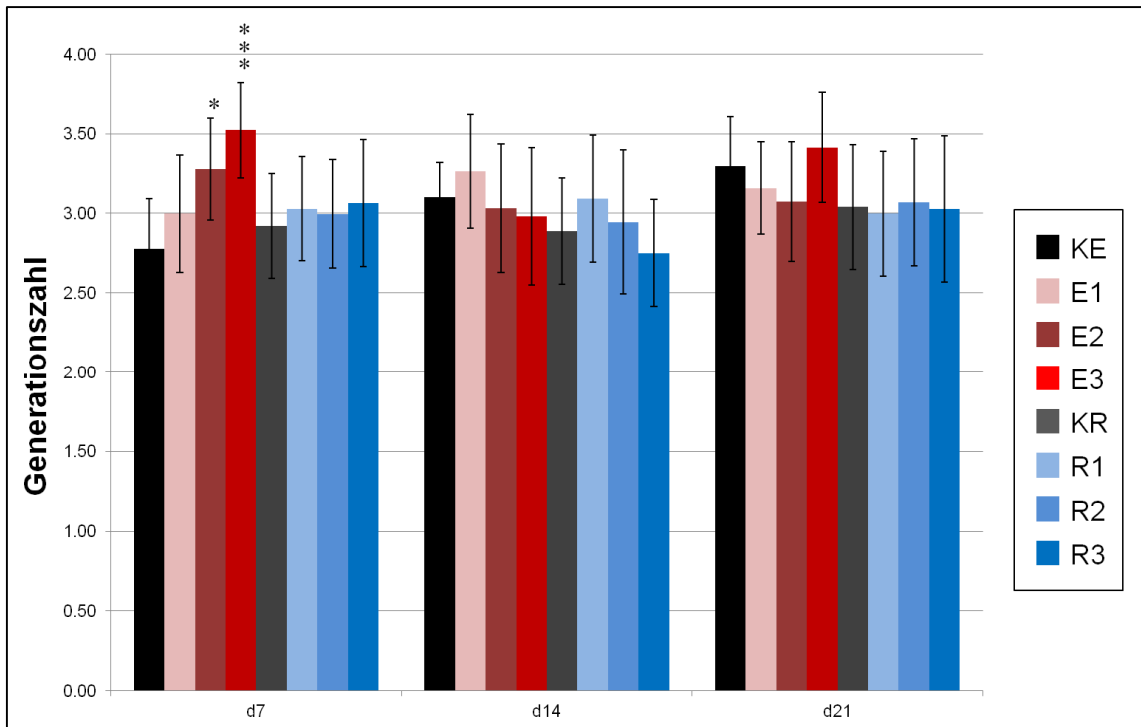


Abb.10: Effekte auf die Proliferation.

Für jede Probe wurde jeweils die Zellzahl bestimmt und daraus die Generationszahl berechnet. Dargestellt sind die Veränderungen des Mittelwerts der Generationszahlen an den 3 Messpunkten (Tag (d) 7, 14 und 21) unter Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen von Enoxaparin und Rivaroxaban. An Tag 7 zeigte sich dabei unter Einfluss von Enoxaparin ein signifikanter Anstieg ($*p < 0,05$) für E2 und ein sehr hoch signifikanter Anstieg ($***p < 0,001$) für E3 im Bezug auf die Kontrolle ($n = 7$ an Tag 7 und 14, bzw. $n = 5$ an Tag 21).

KE = ohne Zusätze; E1 = 2 $\mu\text{g/ml}$, E2 = 10 $\mu\text{g/ml}$, E3 = 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin;
KR = DMSO - Kontrolle; R1 = 20 ng/ml , R2 = 100 ng/ml , R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

3.2. Effekte auf die Genexpression

3.2.1. Veränderung der Genexpression durch osteogene Differenzierung

Insgesamt wurde in dieser Arbeit die Expression der zwölf Gene ALPL, BGLAP, BMP2, CDH11, COL1A1, DKK1, IGF2, IGFBP2, PRKCa, RANKL, Runx2 und SP7 während der osteogenen Differenzierung untersucht. Als HKG zur Bestimmung des ΔC_t -Wertes fungierten B2M und GAPDH.

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung der MSCs in Richtung Osteoblasten änderte sich das Expressionslevel der verwendeten Zielgene. In der Kontrolle ohne Zusätze (KE) stieg die Expression fast aller gewählter Marker, außer BGLAP, im Vergleich zur Messung bei den Ausgangszellen (Tag 0), an. Um das zu zeigen wurde die Expression der einzelnen Marker von Tag 7 und Tag 14 auf die Expression an Tag 0 bezogen.

Signifikante Anstiege zeigten sich dabei an Tag 7 bei mehreren Markern. Die ALPL-Expression stieg im Vergleich zu Tag 0 auf 4,49 (p 0,0260), BMP2 auf 4,29 (p 0,0351), COL1A1 auf 2,56 (p 0,0231), DKK1 auf 5,35 (p 0,0340), PRKCa auf 1,95 (p 0,0443) und SP7 auf 4,76 (p 0,0461). IGFBP2 wurde nach 7 Tagen osteogener Differenzierung mehr als 26-fach stärker exprimiert (26,35; p 0,0143) und IGF2 sogar über 156-fach (156,31; p 0,0137). Währenddessen sank die Expression von BGLAP an Tag 7 leicht, auf 0,97 im Vergleich zu den Werten an Tag 0. An Tag 14 war die Änderung signifikant mit einem Wert von 0,13 (p 0,0007). Im Gegensatz dazu stieg auch nach 14 Tagen die Genexpression der meisten Marker im Vergleich zur Expression in den undifferenzierten Zellen an, jedoch nur für IGFBP2 signifikant (15,77; p 0,0369). Die PRKCa-Expression sank nach 14 Tagen auf 0,61 (p 0,0216).

Die Probenanzahl betrug an Tag 7 $n = 5$ und an Tag 14 $n = 3$. An Tag 21 wurde keine RT-PCR durchgeführt. Ursachen für die sinkende Probenzahl, so dass an Tag 21 keine Messung der Genexpression möglich war, waren die starke Verkalkung und Aggregation der Zellen. Das führte dazu, dass nicht ausreichend viel RNA isoliert werden konnte. Zusätzlich wurde an Tag 0 nicht bei allen Zellreihen eine qRT-PCR durchgeführt. In Abb. 11 ist die relative Genexpression für alle Marker für die Kontrollgruppe KE ohne Medikamentenzusätze an Tag 7 und Tag 14 in Bezug zur Genexpression der Marker in den MSCs an Tag 0 dargestellt.

3. Ergebnisse

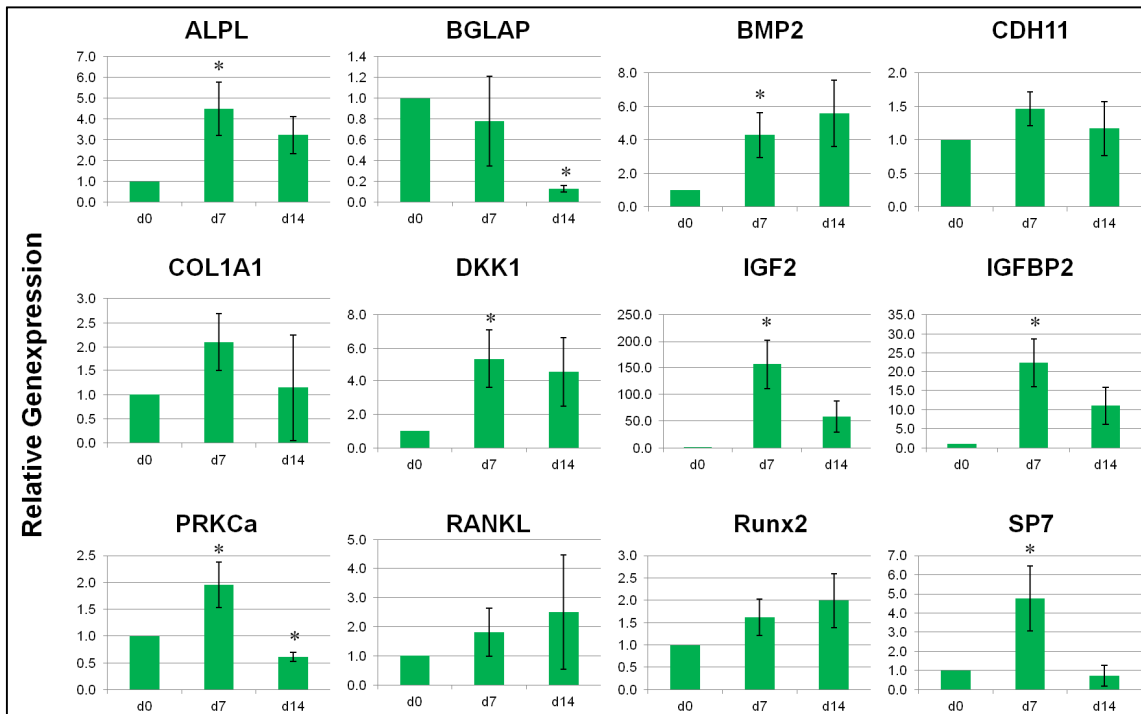


Abb. 11: Veränderung der relative Genexpression durch osteogene Differenzierung.

Die Genexpression der 12 Marker in der Kontrollgruppe (KE) von Tag 7 und 14 (d7 und d14) wurde in Bezug zur Genexpression der mesenchymalen Stromazellen (MSCs) an Tag 0 gesetzt. Es zeigten sich signifikante Anstiege der Genexpression an Tag 7 bei ALPL, BMP2, DKK1, IGF2, IGFBP2, PRKCa und SP7. An Tag 14 war der Anstieg noch bei IGFBP2 signifikant und die BGLAP- sowie PRKCa-Expression waren signifikant verringert (*p < 0,05, n = 5 an Tag 7, n = 3 an Tag 14).

Alkaline phosphatase liver/bone/kidney-type (ALPL), bone γ -carboxy- glutamic acid-containing protein (BGLAP), bone morphogenic protein 2 (BMP2), Cadherin-11 (CDH11), Kollagen 1 A1 (COL1A1), dickkopf Wnt-signaling pathway inhibitor 1 (DKK1), insulin-like growth factor 2 (IGF2), insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2), Proteinkinase C alpha (PRKCa), Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Transkriptionsfaktor SP7 (SP7, = Osterix).

3.2.2. Effekte der Medikamente auf die Expression osteogener Marker

Es wurde die relative Genexpression der Marker in Bezug auf die jeweilige Kontrolle für alle Proben an Tag 7 und 14 bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl an Proben an Tag 7 bei $n = 7$ lag, während an Tag 14 $n = 5$ Proben ausgewertet wurden. Nach 7 Tagen zeigte sich in der qRT-PCR von Marker-Genen, die bei der osteogenen Differenzierung von MSCs eine Rolle spielen, unter Enoxaparin-Einfluss insgesamt eine Abnahme des Expressionslevels in Bezug zur Kontrolle. Rivaroxaban hatte nur wenig Einfluss auf die Expression der verwendeten Marker. Dazu gehören unter anderen ALPL, BGLAP und BMP2. Die Expression von ALPL sank für die drei Enoxaparin-Konzentrationen in ansteigender Dosierung signifikant auf 0,71, 0,74 und 0,73 (p 0,0213, 0,0044 und 0,0267). Die relative Genexpression von BGLAP war dosisabhängig vermindert auf 0,68, 0,65 und 0,63 (p 0,0247, 0,0005, 0,0088). Auf etwa die Hälfte reduziert war der mRNA-Gehalt von BMP2 mit 0,47 für die niedrigste Konzentration Enoxaparin und 0,50 bzw. 0,53 bei den beiden höheren Konzentrationen (p 0,0014, 0,0019, 0,0042). Währenddessen wurde nach 7 Tagen unter Einfluss von Rivaroxaban keine signifikante Änderung des Expressionslevels dieser Gene festgestellt. Für COL1A1 zeigte sich weder unter Enoxaparin-, noch unter Rivaroxaban-Einfluss eine signifikante Änderung der Genexpression nach einer Woche Zellkultur. Zwei Wochen nach Beginn der osteogenen Differenzierung war der Einfluss von Enoxaparin immer noch sichtbar, aber die Abnahme im Expressionslevel war bei ALPL, BGLAP und BMP2 nicht mehr signifikant. Bei ALPL sank die Genexpression in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration in ansteigender Menge Enoxaparin auf 0,80, 0,81 und 0,79. Für BGLAP bzw. BMP2 betragen die Werte 0,84, 0,88 und 0,80 bzw. 0,75, 0,81 und 0,78. Dafür zeigte sich an Tag 14 eine hoch signifikante Abnahme des Expressionslevels von COL1A1 unter Enoxaparin Zugabe, die sich an Tag 7 noch nicht gezeigt hatte. Im Vergleich zur Kontrolle sank dieses auf 0,29, 0,27 und 0,39 unter Zugabe ansteigender Enoxaparin-Menge (p 0,0025, 0,0022, 0,0097). Die Zugabe von Rivaroxaban zeigte auch nach 14 Tagen keine signifikanten Änderungen der Expression von ALPL, BGLAP, BMP2 oder COL1A1. Abb. 12 zeigt die Werte der Genexpression bezogen auf die jeweilige Kontrolle nach 7 und 14 Tagen osteogener Differenzierung der Marker ALPL, BGLAP, BMP2 und COL1A1.

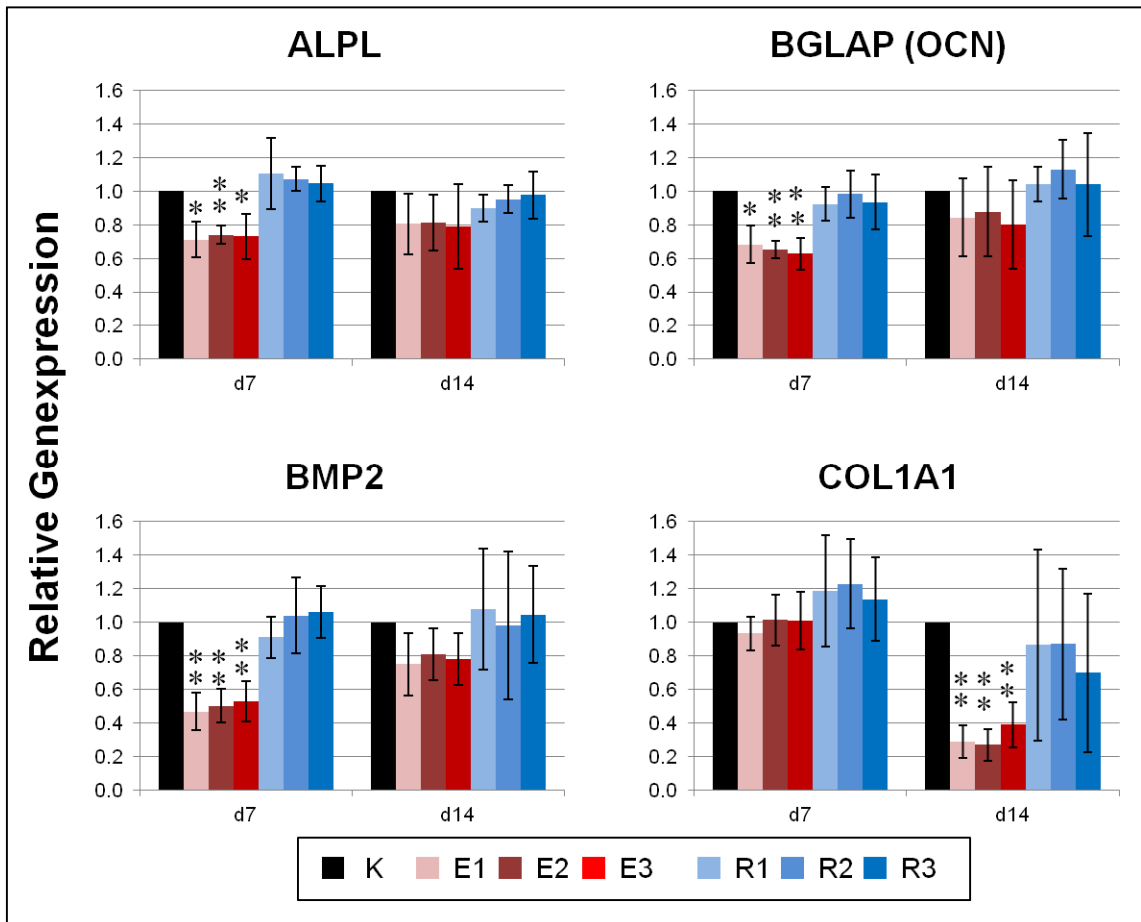


Abb. 12: Genexpression von ALPL, BGLAP, BMP2 und COL1A1.

An Tag 7 zeigten sich für alle Konzentrationen Enoxaparin eine erniedrigte Expression von ALPL, BGLAP und BMP2. Diese waren signifikant oder hoch-signifikant (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Die COL1A1-Expression war an Tag 14 unter Einfluss von Enoxaparin hoch signifikant herunterreguliert (** $p < 0,01$). Rivaroxaban hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der hier dargestellten Marker ($n = 7$ an Tag 7, $n = 5$ an Tag 14).

KE = ohne Zusätze; E1 = 2 $\mu\text{g/ml}$, E2 = 10 $\mu\text{g/ml}$, E3 = 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin;

KR = DMSO - Kontrolle; R1 = 20 ng/ml , R2 = 100 ng/ml , R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

Alkaline phosphatase liver/bone/kidney-type (ALPL), *bone γ -carboxy- glutamic acid-containing protein* (BGLAP) = Osteocalcin (OCN), *bone morphogenic protein 2* (BMP2), Kollagen I A1 (COL1A1).

Enoxaparin-Zugabe führte nach 7 Tagen auch zu einer signifikanten Reduktion der Expressionslevel des Osteoblasten-spezifischen Cadherins CDH11 und des Wnt-Signalweg-Inhibitors DKK1. In ansteigender Enoxaparin-Konzentration betrug die relative Genexpression von CDH11 0,74, 0,71 und 0,73 (p 0,0110, 0,0148 und 0,0240) und von DKK1 0,72, 0,69 und 0,73 (p 0,0178, 0,0106 und 0,0446). Die qRT-PCR dieser beiden Marker an Tag 14 ergab unter Enoxaparin ebenfalls eine Abnahme der Expressionslevel. Diese war allerdings für CDH11 nur bei der geringsten Enoxaparin-Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ signifikant (0,54 mit p 0,0178) und für DKK1 bei der Enoxaparin-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,54 mit p 0,0286). Rivaroxaban führte zu keinen signifikanten Änderungen des Expressionslevels von CDH11. Die DKK1-

3. Ergebnisse

Expression sank an Tag 7 auf 0,98 für R1, 0,94 für R2 und 0,91 für R3, wobei nur die Zugabe von 500 ng/ml (R3) eine signifikante Abnahme erzeugte (p 0,0288). An Tag 14 wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt. Die graphische Auswertung der Genexpression von CDH11 und DKK1 unter Zugabe von Enoxaparin bzw. Rivaroxaban ist in Abb. 13 dargestellt.

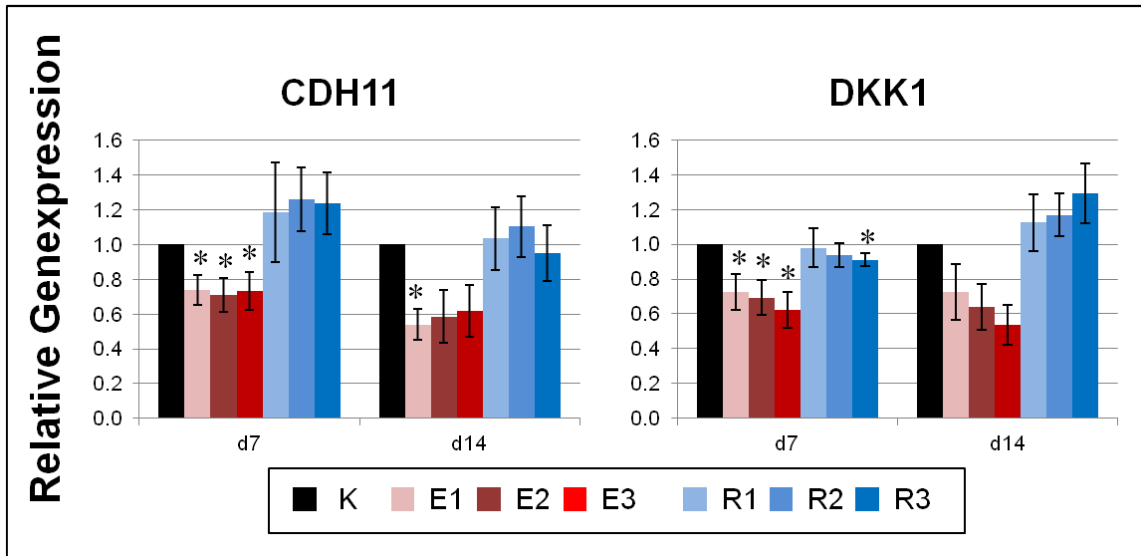


Abb. 13: Genexpression von CDH11 und DKK1.

Die Genexpression von CDH11 und DKK1 war an Tag 7 (d7) bei allen Enoxaparin-Konzentrationen signifikant kleiner im Bezug auf die Expression in der Kontrollgruppe. Auch Rivaroxaban führte an Tag 7 dosisabhängig zu einer Abnahme der DKK1-Expression. An Tag 14 (d14) war eine signifikante Abnahme der CDH11-Genexpression unter der niedrigsten Dosis Enoxaparin messbar (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 7$ an Tag 7, $n = 5$ an Tag 14).

K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 $\mu\text{g/ml}$, E2 = 10 $\mu\text{g/ml}$, E3 = 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban. Cadherin-11 (CDH11), *dickkopf Wnt-signaling pathway inhibitor 1* (DKK1).

Auch die Expressionen des Wachstumsfaktors IGF2 und seines Bindungsproteins IGFBP2 waren nach 7 Tagen osteogener Differenzierung unter dem Einfluss von Enoxaparin im Vergleich zur Kontrolle nach unten reguliert. Die IGF2-Expression sank im Vergleich zur Kontrolle auf etwa die Hälfte mit Werten von 0,52, 0,54 und 0,53 (p 0,0006, 0,0007, 0,0025), IGFBP2 auf 0,73, 0,82 und 0,82 (p 0,0030, 0,0396, 0,0039) nach Zugabe von 2, 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin. An Tag 14 war diese Veränderung nicht mehr signifikant.

Die Messungen der Rivaroxaban-behandelten Zellen zeigten eine signifikante Steigerung des Expressionslevels von IGF2 an Tag 14 bei einer Konzentration von 20 ng/ml und 100 ng/ml Rivaroxaban mit 1,28 und 1,35 (p 0,0348, 0,0099). Der Wert bei 500 ng/ml Rivaroxaban war nicht signifikant erhöht (1,15, p 0,2410). Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen der Expression von IGFBP2 unter Einfluss von Rivaroxaban. Abb. 14 zeigt die Genexpression von IGF2 und IGFBP2 unter Einfluss

3. Ergebnisse

von Rivaroxaban und Enoxaparin an Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung im Bezug zur jeweiligen Kontrollgruppe.

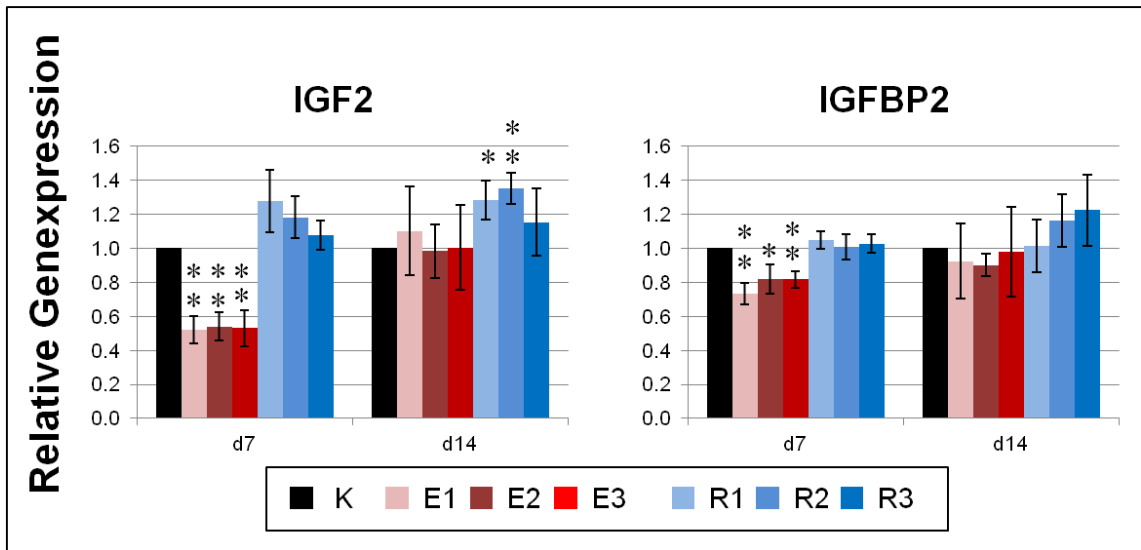


Abb. 14: Genexpression von IGF2 und IGFBP2.

Unter Einfluss von Enoxaparin war die IGF2- und die IGFBP2-Expression an Tag 7 (d7) signifikant bis hoch signifikant bei allen eingesetzten Konzentration in Bezug auf die Kontrolle erniedrigt. Dieser Einfluss war an Tag 14 (d14) nicht mehr sichtbar. Rivaroxaban hatte an Tag 7 keinen Einfluss auf die IGF2- oder IGFBP2-Expression und führte an Tag 14 sogar zu einer signifikanten Steigerung der IGF-2-Expression (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 7$ an Tag 7, $n = 5$ an Tag 14).

K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 $\mu\text{g/ml}$, E2 = 10 $\mu\text{g/ml}$, E3 = 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml , R2 = 100 ng/ml , R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

Insulin-like growth factor 2 (IGF2), insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2).

Weitere osteogene Marker, deren Genexpression bestimmt wurden, waren PRKCa, RANKL, Runx2 und der Knochen-spezifische Transkriptionsfaktor SP7. Das Expressionslevel der PRKCa war dabei an Tag 7 unter Enoxaparin gesunken. Bei den beiden niedrigeren Konzentrationen Enoxaparin sank die PRKCa-Expression signifikant auf 0,77 und 0,74 (p 0,0189 und 0,0203) in Bezug auf die Kontrolle. Bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin war der Wert nicht signifikant auf 0,89 erniedrigt. Ebenfalls dosisabhängig herunter reguliert waren an Tag 7 der osteogenen Differenzierung unter Enoxaparin die Expressionen von RANKL, Runx2 und SP7. In ansteigender Enoxaparin-Konzentration waren die Werte der RANKL-Expression auf 0,80, 0,63 und 0,51 vermindert (p 0,1809, 0,0311, 0,0028). Das Runx2-Genexpressionslevel war im Vergleich zu den Kontrollzellen bei 2 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin auf 0,68, bei 10 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin auf 0,65 und bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin auf 0,62 gesunken (p 0,0198, 0,0099, 0,0034). Für SP7 war die Expression dosisabhängig vermindert auf 0,56 (E1), 0,44 (E2) und 0,39 (E3; p 0,0133, 0,0032, 0,0033). Die Messung des mRNA-Gehaltes von RANKL und Runx2 zeigten auch nach 14 Tagen weiterhin eine signifikante Abnahme des Expressionslevels, allerdings nur unter Einfluss der höchsten

3. Ergebnisse

Enoxaparin-Konzentration. Die RANKL-Expression war dosisabhängig vermindert auf 0,79, 0,59 und 0,55 (p 0,1843, 0,0542, 0,0063). Für Runx2 war die Expression in Bezug auf die Kontrollgruppe für 2 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin 0,81, für 10 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin 0,76 und für 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin 0,77 (p 0,0771, 0,0852, 0,0499). Das Expressionslevel von SP7 konnte an Tag 14 nicht ausgewertet werden, da die Schwankungen zu groß waren und die Expression zu diesem Zeitpunkt zu gering war. Die PRKCa-Expression war an Tag 14 nach Zugabe von Enoxaparin im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert.

Mit Rivaroxaban behandelte Zellen zeigten wiederum nach einer und nach zwei Wochen osteogener Differenzierung keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel der Marker RANKL, Runx2 und SP7 in Bezug auf die DMSO-Kontrolle. Die Expression von PRKCa war unter ansteigender Konzentration Rivaroxaban an Tag 7 erhöht auf 1,30, 1,19 und 1,19, wobei nur unter der Konzentration von 500 ng/ml Rivaroxaban ein signifikanter Wert gezeigt werden konnte (p 0,0274). An Tag 14 ergab sich für die PRKCa-Expression unter Rivaroxaban-Einfluss im Vergleich zu Kontrolle kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 15).

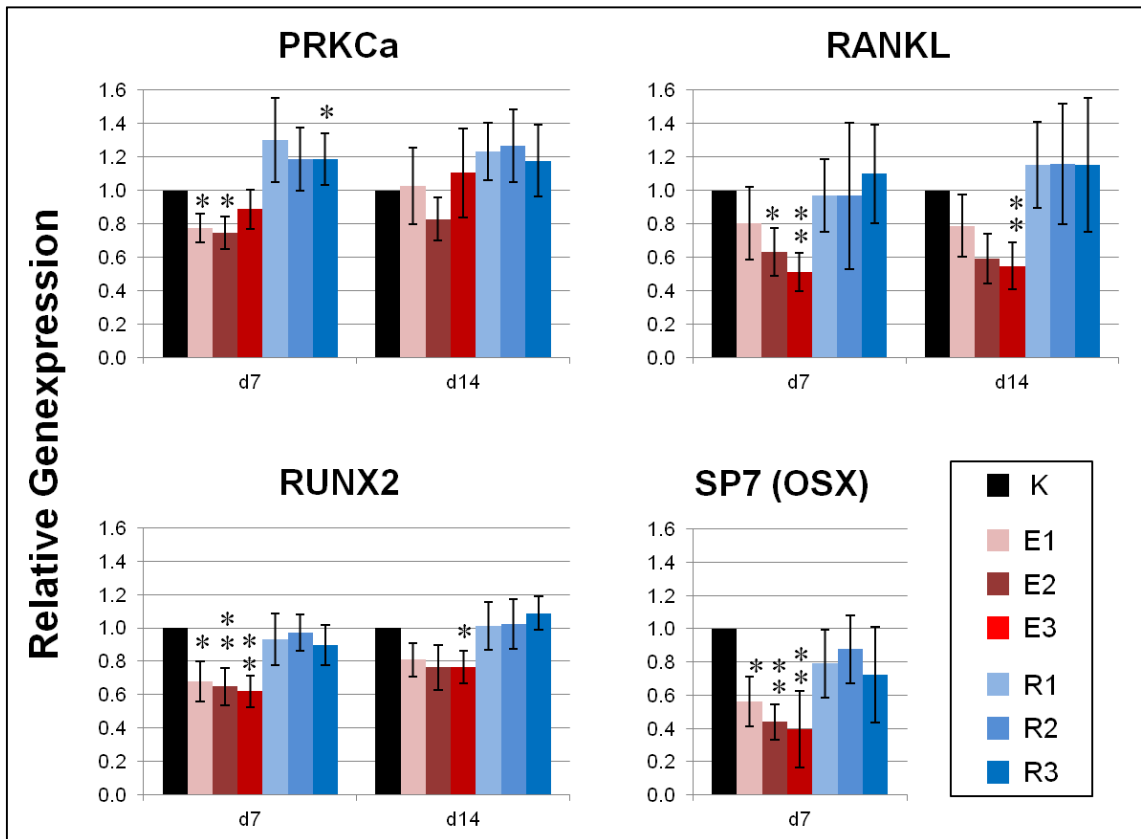


Abb. 15: Genexpression von PRKCa, RANKL, Runx2 und SP7.

Unter Einfluss von Enoxaparin zeigte sich an Tag 7 (d7) eine verminderte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle bei alle hier dargestellten Markern. Dabei war die Runx2- und die SP7-Expression bei allen eingesetzten Konzentrationen Enoxaparin an Tag 7 sigifikant oder hoch sigifikant verringert, bei der PRKCa- und RANKL-Expression führten an Tag 7 die beiden niedrigeren bzw. die beiden höheren Konzentrationen Enoxaparin zu einer signifikanten Abnahme. An Tag 14 konnte eine signifikante Verringerung der Genexpression noch bei Runx2 unter 50 µg/ml Enoxaparin gezeigt werden, wobei die RANKL-Expression sogar hoch sigifikant erniedrigt war. Währenddessen führte Zugabe von Rivaroxaban zu keiner wesentlichen Änderung der Genexpression der hier dargestellten Marker im Bezug auf die DMSO-Kontrolle. Zugabe von 500 ng/ml Rivaroxaban führten an Tag 14 sogar zu einer signifikanten Expressionssteigerung der PRKCa (*p < 0,05, **p < 0,01, n = 7 an Tag 7, n = 5 an Tag 14). K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 µg/ml, E2 = 10 µg/ml, E3 = 50 µg/ml Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban. Proteinkinase C alpha (PRKCa), *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL), *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), Transkriptionsfaktor SP7 (SP7, = Osterix).

3.3. Effekte auf den Immunphänotyp

3.3.1. Unbeeinflusste Oberflächenmoleküle

Mit der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle während der osteogenen Differenzierung untersucht. Unter anderem wurde auch die Expression der beiden hämatopoietischen Antigene CD34 und CD45 gemessen. Beide Oberflächenmoleküle werden auf mesenchymalen Stromazellen und Knochenzellen nicht messbar exprimiert (<2 % der Zellen) ¹⁴¹. Das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der *International Society for Cellular Therapy* hat hierbei Kriterien festgelegt, um humane MSCs zu definieren. Dazu gehört, dass MSCs in einer Standard-Kultur Plastik-adhärenz sein müssen, dass sie *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren und dass die Zellen CD105, CD73 und CD90 exprimieren, während unter anderen CD45 und CD34 nicht exprimiert werden ¹⁴¹. Der Mittelwert in % aller positiven Zellen betrug bei den Messungen dieser Arbeit für CD34 0,63 % ($\pm 0,05$ %) und für CD45 0,36 % ($\pm 0,03$ %) bei der Berechnung aus allen Messungen. Abb. 16 zeigt beispielhaft Punktwolkendiagramme zu CD34 und CD45 an Tag 7, 14 und Tag 21 von den Kontrollzellen ohne Medikamentenzusatz (KE). Dadurch wird verdeutlicht, dass die Expression von CD34 und CD45 zum einen negativ ist und zum anderen auch über die Zeit (Tag 7 bis zu Tag 21) nicht zunimmt. Sowohl MSCs als auch Osteoblasten exprimieren diese beiden Oberflächenmarker nicht.

3. Ergebnisse

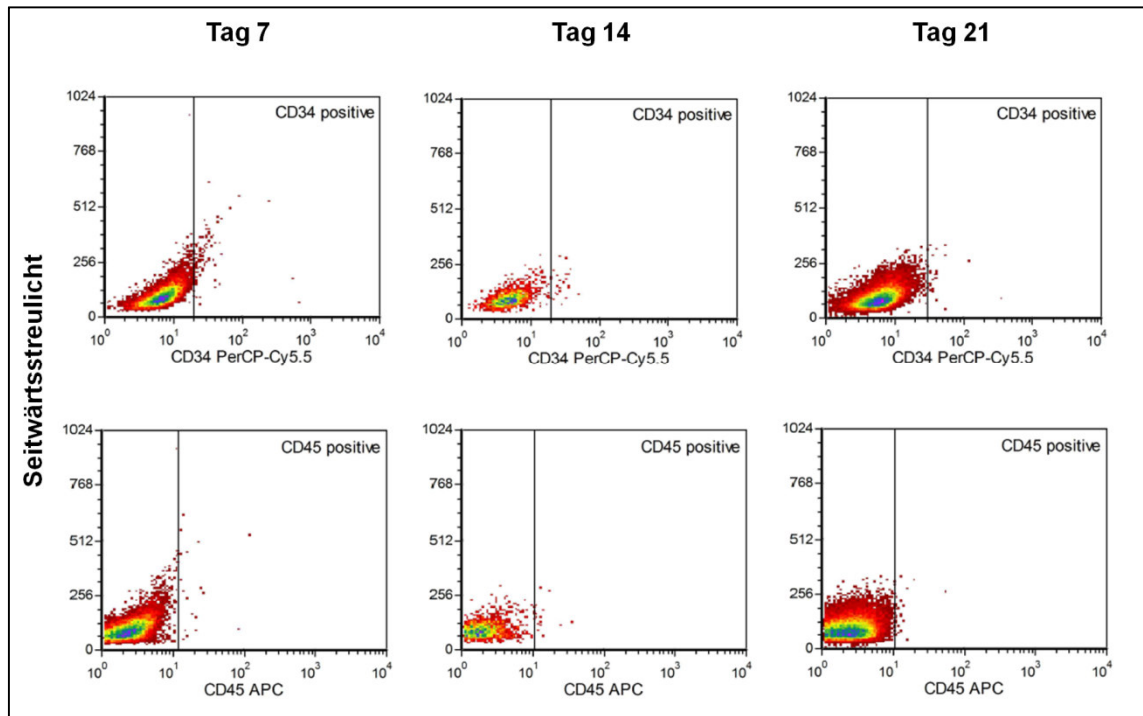


Abb. 16: Punktwolkendiagramme zur Expression der Oberflächenmoleküle CD34 und CD45.

Es sind beispielhaft Punktwolkendiagramme einer Probe ($n = 1$) zur Expression von CD34 und CD45 bei den Kontrollzellen ohne Medikamentenzusatz dargestellt. Beide hier abgebildeten Oberflächenmarker werden bei den osteogen differenzierten mesenchymalen Stromazellen nicht messbar exprimiert. Die senkrechte Trennlinie wurde durch die Isotypenkontrolle bestimmt und kennzeichnet so die Grenze zwischen negativer und positiver Expression.

CD = *cluster of differentiation*, APC = Allophycocyanin, PerCP-Cy5.5 = Peridinin Chlorophyll-Cyanin 5.5.

3. Ergebnisse

Außerdem wurde die Expression der drei Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 gemessen, die auf mesenchymalen Stromazellen besonders stark ausgeprägt ist¹⁴¹. Sie werden daher als Stammzellmarker verwendet. Unter osteogener Differenzierung geht die Expression dieser Marker zurück¹⁴⁸. Abb. 17 zeigt diesen Abfall des Medians der Fluoreszenzintensität für die beiden Kontrollen KE (ohne Zusätze zum Zellkulturmedium) und KR (DMSO-Kontrolle). An Tag 0, bei den undifferenzierten MSCs, betrug der Mittelwert des Medians der Fluoreszenzintensität für CD73 105,42, für CD90 173,31 und für CD105 57,06. Während die Expression von CD73 und CD90 von Tag 0 bis zu Tag 21 kontinuierlich abnahm (CD73: KE Tag 7: 69,81, Tag 14: 56,69, Tag 21: 30,85; KR Tag 7: 64,13, Tag 14: 46,18, Tag 21: 27,74 und CD90: KE Tag 7: 116,50, Tag 14: 68,16, Tag 21: 35,33; KR Tag 7: 97,93, Tag 14: 66,50, Tag 21: 33,69), stieg die Expression von CD105 von Tag 0 zu Tag 7 etwas an (von 57,06 an Tag 0 auf 58,27 bzw. 64,64 bei KE bzw. KR an Tag 7), bevor der Abfall folgte (KE Tag 14: 33,25, Tag 21: 25,26 und KR Tag 14: 30,63, Tag 21: 25,04).

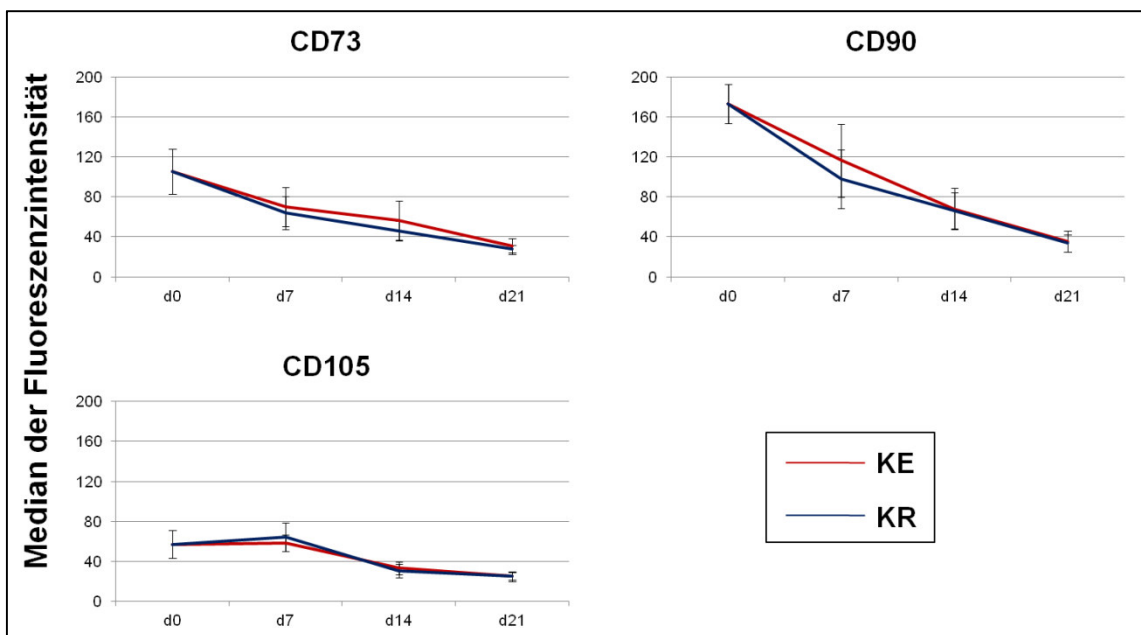


Abb. 17: Änderung der Expression der Oberflächenmoleküle CD73, CD90 und CD105 während 21 Tage osteogener Differenzierung.

Es kam insgesamt zu einer Abnahme der Expression aller drei Stammzellmarker CD73, CD90 und CD105 über 21 Tage osteogener Differenzierung in den Kontrollen, die anhand des Medians der Fluoreszenzintensität bestimmt wurde. Dabei stieg die CD105-Expression von Tag 0 auf Tag 7 noch dezent an, bevor die Abnahme folgte, während die CD73- und CD90-Expression kontinuierlich abfiel (n = 7 an Tag 7 und 14, n = 6 an Tag 21).

KE = Kontrolle Enoxaparin, KR = Kontrolle Rivaroxaban, CD = *cluster of differentiation*.

3.3.2. Änderung in der Expression von Oberflächenmolekülen

Neben den oben genannten Oberflächenmarkern wurde die Expression von CD10, CD49e und CD92 bestimmt. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass diese Marker während osteogener Differenzierung stark reguliert werden ¹⁴⁹. In der vorliegenden Arbeit konnte über die Zeit während der osteogenen Differenzierung bei den Kontrollen ohne Zusätze (KE) bzw. mit DMSO (KR) für CD92 ein Anstieg des Medians der Fluoreszenzintensität gezeigt werden (CD92: Tag 0: 11,39, KE Tag 7: 11,79, Tag 14: 19,83, Tag 21: 31,70; KR Tag 7: 14,13, Tag 14: 21,37, Tag 21: 29,87). Bei den Messungen für CD10 kam es in der DMSO-Kontrolle ebenfalls zu einem schrittweisen Anstieg der Expression über die Zeit. Die Werte stiegen von Tag 0 mit 6,86 auf 9,41 an Tag 7, 13,33 an Tag 14 und 14,64 an Tag 21. Die Kontrolle ohne Zusätze (KE) stieg ebenfalls bis Tag 14 an (Tag 7: 10,16, Tag 14: 14,96). Von Tag 14 auf Tag 21 folgte ein leichter Abfall (13,01). Währenddessen stieg der Median der Fluoreszenzintensität bei CD49e nur von Tag 0 zu Tag 7 an. Danach folgte ein Abfall. Jedoch waren die Werte insgesamt sehr hoch (CD49e: Tag 0: 190,41; KE Tag 7: 224,31, Tag 14: 151,24, Tag 21: 102,70; KR Tag 7: 223,42, Tag 14: 138,97, Tag 21: 89,13). In Abb. 18 sind die genannten Werte graphisch dargestellt.

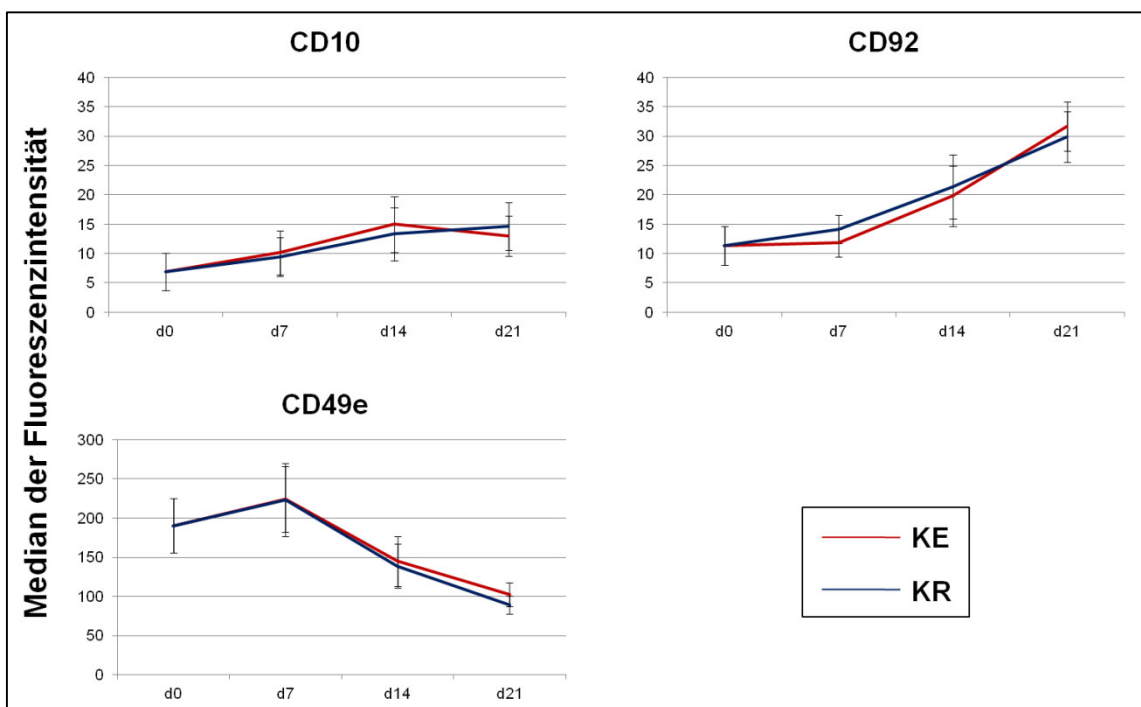


Abb. 18: Änderung der Expression der Oberflächenmoleküle CD10, CD92 und CD49e während 21 Tage osteogener Differenzierung.

Die Expression der Oberflächenmarker CD10 und CD92 stieg insgesamt von Tag 0 zu Tag 21 unter osteogener Differenzierung in den Kontrollen an. Dargestellt ist dies anhand der Bestimmung des Medians der Fluoreszenzintensität. Die Expression von CD49e stieg ebenfalls von Tag 0 zu Tag 7 an, bevor dann ein kontinuierlicher Abfall folgte. Hierbei war die Expression an Tag 21 weiterhin hoch (n = 7 an Tag 7 und 14, n = 6 an Tag 21).

KE = Kontrolle Enoxaparin, KR = Kontrolle Rivaroxaban, CD = *cluster of differentiation*.

3. Ergebnisse

Unter Einfluss von Enoxaparin waren CD10 und CD92 an Tag 7 und 14 nach Beginn der osteogenen Differenzierung im Bezug auf die Kontrolle dosisabhängig signifikant herunterreguliert. An Tag 7 sank die Expression für CD10 auf 89 % (2 µg/ml Enoxaparin), 89 % (10 µg/ml Enoxaparin) und 85 % (50 µg/ml Enoxaparin; p 0,041, 0,003, 0,001) und an Tag 14 auf 75 %, 74 % bzw. 63 % (p 0,066, 0,025, 0,009). Für CD92 lag der Median der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle an Tag 7 für E1 bei 89 %, für E2 bei 84 % und für E3 bei 82 % (p 0,074, 0,027, 0,038) und an Tag 14 bei 82 %, 76 % und 68 % (p 0,053, 0,034, 0,037). An Tag 21 waren die Werte für den Median der Fluoreszenzintensität unter Enoxaparin-Einfluss auch kleiner als der Wert der Kontrolle, allerdings nicht mehr signifikant.

Währenddessen zeigte Rivaroxaban in allen Konzentrationen weniger Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker CD10 und CD92. Doch auch hier wurde ein Abfall der Expression, verglichen mit den Kontrollzellen, sichtbar. Ein signifikanter Abfall ergab sich allerdings nur an Tag 21 unter der mittleren Konzentration Rivaroxaban (100 ng/ml) für CD92. Die CD92-Expression sank an Tag 21 mit zunehmender Rivaroxaban-Konzentration auf 78 %, 74 % und 82 % (p 0,060, 0,034 und 0,079). CD10 war unter Rivaroxaban-Einfluss an Tag 21 ebenfalls verringert (82 %, 85 % und 88 %), allerdings nicht signifikant (p 0,060, 0,096, 0,160). Abb. 19 zeigt die Expression von CD10 und CD92 gemessen am Median der Fluoreszenzintensität an den Tagen 7, 14 und 21 nach Beginn der osteogenen Differenzierung unter Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban in Bezug auf die jeweilige Kontrolle.

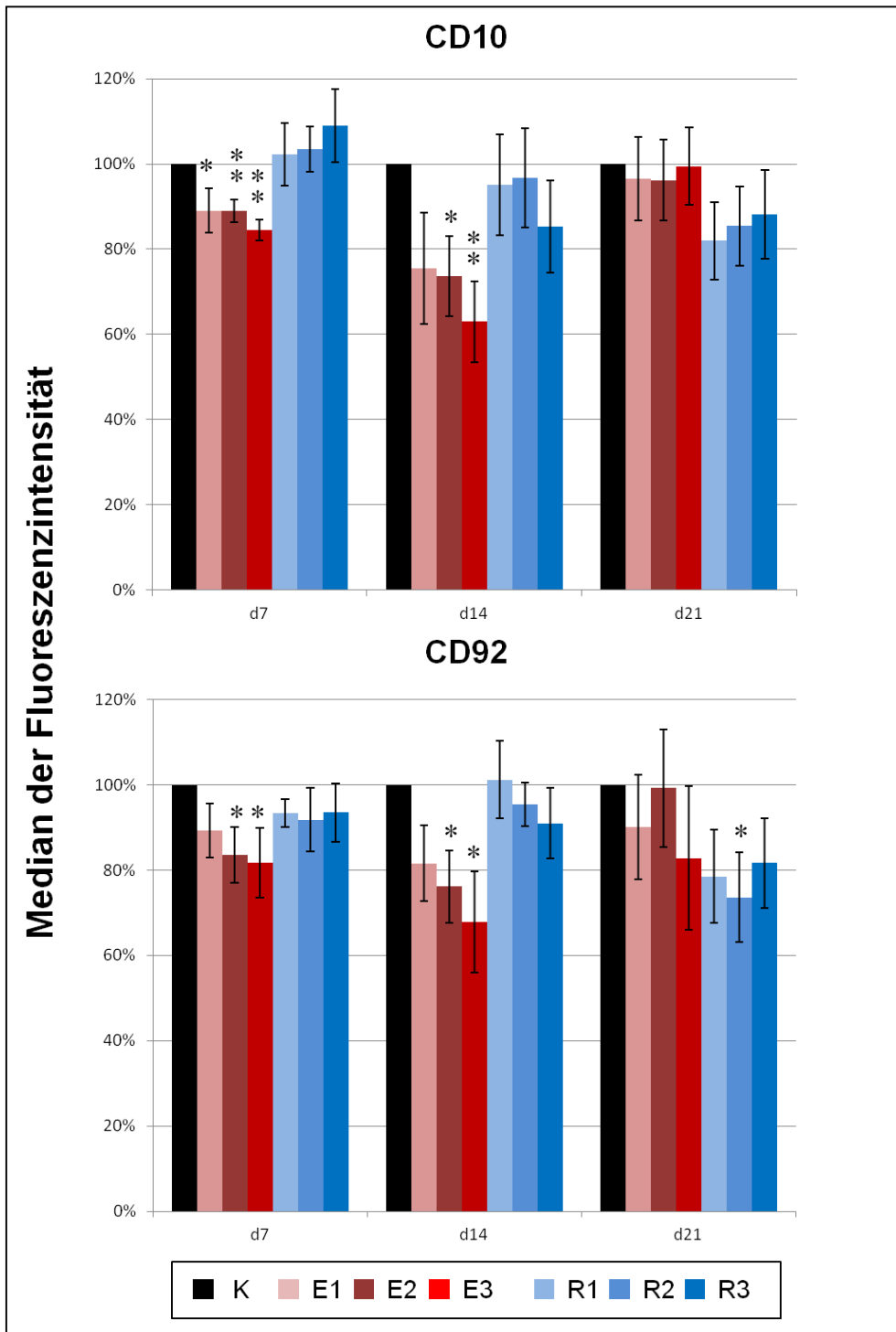


Abb. 19: Expression von CD10 und CD92.

Unter Einfluss von Enoxaparin kommt es an Tag 7 (d7) und Tag 14 (d14) zu einer signifikanten (* $p < 0,05$) bis hoch signifikanten Abnahme (** $p < 0,01$) der Expression von CD10 und CD92. An Tag 21 (d21) ist keine signifikante Änderung messbar. Rivaroxaban hat im Vergleich dazu weniger Einfluss und führt lediglich an Tag 21 beim Zusatz von 100 ng/ml Rivaroxaban zu einer signifikanten Abnahme des Medians der Fluoreszenzintensität im Bezug auf die DMSO-Kontrolle (n = 7 an Tag 7 und 14, n = 6 an Tag 21).

K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 µg/ml, E2 = 10 µg/ml, E3 = 50 µg/ml Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban; CD = cluster of differentiation.

3. Ergebnisse

Auch die Expression von CD49e wurde unter Enoxaparin-Zusatz gehemmt. Hierbei zeigte sich an Tag 7 noch kein Abfall, dafür wurde dieser an Tag 14 und 21 deutlich. Der Wert für den Median der Fluoreszenzintensität war dabei an Tag 14 verringert auf 80 %, 78 % und 74 % der Kontrolle für 2 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml Enoxaparin (p 0,059, 0,028, 0,018). An Tag 21 war er, jedoch nicht signifikant, verringert auf 83 %, 84 %, 81 %. Unter Einfluss von Rivaroxaban war die CD49e-Expression über die Zeit im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ebenfalls vermindert. An Tag 7 war die Expression unverändert, an Tag 14 zeigte sich ein dosisabhängiger, jedoch nicht signifikanter Abfall (93 %, 90 % und 89 %). Der Median der Fluoreszenzintensität war bei CD49e an Tag 21 unter 20 ng/ml Rivaroxaban auf 85 %, unter 100 ng/ml Rivaroxaban auf 83 % und unter 500 ng/ml Rivaroxaban auf 84 % (p 0,008, 0,015, 0,041) der Kontrolle signifikant gesunken. Die Probenanzahl lag an Tag 7 und 14 bei $n = 7$ und an Tag 21 bei $n = 6$. Die Ergebnisse des Einflusses der Medikamente auf die CD49e-Expression sind in Abb. 20 dargestellt.

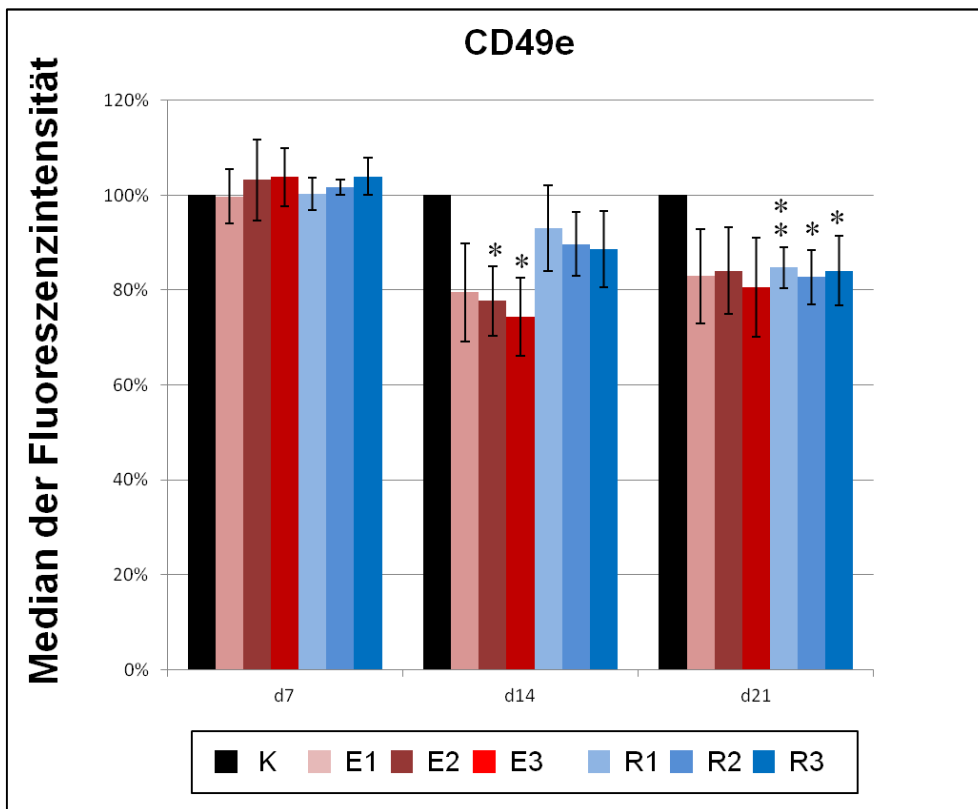


Abb. 20: Expression CD49e.

Bei der Expression von CD49e, gemessen am Median der Fluoreszenzintensität, zeigt sich an Tag 7 (d7) keine Änderung unter Einfluss von Enoxaparin oder Rivaroxaban. An Tag 14 (d14) kommt es zu einem Abfall der CD49e-Expression, welcher unter Einfluss der beiden höheren Konzentrationen Enoxaparin signifikant ($p^* < 0,05$) ist. An Tag 21 konnte eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant bis hoch signifikant ($p^{**} < 0,01$) geringere CD49e-Expression unter Einfluss von Rivaroxaban in allen Konzentrationen gezeigt werden ($n = 7$ an Tag 7 und 14, $n = 6$ an Tag 21). K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 µg/ml, E2 = 10 µg/ml, E3 = 50 µg/ml Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban; CD = cluster of differentiation.

3.4. Effekte auf die osteogene Differenzierung/Färbungen

3.4.1. Alkalische Phosphatase

Als ein Indikator für die Osteoblasten-Aktivität wurde die Alkalische Phosphatase (ALP) angefärbt¹⁵⁰. Dabei zeigten sich bei keiner der Enoxaparin- oder Rivaroxaban-behandelten Zellen makro- oder mikroskopisch erkennbare Unterschiede der Färbeintensität. Die quantitative Auswertung der Bilder zeigte allerdings einige wenige signifikante Unterschiede. Nach 7 Tagen osteogener Differenzierung wurde ein signifikanter Abfall der ALP-Färbeintensität für die höchsten Enoxaparin- und Rivaroxaban-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt (50 µg/ml Enoxaparin: 96 %, p 0.037; 500 ng/ml Rivaroxaban: 98 %, p 0.032). An Tag 14 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, während an Tag 21 wieder die höchste Enoxaparin-Konzentration einen signifikanten Abfall der ALP-Färbeintensität bewirkte (50 µg/ml Enoxaparin: 97 %; p 0.044). Rivaroxaban hatte nach 21 Tagen osteogener Differenzierung wiederum keinen signifikanten Einfluss auf die ALP-Färbung. Abb. 21 zeigt Beispiele von Bildern der gefärbte *wells* einer Zelllinie unter aufsteigender Enoxaparin- und Rivaroxaban-Konzentration an Tag 21 und die Auswertung des Mittelwerts der Färbeintensität bezogen auf die jeweilige Kontrolle an den drei Messpunkten (Tag 7, 14, 21).

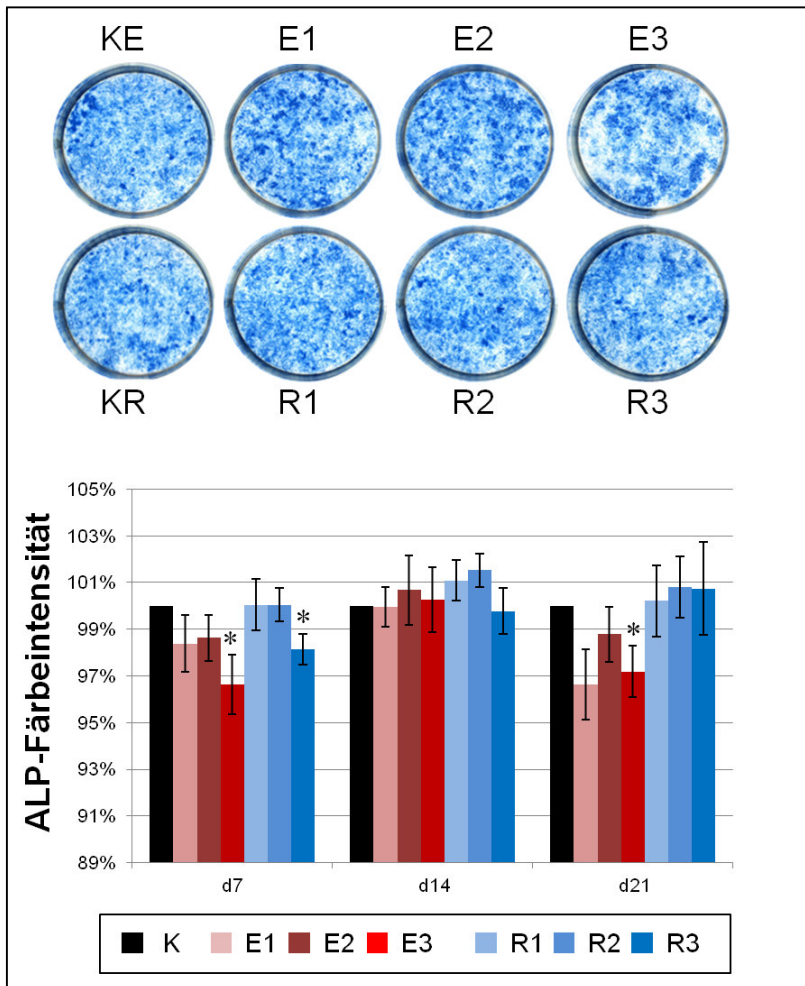


Abb. 21: Beispiel-wells der Färbung der Alkalischen Phosphatase an Tag 21 und statistische Auswertung.

Bei der Färbung der Alkalischen Phosphatase (ALP) zeigte sich unter Einfluss von der höchsten Konzentration Enoxaparin eine signifikante ($p^* < 0,05$) Abnahme der Färbeintensität an Tag 7 und 21 (d7 und d21). An Tag 14 (d14) war keine signifikante Änderung messbar. Rivaroxaban-Zugabe zur Zellkultur führte während der osteogenen Differenzierung der Zellen lediglich an Tag 7 bei 500 ng/ml Rivaroxaban zu einer signifikanten Abnahme der ALP-Färbeintensität. In der oberen Bildhälfte sind beispielhaft die wells einer Zelllinie dargestellt, wobei mikroskopisch keine eindeutigen Veränderungen sichtbar waren ($n = 7$).

K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 $\mu\text{g/ml}$, E2 = 10 $\mu\text{g/ml}$, E3 = 50 $\mu\text{g/ml}$ Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

3.4.2. Alizarin-Rot

Mit der Alizarin-Rot-Färbung werden Kalzifizierungen angefärbt ¹⁴⁵. Da an Tag 7 noch keine Kalzifizierungen vorlagen, war hier keine Alizarin-Rot-Färbung sichtbar. An Tag 14 und 21 war die Färbeintensität deutlich größer und eine quantitative Auswertung war möglich. An Tag 14 nach Beginn der osteogenen Differenzierung waren weder unter Einfluss von Enoxaparin noch unter Rivaroxaban signifikante Unterschiede in der Menge an Kalzifizierung im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar. Die Färbeintensität, die mit Hilfe von *Image J* und Berechnung des Mittelwerts bestimmt wurde, betrug für die drei Enoxaparin-behandelten Proben 100,45 %, 102,52 % und 102,46 % der Kontrolle (2 µg/ml, 10 µg/ml und 50 µg/ml Enoxaparin). Für Rivaroxaban betrug die Färbeintensität 98,89 %, 99,62 % und 102,01 % (20 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml Rivaroxaban) der Kontrolle.

Nach 21 Tagen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Färbeintensität von Alizarin-Rot unter Enoxaparin. Diese Reduktion war mikroskopisch sichtbar und auch in der quantitativen Berechnung signifikant. Die Kalzifizierung nahm für 2 µg/ml Enoxaparin auf 67 %, für 10 µg/ml Enoxaparin ebenfalls auf 67 % und für 50 µg/ml Enoxaparin auf 65 % der Kontrolle ab (p 0,031, 0,035, 0,049). Währenddessen hatte Rivaroxaban keinen signifikanten Einfluss auf die Färbeintensität von Alizarin-Rot im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO (20 ng/ml Rivaroxaban: 101,83 %, 100 ng/ml Rivaroxaban: 99,94 % und 500 ng/ml Rivaroxaban: 100,88 %). Abb. 20 zeigt beispielhaft einige gefärbte *wells* an Tag 21 der osteogenen Differenzierung und die Auswertung des Mittelwerts der Färbeintensität aller Messungen in Bezug auf die jeweilige Kontrolle.

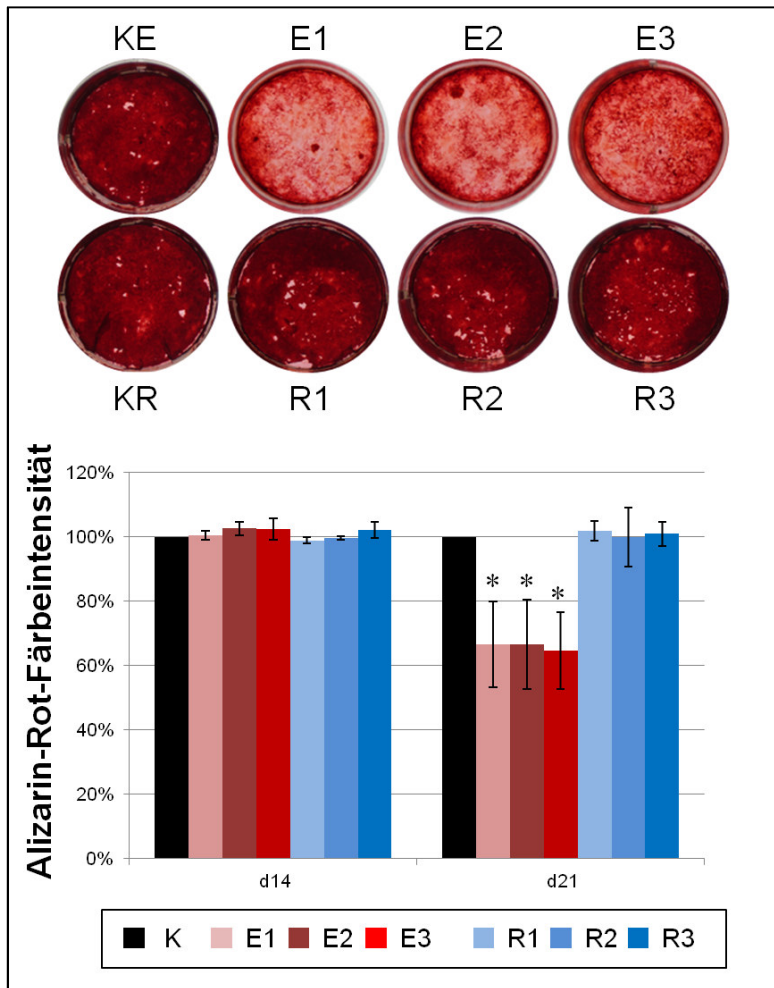


Abb. 22: Beispiel-wells der Färbung mit Alizarin-Rot an Tag 21 und statistische Auswertung.

Bei der Färbung mit Alizarin-Rot zeigte sich an Tag 14 (d14) weder unter Zusatz von Enoxaparin noch unter Zugabe von Rivaroxaban eine Änderung der Färbeintensität. Währenddessen war an Tag 21 (d21) der osteogenen Differenzierung unter allen Enoxaparin-Konzentrationen eine signifikante ($p^* < 0,05$) Abnahme der Färbeintensität messbar. Diese war auch mikroskopisch deutlich sichtbar, wie die oben dargestellten wells zeigen. Rivaroxaban führte auch an Tag 21 zu keinen signifikanten Veränderungen der Alizarin-Rot-Färbeintensität ($n = 7$).

K = Kontrolle (KE = ohne Zusätze bzw. KR = DMSO - Kontrolle); E1 = 2 µg/ml, E2 = 10 µg/ml, E3 = 50 µg/ml Enoxaparin; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

4. Diskussion

4.1. Zusammenhang von Knochenheilung und VTE-Prophylaxe

Die Knochenheilung ist ein sehr komplexer Vorgang, der mehrere Phasen von Entzündung über Wiederherstellung und Umbau des Knochens umfasst. Die Rekrutierung von MSCs, ihre Wanderung zum Ort des Knochendefekts, ihre Proliferation und schließlich ihre osteogene Differenzierung sind entscheidende Bestandteile der frühen Phase der Knochenheilung. Die sich aus den MSCs entwickelnden Osteoblasten sind für den Aufbau der Knochensubstanz zuständig. Zu ihren Aufgaben gehören die Bildung, Reifung und Mineralisierung der Knochenmatrix¹⁴⁷. Damit nach Frakturen oder Operationen am Knochen (beispielsweise Knie- oder Hüftgelenkersatz) die Heilung komplikationslos ablaufen kann, spielen verschiedene Signalmoleküle und das Zusammenspiel der zellulären Elemente eine wesentliche Rolle. Dadurch gibt es auch viele Angriffstellen, an denen Medikamente diese Vorgänge beeinflussen und somit die Knochenheilung positiv oder negativ modulieren können.

Es wird von einigen Medikamenten vermutet, dass diese die Knochenheilung negativ beeinflussen. Dazu gehören beispielsweise nichtsteroidale Antiphlogistika, besonders Indometacin^{151,152}, und Glukokortikoide¹⁵³. Als Ursache für eine verzögerte Frakturheilung wird hierbei die Hemmung der Entzündungsreaktion vermutet, die in der ersten Phase der Frakturheilung unter anderem zur Rekrutierung der MSCs wichtig ist¹⁵⁴. Auch für Heparin gibt es Publikationen, die einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel beschreiben. Dabei besteht noch kein komplettes Verständnis, welche genauen Mechanismen durch Heparin gestört werden und somit zu einer negativen Beeinflussung des Knochenstoffwechsels führen. Eine Hypothese ist, dass die Expression von Zytokinen, die bei der Osteogenese eine Rolle spielen, wie Interleukin 1- β , Tumornekrosefaktor- α oder BMPs¹⁵⁵, durch Heparin verändert wird¹⁵⁶. Kanzaki *et al.* zeigten, dass Heparin durch Bindung an BMP2 und den BMP-Rezeptor zu einer Hemmung der osteogenen Differenzierung führt¹²⁴. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Heparin an Wachstumsfaktoren, wie den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 bindet und so sowohl die Aktivität, als auch die Differenzierung von Osteoblasten reguliert. Dafür spricht, dass Heparin die Halbwertszeit von Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 verlängert und so indirekt zu einer verminderten Kollagensynthese führt¹²³. Eine dritte Vermutung ist, dass Heparin die Differenzierung von MSCs direkt beeinflusst¹⁵⁶. Heparin soll mit den Zellen der Osteoblasten-Zelllinie interagieren und

so die MSC-Differenzierung verändern, die Anzahl an reifen Osteoblasten verkleinern und die Synthese der Knochenmatrix durch die Osteoblasten verringern⁷⁸. Zudem wurde gezeigt, dass Heparin Kalziumionen bindet und so den Kalziumspiegel im Blutplasma verringert, was zu einer vermehrten Produktion des Parathormons führt. Dieses steigert wiederum die Aktivität von Osteoklasten und führt zu vermehrter Knochenresorption⁸¹.

Bisherige Studien zeigen unter Heparin eine Reduktion der Knochendichte^{121,122}, einen Verlust von Knochensubstanz⁸⁰ und eine Hemmung der Aktivität von Osteoblasten^{131,157}. Das Risiko für die Entwicklung von Osteoporose und für eine schlechtere Frakturheilung ist daher unter Heparin, insbesondere bei Langzeitanwendung, erhöht^{158,159}.

Aufgrund von Nebeneffekten und Nachteilen in der Pharmakokinetik wurden neben UFH die NMH entwickelt. Bei ihrem Einsatz wird die negative Wirkung auf den Knochenstoffwechsel insgesamt als geringer beschrieben¹⁶⁰. Auch wenn sowohl UFH als auch NMH die Osteoblasten- und Osteoid-Oberfläche verringerten, führten NMH zu weniger Osteopenie (Minderung der Knochendichte), wie Muir *et al.* zeigten. Dabei wird vermutet, dass UFH gleichzeitig die Knochenbildung verringert und die Knochenresorption steigert, während NMH lediglich negativen Einfluss auf die Knochenbildung hat¹⁶⁰. Kock *et al.* beschrieben 2002 eine Verzögerung der Defektheilung im Tierversuch am Kaninchenmodell nach Entfernung eines Knochenblöckchens nach 6 Wochen Applikation von UFH. Im Vergleich dazu hatte eine Applikation von NMH in Bezug auf die Kontrollgruppe keine Hemmung der Knochendefektheilung zur Folge¹⁶¹.

VTE-Prophylaxe ist bei Immobilisation entscheidend, um eine Thrombose und nachfolgende Komplikationen zu vermeiden. Nach orthopädischen/unfallchirurgischen Operationen werden daher standardmäßig Antikoagulantien angewendet. Es wird an der Weiterentwicklung neuer Antikoagulantien gearbeitet, um Nebenwirkungen zu reduzieren und die Anwendung für den Patienten einfacher zu gestalten. Aktuell sind NMH, wie Enoxaparin, nach orthopädischen Eingriffen Mittel der ersten Wahl^{8,32}. Für einige Indikationen ist seit 2008 auch Rivaroxaban als neues orales Antikoagulanz zugelassen. Da sich das Indikationsspektrum von Rivaroxaban und Enoxaparin zum großen Teil deckt, wie beispielsweise zur Thromboseprophylaxe nach Hüft- oder Kniegelenkersatz, ist es besonders interessant, diese beiden Medikamente in ihrem Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wurde speziell der Einfluss von Rivaroxaban und Enoxaparin auf die Entwicklung und

Differenzierung von MSCs während ihrer osteogenen Differenzierung untersucht. Damit sollten die Auswirkungen auf die frühe Knochenheilung untersucht werden, da in bisherigen *in vitro*-Studien in erster Linie bereits differenzierte Osteoblasten eingesetzt wurden^{133,135}. Marsell *et al.* haben beschrieben, dass die Untersuchung reifer Osteoblasten nur die Effekte auf spätere Stadien der Knochenheilung, die 3 - 4 Wochen nach einer Operation/Knochenläsion eintreten, zeigt¹¹². In dieser Arbeit wurde im Gegensatz dazu mit der osteogenen Differenzierung der MSCs die frühe Phase der Knochenheilung, das heißt die ersten Wochen nach Trauma/Operation, untersucht, da die postoperative Thromboseprophylaxe besonders in den ersten Wochen nach der Operation, vor vollständiger Mobilisierung des Patienten, durchgeführt wird.

Die osteogene Entwicklung der MSCs lässt sich dabei in drei Phasen unterteilen. Zunächst steht von Tag 1 - 4 die Zellproliferation im Vordergrund. Dann folgt die Matrixbildung (frühe Zelldifferenzierung) von Tag 5 - 14 und die Mineralisierung (terminale Zelldifferenzierung) von Tag 15 - 28^{147,162}. Um diese Phasen abzubilden, wurden MSCs in der vorliegenden Arbeit über 21 Tage kultiviert und osteogen differenziert. Enoxaparin und Rivaroxaban wurden in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen zum Zellkulturmedium hinzugefügt. Die Auswahl der eingesetzten Konzentrationen der beiden Medikamente orientiert sich dabei am therapeutischen Bereich für ihren Einsatz in der Orthopädie/Unfallchirurgie. Für Enoxaparin liegt dieser zwischen 8 und 12 µg/ml^{43,142}, daher wurden 2, 10 und 50 µg/ml Enoxaparin eingesetzt. Für Rivaroxaban wurde nach Einnahme von 10 mg Rivaroxaban am Tag eine Plasmakonzentration zwischen 9 und 125 ng/ml gemessen^{60,66}. Daher wurde hier der Einfluss von 20, 100 und 500 ng/ml Rivaroxaban getestet.

Bisher gibt es nur wenige Studien, welche die Auswirkungen von Rivaroxaban auf die Knochenheilung untersucht haben. Bei der Literaturrecherche in PubMed erscheinen bei Eingabe der Suchbegriffe „Rivaroxaban“ und „bone healing“ („Knochenheilung“) oder „Rivaroxaban“ und „Osteoblast“ jeweils lediglich acht, beziehungsweise sieben Studien^{118,127,133-135,163-166} (Recherche am 16.11.2016). Für die Proliferation und Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Antikoagulantien gab es, vor Veröffentlichung der beiden Studien durch unsere Arbeitsgruppe, keine Studien - weder für Rivaroxaban noch für Enoxaparin. Insgesamt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Rivaroxaban signifikant weniger Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Zellen bei den von uns untersuchten osteogenen Markern aufweist. Enoxaparin hat einen negativen Einfluss auf die Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten. Die Diskussion der konkreten Ergebnisse folgt in den nächsten Unterkapiteln.

4.2. Beeinflussung der Proliferation

Ein Teil der Arbeit bestand daraus, über Zellzählung und Berechnung der Generationszahl die Proliferationsrate der MSCs während osteogener Differenzierung zu bestimmen. Die Zellproliferation findet besonders von Tag 1 bis 4 statt¹⁴⁷. Dabei wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Enoxaparin die Proliferation der MSCs während der ersten Woche der osteogenen Differenzierung dosisabhängig und signifikant steigert. Nach der zweiten und dritten Woche osteogener Differenzierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen den mit Enoxaparin-behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle. Das könnte daran liegen, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt Osteoblasten ähnlicher geworden sind. Solayar *et al.* haben gezeigt, dass Enoxaparin keinen Einfluss auf die Proliferation humaner Osteoblasten hat¹³⁵. Zusätzlich war die Proliferation der MSCs unter Enoxaparin in der ersten Woche stark erhöht, so dass in der zweiten Woche keine Proliferation mehr auftrat, da das Potential der Zellen aufgebraucht war und die Gewebekulturflaschen voll waren. Im Gegensatz dazu hatten Kock *et al.* gezeigt, dass NMH das Wachstum von Osteoblasten nach 48 und 96 Stunden Kultivierung hemmen. Enoxaparin hatte dabei jedoch von den vier eingesetzten NMH (Enoxaparin, Nadroparin, Dalteparin, Certoparin) den geringsten Einfluss¹³². In diesen beiden genannten Studien^{132,135} wurden die Zellen im Vergleich zu den Versuchen in der vorliegenden Arbeit keinem Differenzierungsdruck ausgesetzt, da bereits ausdifferenzierte Osteoblasten eingesetzt wurden. Winkler *et al.* zeigten eine signifikante Steigerung der Proliferation von Osteoblasten unter Einfluss mittlerer Konzentrationen UFH und dem NMH Dalteparin nach 15 Tagen Kultivierung. Lediglich beim Einsatz höherer Konzentrationen UFH und Dalteparin, weit über dem therapeutischen Bereich (bis 100-fach höher), zeigte sich ein Abfall der Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle¹³¹.

Unter Rivaroxaban-Zugabe wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Einfluss auf die Proliferation festgestellt. Die Bestimmung der Generationszahlen zeigte über 21 Tage osteogener Differenzierung im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen keine signifikanten Veränderungen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ausführungen von Solayar *et al.* überein, die keine negativen Effekte von Rivaroxaban auf die Zelllebensfähigkeit (*cell viability*), also die Anzahl lebendiger Zellen, die hier als Parameter der Proliferation gewählt wurde, beschrieben haben. Für niedrige Rivaroxaban-Konzentrationen zeigten Solayar *et al.* sogar eine signifikante Erhöhung der Zelllebensfähigkeit nach 72 Stunden Inkubation (bei 13 ng/ml Rivaroxaban um 15 %, bei 130 ng/ml Rivaroxaban um 10 %) ¹³⁵. Währenddessen haben Gigi *et al.* eine signifikante Hemmung des Wachstums der in der Zellkultur eingesetzten Osteoblasten

unter Einfluss von Rivaroxaban beschrieben. Zellen wurden dort 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Rivaroxaban kultiviert. Als Parameter für die Proliferation wurden die DNA-Synthese und die Creatinkinase-spezifische Aktivität der Osteoblasten bestimmt. Die DNA-Synthese und die Creatinkinase-spezifische Aktivität sanken dabei dosisabhängig. Es ist zu beachten, dass dabei Konzentrationen zwischen 0,01 µg/ml und 50 µg/ml Rivaroxaban (entsprechen 10 ng/ml bis 50000 ng/ml Rivaroxaban) eingesetzt wurden, wobei die höheren Konzentrationen weit über dem therapeutischen Bereich von Rivaroxaban liegen ¹³³.

Generell wird durch Erhöhung der Zellproliferation die Knochenheilung verbessert. Auf den ersten Blick scheinen die Ergebnisse dieser Arbeit, in der eine Erhöhung der Proliferation in der ersten Woche der osteogenen Differenzierung der MSCs unter Enoxaparin gezeigt wurde, bisherigen Erkenntnissen einer verzögerten Frakturheilung und eines erhöhten Osteoporose-Risikos unter Enoxaparin zu widersprechen. Geht man jedoch einen Schritt weiter im Ablauf der Knochenheilung, müssen sich die MSCs im Verlauf zu reifen Osteoblasten weiterentwickeln, um neuen Knochen bilden zu können. Hierbei verlieren die Zellen ihr Proliferationspotenzial, da Differenzierung und Proliferation nicht gleichzeitig auftreten ^{100,164}. Ein erhöhtes Proliferationspotenzial weist also auch darauf hin, dass das Differenzierungspotenzial der Zellen in dieser Zeit verringert ist ¹⁰³. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Versuche zur Untersuchung der Differenzierung der Zellen angeschlossen. Vermutet wurde eine Hemmung der Differenzierung durch Enoxaparin. Unter Einfluss des Faktor Xa-Inhibitors Rivaroxaban wurde in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation von MSCs unter osteogener Differenzierung gemessen.

4.3. Beeinflussung der Differenzierung

Zur Untersuchung des Einflusses von Rivaroxaban und Enoxaparin auf die Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen die qRT-PCR, um die Differenzierung auf der Ebene der Genexpression zu beurteilen, die durchflusszytometrische Analyse zur Beurteilung des Immunphänotyps und die Durchführung von Färbungen der ALP und von Kalzifizierungen mittels Alizarin-Rot zur Analyse auf histochemischer Ebene.

Im Rahmen der transkriptionellen Analyse wurden verschiedenen Primer verwendet. Durch Bindung der Primer und folgender qRT-PCR wurde gezeigt, ob und in welchem Maße das jeweilige Zielgen von den Zellen exprimiert wird. Da untersucht werden sollte, ob sich die MSCs unter Einfluss der beiden Antikoagulantien ebenso zu Osteoblasten entwickeln, wie in den Kontrollgruppen, wurden in erster Linie Zielgene gewählt, die bei Knochenzellen stärker exprimiert werden als bei MSCs. Um dies zu zeigen wurde zunächst die Expression der Zielgene an Tag 7 bzw. 14 mit der Expression der Zielgene an Tag 0 verglichen.

Einer der Marker war die Alkalische Phosphatase (Leber/Knochen/Niere-Typ; ALPL). ALPL ist das Gen, welches das Enzym ALP codiert. ALP steht in Verbindung mit der Osteoblasten-Membran und wird daher in vielen Studien als knochenspezifischer Marker verwendet¹⁶⁷. Es soll eine Rolle bei der Matrix-Mineralisierung spielen. Die ALP-Aktivität im Serum wird als Indikator für die Knochenbildung verwendet^{167,168}. In der vorliegenden Arbeit wurde ein deutlicher Anstieg der ALPL-Expression an Tag 7 gezeigt, dann folgte ein leichter Abfall. Dabei war aber die Expression an Tag 14 immer noch dreimal höher als bei den MSCs zu Beginn der Untersuchung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Werten von Kulterer *et al.* überein, die eine steigende Expression von ALPL ab Tag 4 der osteogenen Differenzierung beschreiben, die ab Tag 14 wieder zurückgeht¹⁴⁷. Bei Huang *et al.* wurde an Tag 7 der höchste Wert für die ALPL-Expression gemessen¹⁶².

Bone γ -carboxy-glutamic acid-containing protein (BGLAP), auch als Osteocalcin (OCN) bezeichnet, ist Teil der extrazellulären Knochenmatrix und ein später Marker der Osteogenese¹⁶⁹. Es wurde bei unseren Versuchen an Tag 7 und 14 im Vergleich zu den Ausgangszellen vermindert exprimiert. Aus bisherigen Studien ist zu vermuten, dass BGLAP erst an Tag 21 sein Maximum erreicht¹⁴⁷.

Währenddessen ist das *bone morphogenic protein 2* (BMP2) ein früher Marker der Knochendifferenzierung¹⁰³. BMP2 gehört zur *transforming growth factor-(TGF-) β* -

Superfamilie und aktiviert den Smad-Signalweg ¹⁷⁰, kann allerdings auch Smad-unabhängig wirken (Smad-Proteine = intrazelluläre Proteine, durch TGF- β aktiviert). Dadurch induziert es die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten (*pro-osteogenic growth factor*) über Stimulierung der Expression einer Vielzahl an Zielgenen ¹⁷¹. Neben BMP2 spielen auch BMP4, 6, 7 und 9 bei der osteogenen Differenzierung eine Rolle ¹⁷². An Tag 7 der osteogenen Differenzierung war die BMP2-Expression in den Versuchen der vorliegenden Arbeit auf mehr als das Vierfache angestiegen. Aufgrund des osteoinduktiven Potenzials wird BMP2 bei Osteoporose bzw. bei osteoporotischen Frakturen als therapeutische Option diskutiert ¹⁷³.

Währenddessen wird Kollagen I A1 (COL1A1) von Zellen in verschiedenen Geweben exprimiert - neben Knochen auch in der Haut, in Sehnen und im Auge. Die COL1A1-Expression hat sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit in der Kontrollgruppe nach 7 Tagen osteogener Differenzierung mehr als verdoppelt. Bei Wagner *et al.* wurde COL1A1 als später Marker der osteogenen Differenzierungskaskade definiert ¹⁰³.

Ein weiteres in der vorliegenden Arbeit untersuchtes Marker-Gen ist Cadherin 11 (CDH11). CDH11 reguliert Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhäsionen und ist für eine normale Differenzierung der Osteoblasten notwendig. Daher ist es während osteogener Differenzierung hochreguliert ^{174,175}. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte an Tag 7 sowie an Tag 14 eine Steigerung der Expression von CDH11 gemessen werden. Diese war allerdings nicht signifikant.

Als Inhibitor des Wnt-Signalwegs wurde die Expression des *dickkopf Wnt-signaling pathway inhibitor 1* (DKK1) bestimmt. Über den Wnt-Signalweg wird die Selbsterneuerung von Stamm- und Vorläuferzellen reguliert. In der Krebsforschung wurde eine Störung des Wnt-Signalwegs als möglicher Pathomechanismus identifiziert ¹⁷⁶. Studien zeigen außerdem, dass Wnt-Proteine das Wachstum von Stammzellen steigern, während die Differenzierung gehemmt wird ¹⁷⁷. Eine aktuelle Studie zeigte, dass DKK1 die BMP9-induzierte Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten über die Hemmung des Wnt-Signalwegs negativ beeinflusst ¹⁷⁸. Insgesamt ist die Rolle von DKK1 bei der Osteogenese noch nicht komplett verstanden. In der vorliegenden Arbeit war die DKK1-Expression in der Kontrollgruppe ohne Medikamentenzusätze an Tag 7 der Zellkultur signifikant, mehr als 5-fach, höher als bei den MSCs an Tag 0.

Der *insulin-like growth factor 2* (IGF2) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der das Wachstum von humanen Knochenzellen verstärkt. Jedoch ist die Wirkung von IGF2

auf Knochenzellen nicht nur auf Wachstumsreize beschränkt. IGF2 hat zusätzlich Einfluss auf die Zelldifferenzierung, wie die Kollagen-Produktion oder die Anlagerung der Knochenmatrix (*matrix apposition*)¹⁷⁹. Außerdem verhindert IGF2 die Apoptose humaner Osteoblasten (protektiver Effekt)¹⁸⁰. In der Kontrollgruppe zeigte die Expression von IGF2 bei den Zellen an Tag 7 nach Beginn der osteogenen Differenzierung verglichen zu den MSCs die größte Steigerung aller untersuchten Marker. Die IGF2-Expression war nach einer Woche Zellkultur 156-fach höher als an Tag 0. Einer der Bindungsfaktoren von IGF2 ist *das insulin-like growth factor binding protein 2* (IGFBP2). Im Komplex stimulieren die beiden Faktoren die Knochenbildung und verhindern den Verlust von Knochensubstanz/Knochendichte. Dies zeigte sich im *in vivo*-Versuch bei Ratten, in dem durch subkutane Gabe von IGF2/IGFBP2-Komplex Verlust von Knochendichte vorgebeugt und die Knochenbildung gesteigert werden konnte¹⁸¹. Eine aktuelle Studie zeigt, dass IGF2 in osteoporotischem Knochen im Vergleich zu gesundem Knochen herunterreguliert ist¹⁸². IGFBP2 stimuliert direkt die osteogene Differenzierung, wie Xi *et al.* an einem *Knock-out* Maus-Modell zeigten. Bei *Knock-out*-Mäusen war die osteogene Differenzierung vermindert, während eine Überexpression von IGFBP2 zu einer Steigerung führte¹⁸³. Die osteogen differenzierten Zellen exprimierten auch in der vorliegenden Arbeit an Tag 7 und 14 signifikant mehr IGFBP2 (Tag 7: 26-fach, Tag 14: 15-fach höhere Expression im Vergleich zu den Zellen an Tag 0).

Als Regulator der Aktivität von Osteoblasten, unter anderem wiederum über den Wnt-Signalweg, spielt auch die Proteinkinase C alpha (PRKCa) eine Rolle bei der osteogenen Differenzierung, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht komplett verstanden ist. Es gilt als möglicher Angriffspunkt für therapeutische Ansätze bei Knochenerkrankungen¹⁸⁴. Die PRKCa-Expression war an Tag 7 osteogener Differenzierung etwa verdoppelt (1,95).

Der *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) gehört zur Tumor-Nekrose-Faktor-Superfamilie. Er wird auf Osteoblasten exprimiert und bindet an den RANK-Rezeptor von Osteoklasten-Vorläuferzellen, wodurch diese aktiviert werden und ihre Differenzierung zu Osteoklasten gefördert wird. Es ist außerdem ein Ligand für Osteoprotegerin (OPG), welches ebenfalls von Osteoblasten exprimiert wird und RANKL antagonisiert. Es spielt daher eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau¹⁸⁵.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung von Osteoblasten wichtig ist, ist der *Runt-related transcription factor 2* (Runx2). Runx2 zählt dabei zu den

essentiellen Faktoren für die Entwicklung von MSCs zu Osteoblasten ¹⁰³. Runx2-negative Mäuse zeigen eine komplette Aufhebung der Knochenbildung. Weiterhin entwickeln sich MSCs unter Abwesenheit von Runx2 vermehrt zu Fett- und Knorpelzellen ¹⁸⁶. Es ist während des gesamten Zeitraumes der osteogenen Differenzierung hochreguliert. Runx2 fördert die Differenzierung zu Osteoblasten auf einer frühen Stufe (von MSCs zu Osteoblastenvorläuferzellen und frühen Osteoblasten) und hemmt sie auf einer späten Stufe ¹⁸⁷. Sowohl bei RANKL als auch bei Runx2 war die Expression über die Zeit von Tag 0 auf Tag 7 und auf Tag 14 ansteigend, jedoch nicht signifikant größer.

Als letzter Marker wurde die Expression des Knochen-spezifischen Transkriptionsfaktors SP7, auch Osterix genannt, bestimmt. SP7 ist ein früher Marker der Knochendifferenzierung. In Abwesenheit von SP7 differenzieren MSCs nicht zu Osteoblasten und lagern sich nicht in die Knochenmatrix ein ¹⁸⁸. Bei Mäusen, in denen die SP7-Expression ausgeschaltet wurde, differenzierten MSCs nicht mehr zu Osteoblasten, behielten aber ihre Fähigkeit zur Entwicklung zu Knorpelzellen. In Runx2-negativen Mäusen exprimieren MSCs kein SP7, während in SP7-negativen Mäusen weiterhin Runx2 exprimiert wird. SP7 ist also ein Runx2-nachgeschaltetes Gen ¹⁸⁶. SP7 war in der vorliegenden Arbeit an Tag 7 der osteogenen Differenzierung signifikant (4,76-fach) stärker exprimiert als bei den Ausgangszellen. Stein *et al.* zeigten, dass MSCs an ihrem siebten Tag der osteogenen Differenzierung, humanen Osteoblasten am ähnlichsten waren. Zu diesem Zeitpunkt waren nur 399 von 28606 untersuchten Genen unterschiedlich exprimiert (1,39 %) ^{147,189}.

Unter Einfluss des NMH Enoxaparin zeigte sich in den durchgeführten Versuchen der vorliegenden Arbeit insgesamt eine Reduktion der Genexpression der meisten osteogenen Marker. Bei 11 der 12 in der qRT-PCR untersuchten Gene konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression unter Einfluss von Enoxaparin nachgewiesen werden. Das bestätigt bisherige Studien, die einen negativen Einfluss von Heparin auf den Knochenstoffwechsel beschreiben. Währenddessen waren diese negativen Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel unter Einfluss von Rivaroxaban geringer ausgeprägt oder gar nicht vorhanden.

ALPL ist dabei in der Literatur ein häufig verwendeter Marker als Ausdruck für den Grad an osteogener Differenzierung. Handschin *et al.* zeigten 2005 eine Hemmung der ALPL-Expression in humanen Osteoblasten unter dem Einfluss des NMH Dalteparin nach 3 und 7 Tagen Zellkultur ¹²⁹. Ebenso beschrieben Winkler *et al.* einen Abfall der ALPL-Aktivität bei Zugabe von UFH, Dalteparin und Melagatran, wenn auch nur in den

am höchsten eingesetzten Konzentrationen. Der negative Einfluss von UFH war dabei signifikant am größten¹³¹. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit bestätigten sich diese Ergebnisse, in dem wir eine signifikante Reduktion der Genexpression von ALPL unter Einfluss von Enoxaparin in allen eingesetzten Konzentrationen nach 7 Tagen osteogener Differenzierung zeigten. Auch Solayar *et al.* haben einen Abfall der ALPL-Aktivität nach Zugabe von Enoxaparin bei der Kultivierung humaner Osteoblasten beschrieben. Ebenso wurde dort unter Zugabe von Rivaroxaban ein Abfall der ALPL-Aktivität gezeigt¹³⁵. Währenddessen wurde in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss von Rivaroxaban auf die Genexpression von ALPL nachgewiesen. Auch Gigi *et al.* haben einen negativen Einfluss von Rivaroxaban auf die ALPL-Aktivität humaner Osteoblasten postuliert¹³³. Im Gegensatz zu den Studien von Solayar und Gigi wurde in dieser Studie allerdings der Einfluss auf in der osteogenen Differenzierung befindliche MSCs und nicht auf bereits differenzierte Osteoblasten untersucht. Das könnte bedeuten, dass Rivaroxaban auf die frühen Entwicklungsstufen der Knochenzellen keinen negativen Einfluss hat, aber in späteren Stadien die Osteoblastenfunktion hemmt. Zusätzlich zur Bestimmung der Genexpression von ALPL wurde in dieser Arbeit eine Färbung der ALP durchgeführt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Färbeintensität, weder bei Zugabe von Enoxaparin, noch bei Zugabe von Rivaroxaban nach 7, 14 oder 21 Tagen osteogener Differenzierung. Auch Matziolis *et al.* zeigten 2003 unter Zugabe von Dalteparin, Enoxaparin, UFH und Fondaparinux eine weitgehend unveränderte ALP-Aktivität bei humanen Osteoblasten¹⁵⁷.

Ein weiterer Primer, der ebenfalls in vorangegangenen Studien in diesem Zusammenhang untersucht wurde, ist COL1A1. Matziolis *et al.* beschrieben einen Abfall der COL1A1-Expression unter Einfluss von Heparin (sowohl bei NMH (Enoxaparin und Dalteparin), als auch bei UFH)¹⁵⁷. Winkler *et al.* zeigten bei Zugabe von UFH in niedriger Dosierung eine leichte Steigerung der COL1A1-Expression. Bei Zugabe von UFH in höherer Konzentration wurde jedoch ein deutlicher Abfall der Expression von COL1A1 in humanen Osteoblasten (9 % der Kontrollgruppe) nachgewiesen. Auch Melagatran und Dalteparin hatten in höheren Konzentrationen einen hemmenden Einfluss auf die COL1A1-Expression (46 % bzw. 54 %), wobei die COL1A1-Expression jedoch höher war als unter UFH¹³¹. Auch Handschin *et al.* zeigten 2005 eine Hemmung der COL1A1-Expression durch Dalteparin, ebenso wie eine Hemmung der OCN (= BGLAP)-Expression¹²⁹. Eine andere Studie von Handschin *et al.* im Jahr 2006 mit Untersuchung der Entwicklung von humanen Osteoblasten unter Dalteparin-Einfluss zeigte weiterhin, dass BGLAP bei Zugabe einer Konzentration von

300 und 900 µg/ml Dalteparin zur Zellkultur vermindert exprimiert wird, jedoch nicht bei einer Konzentration von 30 µg/ml Dalteparin. Hier wurde außerdem die Runx2- Expression bestimmt, die ebenfalls für die beiden höheren Konzentrationen Dalteparin bei 7 Tagen Zellkultur vermindert war ¹³⁰. In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Unter Enoxaparin-Einfluss sank die Expression von BGLAP und Runx2 an Tag 7 der osteogenen Differenzierung für alle Konzentrationen Enoxaparin signifikant. An Tag 14 war der Einfluss weiterhin sichtbar, jedoch war nur noch für die höchste Konzentration Enoxaparin die Runx2-Expression signifikant erniedrigt. COL1A1 war im Gegensatz dazu besonders an Tag 14 signifikant, wiederum unabhängig von der eingesetzten Konzentration Enoxaparin, herunterreguliert. Währenddessen führte Rivaroxaban in keiner der verwendeten Konzentrationen zu signifikanten Änderungen der Expression von COL1A1, BGLAP oder Runx2. Solayar *et al.* hatten ebenfalls die mRNA-Expression von BGLAP und Runx2 in humanen Osteoblasten unter Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban nach Tag 1 und Tag 7 in der Zellkultur bestimmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde hier allerdings, besonders für die hohen Konzentrationen Rivaroxaban, eine Abnahme des Expressionslevels dieser beiden Marker beschrieben ¹³⁵. Außerdem wurde bei Solayar *et al.* die Expression von BMP2 untersucht. Alle Konzentrationen Enoxaparin ebenso wie Rivaroxaban führten in dieser Studie zu einer verminderten BMP2-Expression nach 1 Tag bzw. 7 Tagen Kultivierung humaner Osteoblasten ¹³⁵. Im Gegensatz dazu war die BMP2-Expression in den Versuchen der vorliegenden Arbeit lediglich an Tag 7 nach Beginn der osteogenen Differenzierung der MSCs unter Einfluss von Enoxaparin vermindert. Für Rivaroxaban konnte kein negativer Einfluss bestätigt werden.

Eine kanadische Studie, die 2004 veröffentlicht wurde, hat den Einfluss von UFH im Vergleich mit dem NMH Fragmin (Dalteparin) auf die Osteogenese und Adipogenese von MSCs *in vitro* untersucht. Insgesamt zeigte sich, dass NMH und UFH die Osteoblasten-Formation hemmen und die Adipozyten-Differenzierung steigern, wobei die Auswirkungen von NMH geringer waren als die von UFH ¹⁵⁶. Im Rahmen der RT-PCR wurde dort der Einfluss von UFH auf die Expression von Runx2 und SP7 untersucht. Dabei wurde eine dosisabhängige signifikante Verringerung der Runx2- und SP7-Expression unter Einfluss von 10 µg/ml und 25 µg/ml Heparin nach 12 Tagen Zellkultur gezeigt. Währenddessen war die Expression des Adipozyten-spezifische Markers PPAR-γ unter Heparin erhöht ¹⁵⁶. In der vorliegenden Arbeit konnten wir unter Enoxaparin-Zugabe zur Zellkultur den hemmenden Einfluss von Heparin auf die Runx2- und SP7-Expression bestätigen. An Tag 7 zeigten sich, ebenfalls

dosisabhängig, signifikant verringerte Expressionslevel von SP7 und Runx2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Runx2-Expression betrug dabei jeweils weniger als 70 % der Kontrolle und die SP7-Expression war sogar noch geringer, nämlich in ansteigender Enoxaparin-Konzentration dosisabhängig vermindert auf 56 %, 44 % und 39 % der Kontrolle. Rivaroxaban-Zugabe zur Zellkultur führte weder nach 7 noch nach 14 Tagen Zellkultur unter osteogenem Differenzierungsdruck zu einer signifikanten Änderung der Runx2- oder SP7-Konzentration.

Irie *et al.* beschrieben, dass die mRNA-Expression von RANKL, RANK und OPG in einer Ko-Kultur von Mäuse-MSCs und Osteoblasten durch Heparin nicht beeinflusst wird ¹⁸⁵. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Heparin direkt an OPG bindet und damit die OPG-gesteuerte Hemmung der Knochenresorption durch Osteoklasten vermindert. Dadurch steigert Heparin indirekt den Knochenabbau. Außerdem wird die OPG/RANKL-Interaktion durch Heparin gehemmt ¹⁸⁵. Währenddessen war in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von RANKL unter Einfluss von Enoxaparin im Vergleich mit der Kontrollgruppe vermindert. An Tag 7 wurde eine signifikante Verringerung der RANKL-Expression unter den beiden höheren Konzentrationen Enoxaparin gezeigt, die auch an Tag 14 der Zellkultur noch nachweisbar und für 50 µg/ml Enoxaparin signifikant war. Währenddessen hatte Rivaroxaban in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen Einfluss auf die RANKL-Expression. Eine Veränderung der RANKL-Expression stört das Gleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau von Knochen ¹⁰⁵. RANKL steigert dabei die Differenzierung von Osteoklasten ¹⁰⁴ und führt so zu vermehrten Knochenabbau. Eine Verminderung der RANKL-Aktivität würde dementsprechend zu einem verminderten Knochenabbau führen. Auf der anderen Seite wird RANKL in hohem Maße von Osteoblasten exprimiert. Eine verminderte Expression durch die Zellen in der vorliegenden Arbeit unter Einfluss von Enoxaparin könnte auch Indikator sein, dass die eingesetzten MSCs noch nicht bis zu Osteoblasten differenziert sind, sondern sich noch in den Vorstufen der Differenzierung befinden. Enoxaparin führt also zu einer verminderten Differenzierung der MSCs. Für Rivaroxaban besteht dieser Einfluss nicht. Die OPG-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen.

Auch die weiteren osteogenen Marker, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, bestätigen die Ergebnisse der bisher genannten Änderungen des mRNA-Expressionslevels unter Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban. Enoxaparin führte an Tag 7 zusätzlich zu einem signifikanten Abfall der Expression von CDH11, DKK1, IGF2, IGFBP2 und PRKCa. Rivaroxaban hatte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit wiederum wenig Einfluss auf das Expressionslevel dieser Marker

im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Lediglich die DKK1-Expression war an Tag 14 in der höchsten Dosis signifikant vermindert. Währenddessen war die IGF2-Expression (unter Einfluss von 20 ng/ml und 100 ng/ml Rivaroxaban) an Tag 14 und die PRKCa-Expression (unter Einfluss von 500 ng/ml Rivaroxaban) sogar signifikant hochreguliert. Diese Gene wurden in der bisher verfügbaren Literatur noch nicht im Zusammenhang mit Expressionsveränderung unter Einfluss von Antikoagulantien bei MSCs oder Osteoblasten untersucht. Somit stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in diesem Bereich ganz neue Erkenntnisse dar, welche im Kontext keine Vergleichsmöglichkeit besitzen. Grundsätzlich betrachtet bestätigen sie allerdings unsere Hypothese, dass Enoxaparin als NMH die Differenzierung von MSCs in Richtung Osteoblasten vermindert, da alle genannten Marker von Osteoblasten exprimiert werden. Rivaroxaban scheint diesen hemmenden Einfluss nicht zu haben.

Da Veränderungen in der Genexpression nicht unbedingt den aktuellen Phänotyp reflektieren, wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Hierzu wurden drei Marker, die in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Granéli *et al.* besonders als Indikatoren für die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten identifiziert wurden, eingesetzt. Dabei handelt es sich um CD10 (Neprilysin), CD49e (*Integrin alpha-5*) und CD92 (*choline transporter-like protein 1*). Beim Vergleich zwischen undifferenzierten MSCs und osteogen differenzierten MSCs steigerte sich die Expression dieser drei Oberflächenmarker deutlich. Die CD10-Expression stieg auf das 9,4-fache, die CD49e-Expression auf das 4,6-fache und die CD92-Expression sogar auf das 15,9-fache¹⁴⁹. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte über die Zeit ebenfalls ein Anstieg der Expression von CD10 und CD92 gemessen werden. Die CD49e-Expression stieg von Tag 0 auf Tag 7 ebenfalls an, fiel im Verlauf jedoch ab. Jedoch zeigte sich insgesamt eine hohe Expression von CD49e bei allen gemessenen Proben.

Das Oberflächenmolekül CD10 ist eine Zink-Metallopeptidase, die an der Regulation des Metabolismus von Osteoblasten und Osteoklasten beteiligt ist. Es wurde auf der Oberfläche verschiedener Zellen der Osteoblasten-Linie gefunden. Als Substrate wurden beispielsweise Osteostatin, *Osteogenic growth peptide* und das Hormon Calcitonin identifiziert. Des Weiteren wurde im Mausmodell in Knochen von Neugeborenen ein höherer Gehalt an CD10 festgestellt als in Knochen erwachsener Mäuse, was einen Zusammenhang mit Knochenwachstum vermuten lässt¹⁹⁰. Eine Erhöhung von osteogenen Peptiden während osteogener Differenzierung könnte zu einer Erhöhung von CD10 und seiner enzymatischen Aktivität führen¹⁴⁹. Neben CD10 wurde die Expression des Oberflächenmoleküls CD49e, auch bekannt als Integrin

alpha 5, bestimmt. Die Familie der Integrine beeinflusst grundsätzlich die Adhäsion von Zellen an andere Zellen oder an extrazelluläre Proteine. Es ist an der Adhäsion und am Überleben von Osteoblasten beteiligt und soll so auch eine Rolle bei der osteogenen Differenzierung und bei der Knochenheilung spielen^{191–193}. Während der osteogenen Differenzierung humaner MSCs ist Integrin alpha 5 hochreguliert. Bei Abschalten der Integrin alpha 5-Expression kommt es zu einem Abfall osteogener Marker, was an einem erniedrigten Runx2-, ALP-, und COL1A1-mRNA-Level gezeigt werden konnte¹⁹³. Zusätzlich beeinflusst CD49e die Expression von IGF2 und IGFBP2. Das Zusammenspiel zwischen CD49e und der IGF2/IGFBP2-Signalgebung ist ein wichtiger Mechanismus, der die osteogene Differenzierung humaner MSCs verstärkt (siehe oben)¹⁹⁴. Währenddessen ist CD92, das *choline transporter-like protein 1*, für die Cholin-Aufnahme der Zellen verantwortlich, welches in Phosphatidylcholin eingebaut werden kann. Phosphatidylcholin ist Bestandteil des Lipid-Anteils der Kalzifizierungsfront während intramembranösem und enchondralem Knochenaufbau. Außerdem steigert die Zugabe von Phosphatidylcholin die Osteoinduktivität und die Aktivität von ALP im umliegenden Gewebe^{149,195}.

Bisher gibt es keine Studien, welche die Wirkung von Enoxaparin oder Rivaroxaban auf diese Oberflächenmoleküle untersucht haben. In der vorliegenden Arbeit wurde insgesamt nach 7 und 14 Tagen osteogener Differenzierung zum ersten Mal ein hemmender Einfluss von Enoxaparin auf die Expression von CD10, CD49e und CD92 gezeigt. Signifikant war dabei der Abfall der CD10-Expression an Tag 7 bei allen drei eingesetzten Konzentrationen Enoxaparin und an Tag 14 für die beiden höheren Konzentrationen Enoxaparin. Die CD49e-Expression war an Tag 14 unter Einfluss von 10 und 50 µg/ml Enoxaparin signifikant erniedrigt. Bei der CD92-Expression wurden jeweils bei 10 µg/ml und 50 µg/ml Enoxaparin an Tag 7 und 14 niedrigere Werte als bei der Kontrolle gemessen. Währenddessen war an Tag 21 unter Einfluss von Enoxaparin kein signifikanter Einfluss messbar. Rivaroxaban führte an Tag 21 der osteogenen Differenzierung allerdings zu einer signifikanten Abnahme der Expression von CD49e unter Einfluss aller eingesetzten Konzentrationen Rivaroxaban. Auch die CD92-Expression war an Tag 21 nach Zugabe von Rivaroxaban (100 ng/ml) zur Zellkultur im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vermindert. Im Gegensatz dazu führte Rivaroxaban an Tag 7 und 14 zu keinen signifikanten Veränderungen der CD10-, CD49e- oder CD92-Expression. Die Ergebnisse der immunphänotypischen Untersuchung bestätigen damit die Resultate der qRT-PCR und die bisherige Studienlage für den Einfluss von Enoxaparin. Es führt zu einer Hemmung der osteogenen Differenzierung der MSCs. Rivaroxaban führt in den ersten 2 Wochen der Zellkultur zu keinen wesentlichen

Veränderungen bei der Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten. Interessanterweise scheint Rivaroxaban aber nach der dritten Woche der Zellkultur eine Hemmung der Expression von Oberflächenmarkern, welche für die osteogene Differenzierung eine Rolle spielen, zu bewirken. Dies könnte bedeuten, dass Rivaroxaban erst auf spätere Phasen der osteogenen Differenzierung negativ wirkt. In den Versuchen von Solayar *et al.*, in denen bereits differenzierte Osteoblasten eingesetzt wurden, hatte die Behandlung der Zellen mit Rivaroxaban einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel im Sinne einer Hemmung der Osteoblasten-Funktion¹³⁵.

Als dritte Methode der Messung der Differenzierung der eingesetzten MSCs wurden histochemische Veränderungen beobachtet. Bei den Färbungen der Kalzifizierungen mit Alizarin-Rot gab es große Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellreihen. Durch den Bezug auf die jeweilige Kontrolle konnte dieser Fehler relativiert werden. Dadurch ist die vorliegende Arbeit anderen Studien überlegen, in denen nur eine Zelllinie untersucht wurde^{133,135}. In der vorliegenden Arbeit wurden an Tag 7, 14 und 21 Färbungen von 12-*well*-Platten mit Alizarin-Rot durchgeführt. Dabei waren an Tag 7 noch keine Kalzifizierungen sicht- oder messbar. An Tag 14 waren erste Kalzifizierungen sichtbar, die angefärbt wurden. Jedoch gab es zwischen den Proben keine signifikanten Unterschiede - weder bei Zugabe von Enoxaparin noch bei Zugabe von Rivaroxaban. Deutliche Alizarin-Rot-positive Kalzifizierungen konnten dann an Tag 21 gesehen werden. Bereits makroskopisch war hierbei eine deutliche Abnahme der Färbeintensität unter Enoxaparin-Einfluss sichtbar. Nach Auswertung mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Image J* ergaben sich Werte unter 70 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Zugabe von Rivaroxaban zum osteogenen Differenzierungsmedium hatte wiederum keine signifikanten Auswirkungen auf die Färbeintensität mit Alizarin-Rot und damit auf die Kalzifizierung. Hierbei stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Publikation von Matziolis *et al.* überein, die 2003 eine Abnahme der Kalzium-Konzentration unter Enoxaparin, aber auch Dalteparin und UFH, zeigten¹⁵⁷. Außerdem untersuchten Gigi *et al.* die Färbeintensität von Alizarin-Rot nach Behandlung der Osteoblasten mit Rivaroxaban und zeigten keine Veränderungen nach 21 Tagen Inkubation¹³³, vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

4.4. Einordnung der Ergebnisse in den Kontext

Im Vergleich zu allen bisherigen Studien zum Einfluss verschiedener Antikoagulantien auf die Knochenheilung, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss auf die frühe Phase der Knochenheilung betrachtet. Dafür wurden MSCs kultiviert, osteogen differenziert und währenddessen über 21 Tage dem Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban ausgesetzt. Die Knochenheilung beginnt jedoch zunächst mit der Rekrutierung der MSCs und der Zellmigration zum Ort des Traumas, da die Zellen zum Ort der Frakturheilung gelangen müssen. Darauf folgt die Proliferation und osteogene Differenzierung der MSCs. Zuletzt unterstützen die Osteoblasten die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix. Daher hat unsere Arbeitsgruppe im Anschluss an die hier dargestellten Versuche, die MSC-Migration und -Proliferation unter Einfluss von Rivaroxaban und Enoxaparin gemessen ¹¹⁸. Damit wurde die sehr frühe Phase der Knochenheilung, bevor die MSCs osteogen differenzieren, abgebildet. Zusätzlich wurde die relative Genexpression von Markern für beide Prozesse bestimmt. Im Unterschied zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen wurden die Zellen nicht induziert osteogen zu differenzieren. Bezüglich der Proliferation bestätigten sich die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse. Enoxaparin führte zu einer Steigerung der Proliferation, wobei diese hier an allen drei Messpunkten signifikant war. Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit der MSCs wurden diese nach 7 Tagen Kultivierung mit den beiden Medikamenten in einen Zellkultur-Einsatz mit einer Porengröße von 8 µm (Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gesetzt. Dieser Einsatz wurde dann in 12-*well*-Platten platziert, welche mit Kulturmedium gefüllt waren, das 50 ng/ml *stromal cell-derived factor 1 alpha* (PeproTech, Rocky Hill, USA) als *Chemoattractant* enthielt. Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde gezählt, wie viele Zellen in die äußere Kammer gewandert waren. Hierbei zeigte sich, dass nach Behandlung mit Enoxaparin signifikant und dosisabhängig mehr Zellen in die äußere Kammer migrierten als bei den Kontrollzellen. Währenddessen zeigten sich nach Zugabe von Rivaroxaban zum Kulturmedium nach einer Woche Kultivierung keine Unterschiede im Migrationsverhalten der MSCs im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle. DMSO alleine hatte einen positiven Effekt auf die Migrationsfähigkeit der MSCs, jedoch hatte die Zugabe von Rivaroxaban keinen zusätzlichen Effekt (siehe Abb. 23).

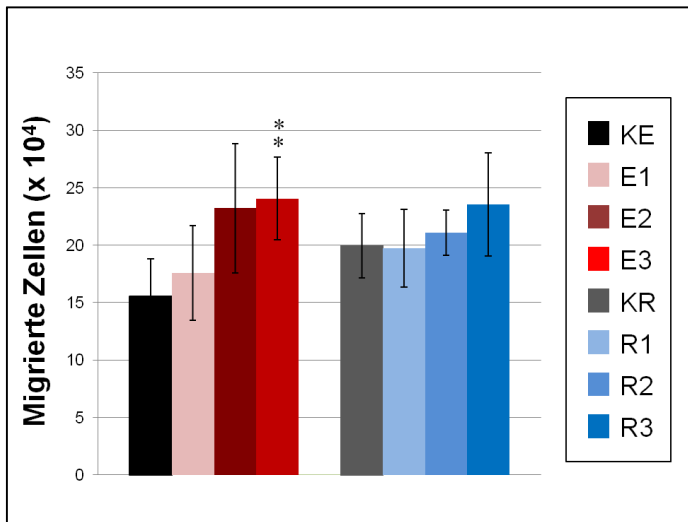


Abb. 23: Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban auf die Migrationsfähigkeit der mesenchymalen Stromazellen.

Es zeigt sich unter Zugabe von Enoxaparin eine vermehrte Zellmigration der MSCs ($n = 8$) durch die Membran bei Anlockung durch den *stromal cell-derived factor 1 alpha*. Dabei ist bei Zugabe der höchsten Konzentration Enoxaparin (50 µg/ml Enoxaparin) der Anstieg im Vergleich mit der Kontrolle ohne Medikamentenzusätze hoch signifikant (** $p < 0,01$). Rivaroxaban hatte währenddessen keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der MSCs im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle.

KE = ohne Zusätze; E1 = 2 µg/ml, E2 = 10 µg/ml, E3 = 50 µg/ml Enoxaparin;

KR = DMSO - Kontrolle; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

Anhand der qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass Enoxaparin die Expression von *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4) und *tumor necrosis factor alpha* (Tumornekrosefaktor α , TNF α) nach 7 Tagen Kultivierung der MSCs signifikant hoch regulierte. An Tag 14 und 21 zeigte sich kein weiterer Anstieg der Genexpression dieser beiden Marker unter Einfluss von Enoxaparin. Währenddessen zeigten sich unter Einfluss von Rivaroxaban nur minimale Veränderungen der CXCR4- und TNF α -Expression an allen drei Messpunkten. Die *alpha-B-crystallin* (CryaB)- Expression war unter Zugabe von Enoxaparin sowohl dosis- als auch zeitabhängig über die gesamte Messperiode erhöht. Rivaroxaban führte im Gegensatz dazu zu einer dosisabhängigen Abnahme der Expression von CryaB nach zwei und drei Wochen Kultivierung. Zusätzlich wurden auch osteogene Marker bestimmt, ohne dass die Zellen induziert wurden, osteogen zu differenzieren. Nichtsdestotrotz bestätigten sich die Ergebnisse, welche auch unter osteogener Differenzierung in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden. Enoxaparin führte zu einer Abnahme der Expression der osteogenen Marker. Dabei war IGF1, ein sehr früher Marker der osteogenen Differenzierung, nach 7, 14 und auch nach 21 Tagen Kultivierung signifikant herunterreguliert. IGF2 war an den beiden ersten Messpunkten unter Enoxaparin-Einfluss herunterreguliert und BMP2 nach einer und drei Wochen. Rivaroxaban zeigte erneut keine signifikanten Veränderungen¹¹⁸. Die graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR zeigt Abb. 24.

4. Diskussion

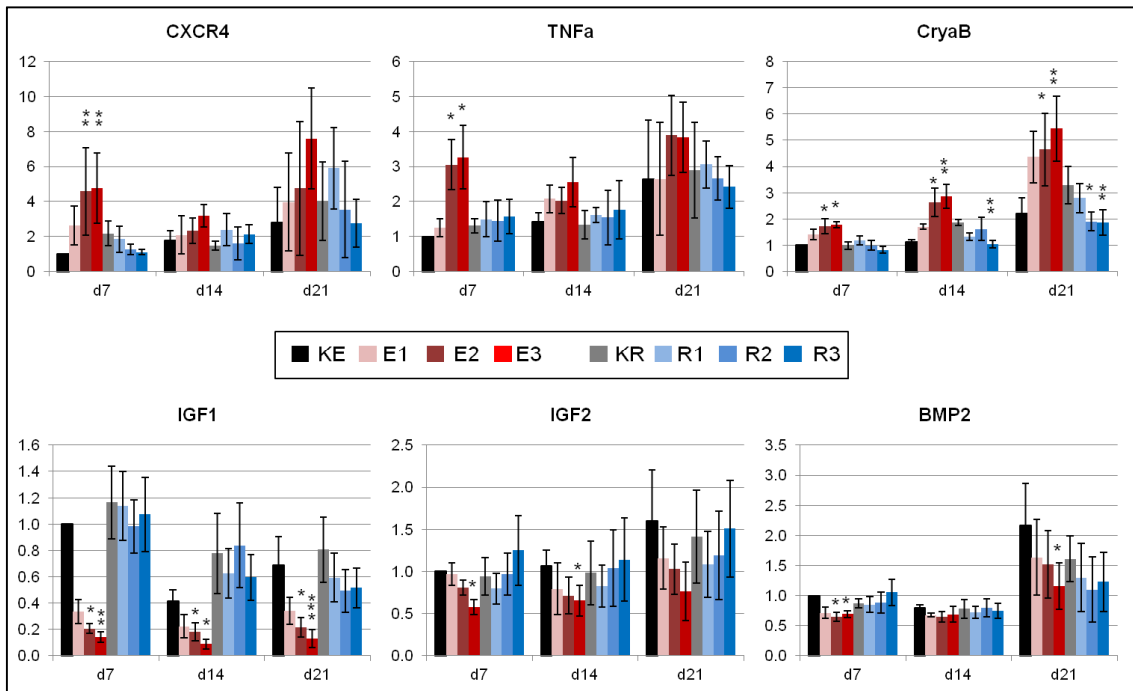


Abb. 24: Genexpression von CXCR4, TNF α , CryaB, IGF1, IGF2 und BMP2.

Die Behandlung der mesenchymalen Stromazellen (MSCs) mit Enoxaparin führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression von CXCR4, TNF α und CryaB. Währenddessen wurden Marker für die frühe Phase der Knochenheilung (IGF1, IGF2 und BMP2) herunterreguliert. Rivaroxaban führte an Tag (d) 14 und 21 zu einer signifikanten Abnahme der CryaB-Expression, hatte jedoch auf die anderen Marker keinen Einfluss¹¹⁸ (*p < 0,05, **p < 0,01, n = 8).

KE = ohne Zusätze; E1 = 2 μ g/ml, E2 = 10 μ g/ml, E3 = 50 μ g/ml Enoxaparin;

KR = DMSO - Kontrolle; R1 = 20 ng/ml, R2 = 100 ng/ml, R3 = 500 ng/ml Rivaroxaban.

C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4), tumor necrosis factor alpha (Tumornekrosefaktor α , TNF α), alpha-B-crystallin (CryaB), insulin-like growth factor 1/2 (IGF1/2), bone morphogenic protein 2 (BMP2).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Enoxaparin zunächst einen positiven Effekt auf das Migrations- und Proliferationspotenzial der MSCs hat. Das scheint bisherigen Studien zu widersprechen, die einen negativen Effekt von Enoxaparin auf Knochenheilung beschreiben, da grundsätzlich bessere Knochenheilung durch Steigerung von Migrations- und Proliferationsfähigkeit der Zellen zu erwarten ist. Im nächsten Schritt müssen die Zellen jedoch zu Osteoblasten differenzieren um Knochen bilden zu können. Hierbei wurde gezeigt, dass Proteine, die für die frühe Knochenheilung essentiell sind, unter Einfluss von Enoxaparin herunterreguliert sind. Das zeigten die Herunterregulierung der mRNA von IGF1, IGF2 und BMP2. Dadurch wird Knochenheilung verhindert. Rivaroxaban hatte im Vergleich dazu insgesamt weniger Auswirkungen auf MSC-Migration, -Proliferation und Expression von osteogenen Markern, wodurch eine geringere Beeinflussung auf den Zellmetabolismus durch Rivaroxaban im Vergleich zu Enoxaparin vermutet werden kann¹¹⁸. Dies bestätigt die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit. Es zeigt, dass auch die sehr frühe Phase der

Knochenheilung durch Enoxaparin, nicht aber durch Rivaroxaban negativ beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit sowie in den beschriebenen im Anschluss durchgeführten Versuchen wurde der Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban auf die Knochenheilung *in vitro* untersucht. Hierbei wurde die zelluläre Ebene untersucht, da MSCs und ihre Proliferation und Differenzierung zu Osteoblasten ein wesentlicher Bestandteil der Knochenheilung sind. Die Osteoblasten sind für den Neuaufbau der Knochenmatrix verantwortlich und in der Endstufe selbst Bestandteil der Knochensubstanz. In wie weit diese Ergebnisse aus der Zellkultur auf den komplexen Ablauf im menschlichen Körper übertragbar sind, ist bisher noch unklar. Es gibt jedoch einige *in vivo*-Untersuchungen bei denen im Tiermodell diese Fragestellung untersucht wurde. Zusammenfassend wurde auch in verschiedenen Tiermodellen gezeigt, dass Enoxaparin die Frakturheilung negativ beeinflusst. Street *et al.* untersuchten hierbei die Heilung einer geschlossenen Rippenfraktur bei Hasen. Dabei wurden an Tag 3, 7 und 14 histologische und immunhistochemische Methoden angewandt und an Tag 21 wurde der Knochen biomechanisch mit einer Torsionsbelastung getestet. Dabei war die Knochenheilung nach Behandlung der Tiere mit Enoxaparin an allen Zeitpunkten verlangsamt ¹²⁶. Folwarczna *et al.* bestätigten diese Ergebnisse. Bei Gabe von Enoxaparin subkutan für 28 Tage bei Ratten zeigten sich signifikante Unterschiede bei der histomorphologischen Untersuchung der Knochensubstanz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Applikation von Enoxaparin führte hierbei zur Entwicklung von Osteopenie (Knochenarmut), in dem Knochenbildung vermindert (Minderungen der Breite von periostalem und endostalem Osteoid und im periostalem und endostalem Breitenwachstum) und Knochenabbau gesteigert (Zunahmen im Bereich des Querschnitts der Markhöhle und des Verhältnisses der Fläche des Querschnitts der Markhöhle zu dem Bereich des Querschnitts der tibialen Diaphyse) war ¹⁹⁶. Neben den histomorphologischen Untersuchungen haben Folwarczna *et al.* 2004 auch die mechanischen Eigenschaften der Knochen von Ratten nach Applikation von Enoxaparin im Vergleich mit UFH, einem weiteren NMH (Nadroparin) und einer Kontrollgruppe getestet. Hierbei wurden nach 28 Tagen die Eigenschaften des Oberschenkelknochens untersucht. UFH führte hierbei zu einer Schwächung des Oberschenkelhalses, der in hohem Maße aus spongiösem Knochen besteht und damit aufgrund der größeren Umbaurate besonders anfällig gegenüber schädigenden Substanzen ist. Es war signifikant weniger Kräfteinwirkung nötig bis der Knochen frakturierte. Währenddessen änderte sich nach Applikation von Enoxaparin die Knochenstruktur bei Betrachtung des gesamten Oberschenkelknochens, wobei

Belastung auf den Knochenschaft ausgeübt wurde, der besonders aus kortikalem Knochen besteht. Nadroparin hatte die geringsten Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften der Rattenknochen, was bedeuten könnte, dass die verschiedenen NMH unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Knochenstruktur haben. Zusammenfassend deuten auch diese Ergebnisse darauf hin, dass das Risiko einer Fraktur unter Heparin erhöht ist ¹⁹⁷. Dies bestätigt die *in vitro*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Im Vergleich mit dem NMH Enoxaparin wurde gezeigt, dass Rivaroxaban weniger negative Effekte auf die osteogene Differenzierung von MSCs hat. Verglichen mit den in dieser Arbeit dargestellten *in vitro*-Untersuchungen gibt es für die *in vivo*-Auswirkungen von Rivaroxaban einige aktuelle Studien. Klüter *et al.* untersuchten die Frakturheilung nach Bruch des Oberschenkelknochens und operativer Stabilisierung mit einem intramedullären Nagel bei Ratten. Die Gabe von Rivaroxaban über 28 oder 49 Tage hatte dabei keine signifikanten Effekte auf die Knochenheilung ¹²⁷. Ähnliche Ergebnisse wurden von Prodingler *et al.* publiziert. Hier wurde die Knochenheilung bei einer Femurfraktur bei Ratten unter Einfluss von Rivaroxaban und Enoxaparin untersucht. Es zeigten sich einigen morphologische Unterschiede, während die biomechanischen Eigenschaften des Knochens von keinem der beiden Antikoagulationen signifikant beeinflusst wurden ¹⁶³. Die Arbeitsgruppe von Xia *et al.* untersuchte ebenfalls die Wirkungen von Rivaroxaban auf Knochenstruktur und -metabolismus von Ratten. Dies wurde mit Heparin und einer Kontrollgruppe verglichen. Rivaroxaban führte in den Versuchen insgesamt zu weniger negativen Effekten als Heparin ¹²⁸.

Verglichen mit den *in vivo*-Studien, die bisher zur Verfügung stehen, scheinen die *in vitro*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konkordant zu sein, da sich die Ergebnisse auf zellulärer Ebene auch im Tiermodell bestätigen. Jedoch hatte die Durchführung der Zellkultur auch einige Schwachstellen. Aufgrund der zunehmenden Kalzifizierung in den Gewebekulturflaschen, sowie zunehmender Aggregation der Zellen, wurde es wöchentlich schwerer eine ausreichende Zellzahl für transkriptionelle und durchflusszytometrische Analyse zu erreichen. Außerdem war der RNA-Gehalt nach RNA-Isolierung mit Hilfe des *RNeasy Mini-Kit* nach zwei oder drei Wochen osteogener Differenzierung geringer. Das könnte an einem Problem mit der *QIAshredder*-Säule gelegen haben. Aufgrund dieser Probleme sank die n-Zahl von zunächst 7 (an Tag 7) auf 5 an Tag 14. An Tag 21 konnte keine qRT-PCR durchgeführt werden. Zusätzlich kann hinterfragt werden, ob zur Unterstreichung der Ergebnisse alternativ andere Marker in der qRT-PCR zur Beantwortung der Frage nach den Auswirkungen auf die

4. Diskussion

Knochenheilung hätten bestimmt werden können. Andere mögliche Marker wäre beispielsweise die osteogenen Wachstumsfaktoren M-CSF, VEGF und TGF- β 1¹⁹⁸.

4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der beiden Antikoagulantien Rivaroxaban und Enoxaparin auf die Proliferation und die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen verschiedener Patienten auf verschiedenen Ebenen untersucht. Insgesamt zeigte sich beim Einsatz von Enoxaparin ein negativer Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Dieser war auch in einigen vorangegangenen Studien in ähnlicher Weise beschrieben worden, wobei erstmals die Phase der Entwicklung der MSCs zu Osteoblasten untersucht wurde. Enoxaparin steigerte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die Proliferation der MSCs, während es sowohl die Expression osteogener Marker auf Gen- und Proteinebene als auch die Kalzifizierung hemmte. Dabei konnte zum ersten Mal eine Enoxaparin-bedingte Herunterregulation der Oberflächenmarker CD10, CD49e und CD92, die bei der Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten hochreguliert werden, gezeigt werden. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von Rivaroxaban zu den Zellen weniger oder gar keine Auswirkungen auf die Proliferation und osteogene Differenzierung der MSCs sowie die Kalzifizierung. Dies spricht für einen weniger stark beeinträchtigten Knochenheilungsprozess unter Rivaroxaban im Vergleich zu Enoxaparin in den frühen Stadien der Knochenheilung.

Aufgrund dieser Ergebnisse könnte Rivaroxaban Enoxaparin in Bezug auf die frühe Knochenheilung überlegen sein. Um die Auswirkungen von VTE-Prophylaxe auf die Knochenheilung genauer verstehen zu können, werden weitere Studien auf verschiedenen Stufen der Knochenheilung benötigt. Außerdem sollten weitere *in vivo*-Studien und klinisch-randomisierte Studien zur Untersuchung der Knochenheilung bei Patienten postoperativ durchgeführt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Cervantes J, Rojas G. Virchow's Legacy: deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *World journal of surgery* 2005;29 Suppl 1:S30-4. eng.
2. Diehm C, Stammler F, Amendt K. Die tiefe Venenthrombose, Diagnostik und Therapie. *Dt Ärztebl* 1997;(94):A-301–311.
3. Pratt GH. Classification and treatment of the varicose, post-thrombotic, and arterial venous problems. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 1950;26:306–28. eng.
4. Hull RD. Pulmonary Angiography, Ventilation Lung Scanning, and Venography for Clinically Suspected Pulmonary Embolism with Abnormal Perfusion Lung Scan. *Ann Intern Med* 1983;98:891.
5. Stallworth JM, Najib A, Kletke RR, Ramirez A. Phlegmasia cerulea dolens: an experimental study. *Annals of surgery* 1967;165:860-8 passim. eng.
6. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, et al. Venous thromboembolism in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007.
7. Tagalakis V, Patenaude V, Kahn SR, Suissa S. Incidence of and mortality from venous thromboembolism in a real-world population: the Q-VTE Study Cohort. *The American journal of medicine* 2013;126:832.e13-21. (Accessed July 5, 2015, at 23830539). eng.
8. Haas S, Siebenlist S, Waydhas C, Krauspe R, Stockle U. Thromboembolism prophylaxis in trauma surgery: S3 guidelines and significance of the amendment for trauma surgeons [Thromboembolieprophylaxe in der Unfallchirurgie: S3-Leitlinie und Bedeutung des Amendments für den Unfallchirurgen]. *Der Unfallchirurg* 2010;113:893–900. ger.
9. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S3-Leitlinie: Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE)., 2. komplett überarbeitete Auflage, Stand: 15.10.2015; zitiert am 03.04.2016; URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/003-001I_S3_VTE-Prophylaxe_2015-12.pdf.
10. Geerts WH, Heit JA, Clagett GP, et al. Prevention of venous thromboembolism. *Chest* 2001;119:132S-175S. eng.
11. Turpie AG, Levine MN, Hirsh J, et al. A randomized controlled trial of a low-molecular-weight heparin (enoxaparin) to prevent deep-vein thrombosis in patients undergoing elective hip surgery. *The New England journal of medicine* 1986;315:925–9. eng.

12. Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty, RECORD1. *The New England journal of medicine* 2008;358:2765–75. eng.
13. Leclerc JR, Gent M, Hirsh J, Geerts WH, Ginsberg JS. The incidence of symptomatic venous thromboembolism during and after prophylaxis with enoxaparin: a multi-institutional cohort study of patients who underwent hip or knee arthroplasty. Canadian Collaborative Group. *Arch Intern Med* 1998;158:873–8. eng.
14. Bergqvist D, Benoni G, Bjorgell O, et al. Low-molecular-weight heparin (enoxaparin) as prophylaxis against venous thromboembolism after total hip replacement. *The New England journal of medicine* 1996;335:696–700. eng.
15. Planes A, Vochelle N, Darmon JY, Fagola M, Bellaud M, Huet Y. Risk of deep-venous thrombosis after hospital discharge in patients having undergone total hip replacement: double-blind randomised comparison of enoxaparin versus placebo. *Lancet (London, England)* 1996;348:224–8. eng.
16. Kakkar AK, Brenner B, Dahl OE, et al. Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet* 2008;372:31–9.
17. Camm AJ, Kirchhof P, Lip, Gregory Y H, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2010;31:2369–429. eng.
18. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *European heart journal* 2014;35:3033-69, 3069a-3069k. eng.
19. Tendera M, Aboyans V, Bartelink M-L, et al. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 2011;32:2851–906. eng.
20. Chen Y, Corey SJ, Kim OV, Alber MS. Systems biology of platelet-vessel wall interactions. *Advances in experimental medicine and biology* 2014;844:85–98. eng.
21. Rodgers GM, Shuman MA. Prothrombin is activated on vascular endothelial cells by factor Xa and calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983;80:7001–5. eng.

22. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* (New York, N.Y.) 1964;145:1310–2. eng.
23. Stern D, Nawroth P, Handley D, Kisiel W. An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82:2523–7. eng.
24. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003;1:1504–14. eng.
25. Laux V, Perzborn E, Heitmeier S, et al. Direct inhibitors of coagulation proteins - the end of the heparin and low-molecular-weight heparin era for anticoagulant therapy? *Thrombosis and haemostasis* 2009;102:892–9. (Accessed February 3, 2015, at 19888525). eng.
26. Lisman T, de Groot, Philip G, Meijers, Joost C M, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005;105:1102–5. eng.
27. Meltzer ME, Lisman T, Doggen, Carine J M, de Groot, Philip G, Rosendaal FR. Synergistic effects of hypofibrinolysis and genetic and acquired risk factors on the risk of a first venous thrombosis. *PLoS medicine* 2008;5:e97. eng.
28. Sachdeva A, Dalton M, Amaragiri SV, Lees T. Graduated compression stockings for prevention of deep vein thrombosis. *The Cochrane database of systematic reviews* 2014;12:CD001484. eng.
29. Hui AC, Heras-Palou C, Dunn I, et al. Graded compression stockings for prevention of deep-vein thrombosis after hip and knee replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 1996;78:550–4. eng.
30. Noble S, Peters DH, Goa KL. Enoxaparin. A reappraisal of its pharmacology and clinical applications in the prevention and treatment of thromboembolic disease. *Drugs* 1995;49:388–410. eng.
31. Meneveau N. Safety evaluation of enoxaparin in currently approved indications. *Expert opinion on drug safety* 2009;8:745–54. (Accessed July 5, 2015, at 19860536). eng.
32. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e24S-43S. (Accessed July 5, 2015, at 22315264). eng.
33. Falck-Ytter Y, Francis CW, Johanson NA, et al. Prevention of VTE in orthopedic surgery patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e278S-325S. eng.

- 34.** Haas S, Encke A, Krauspe R, Waydhas C. Thrombosis prophylaxis in surgery. What is the evidence? [Thromboseprophylaxe in der Chirurgie. Was ist wirklich gesichert?]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2011;82:1085–90. ger.
- 35.** Alban. Niedermolekulare Heparine – wirklich alle gleich? *VASCULAR CARE* 2008;(2/2008 VOL. 15).
- 36.** Turpie, Alexander G G, Bauer KA, Eriksson BI, Lassen MR. Fondaparinux vs enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism in major orthopedic surgery: a meta-analysis of 4 randomized double-blind studies. *Archives of internal medicine* 2002;162:1833–40. eng.
- 37.** Kubitzka D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:412–21. eng.
- 38.** Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, et al. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methylthiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48:5900–8. (Accessed January 28, 2015). eng.
- 39.** Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e44S-88S. eng.
- 40.** Agnelli G, Eriksson BI, Cohen AT, et al. Safety assessment of new antithrombotic agents: lessons from the EXTEND study on ximelagatran. *Thrombosis research* 2009;123:488–97. eng.
- 41.** Patel MR, Hellkamp AS, Lokhnygina Y, et al. Outcomes of discontinuing rivaroxaban compared with warfarin in patients with nonvalvular atrial fibrillation: analysis from the ROCKET AF trial (Rivaroxaban Once-Daily, Oral, Direct Factor Xa Inhibition Compared With Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation). *J Am Coll Cardiol* 2013;61:651–8. eng.
- 42.** Nurmohamed MT, Rosendaal FR, Buller HR, et al. Low-molecular-weight heparin versus standard heparin in general and orthopaedic surgery: a meta-analysis. *Lancet* 1992;340:152–6. eng.
- 43.** Ahmad S, Jeske WP, Ma Q, Walenga JM, Fareed J. Inhibition of tissue factor-activated platelets by low-molecular-weight heparins and glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist. *Thrombosis research* 2001;102:143–51. eng.

44. Fareed J, Hoppensteadt D, Walenga J, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of enoxaparin, Implications for clinical practice. *Clinical pharmacokinetics* 2003;42:1043–57. eng.
45. Gibson CM, Murphy SA, Montalescot G, et al. Percutaneous coronary intervention in patients receiving enoxaparin or unfractionated heparin after fibrinolytic therapy for ST-segment elevation myocardial infarction in the ExTRACT-TIMI 25 trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49:2238–46. (Accessed July 5, 2015, at 17560287). eng.
46. Rote Liste Service GmbH. Fachinformation Sanofi Clexane 20 mg, Clexane 40 mg, Stand: November 2015; zitiert am 09.10.2016; URL: <https://mein.sanofi.de/produkte/Clexane/Downloads?id=1eed8096-00cc-4990-9f37-948e15ae4393>.
47. Haverkamp D, Hutten BA, Buller HR, Gallus AS, Lensing AWA, Prins MH. The use of specific antidotes as a response to bleeding complications during anticoagulant therapy for venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003;1:69–73. eng.
48. Misselwitz F, Berkowitz SD, Perzborn E. The discovery and development of rivaroxaban. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1222:64–75. (Accessed February 3, 2015, at 21434944). eng.
49. Ansell J. Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007;5 Suppl 1:60–4. eng.
50. Kubitzka D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlsdorf M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor--after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:873–80. eng.
51. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost* 2005;3:514–21. eng.
52. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Mueck W, Laux V. Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30:376–81. (Accessed January 28, 2015, at 20139357). eng.
53. Perzborn E, Kubitzka D, Misselwitz F. Rivaroxaban. A novel, oral, direct factor Xa inhibitor in clinical development for the prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Hamostaseologie* 2007;27:282–9. eng.
54. Kubitzka D, Becka M, Roth A, Mueck W. The influence of age and gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct Factor Xa

- inhibitor. *Journal of clinical pharmacology* 2013;53:249–55. (Accessed February 3, 2015, at 23381840). eng.
55. Kubitza D, Perzborn E, Berkowitz SD. The discovery of rivaroxaban: translating preclinical assessments into clinical practice. *Front Pharmacol* 2013;4:145. eng.
56. Stampfuss J, Kubitza D, Becka M, Mueck W. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 2013;51:549–61. (Accessed February 3, 2015, at 23458226). eng.
57. Laux V, Perzborn E, Kubitza D, Misselwitz F. Preclinical and clinical characteristics of rivaroxaban: a novel, oral, direct factor Xa inhibitor. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2007;33:515–23. (Accessed January 28, 2015, at 17629849). eng.
58. Weinz C, Schwarz T, Kubitza D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2009;37:1056–64. eng.
59. Mueck W, Schwes S, Stampfuss J. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring. *Thrombosis journal* 2013;11:10. (Accessed February 4, 2015). eng.
60. Samama MM, Contant G, Spiro TE, et al. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Thrombosis journal* 2013;11:11. (Accessed February 3, 2015). eng.
61. Mueck W, Eriksson BI, Bauer KA, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor--in patients undergoing major orthopaedic surgery. *Clin Pharmacokinet* 2008;47:203–16. eng.
62. Mueck W, Lensing, Anthonie W A, Agnelli G, Decousus H, Prandoni P, Misselwitz F. Rivaroxaban: population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention. *Clinical pharmacokinetics* 2011;50:675–86. eng.
63. Kubitza D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M. Safety, tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rivaroxaban--an oral, direct factor Xa inhibitor--are not affected by aspirin. *Journal of clinical pharmacology* 2006;46:981–90. (Accessed January 28, 2015). eng.
64. Kubitza D, Becka M, Mueck W, Zuehlsdorf M. Rivaroxaban (BAY 59-7939)--an oral, direct Factor Xa inhibitor--has no clinically relevant interaction with naproxen. *British journal of clinical pharmacology* 2007;63:469–76. (Accessed January 28, 2015, at 17100983). eng.
65. Perzborn E, Heitmeier S, Laux V, Buchmüller A. Reversal of rivaroxaban-induced anticoagulation with prothrombin complex concentrate, activated prothrombin

- complex concentrate and recombinant activated factor VII in vitro. *Thrombosis research* 2014;133:671–81. (Accessed January 28, 2015, at 24529498). eng.
- 66.** Mueck W, Borris LC, Dahl OE, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of once- and twice-daily rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. *Thromb Haemost* 2008;100:453–61. eng.
- 67.** Lassen MR, Ageno W, Borris LC, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. *The New England journal of medicine* 2008;358:2776–86. (Accessed January 28, 2015). eng.
- 68.** Turpie AG, Lassen MR, Davidson BL, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial. *The Lancet* 2009;373:1673–80. (Accessed July 16, 2015).
- 69.** Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B, et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *The New England journal of medicine* 2010;363:2499–510. (Accessed February 3, 2015). eng.
- 70.** Büller HR, Prins MH, Lensin, Anthonie W A, et al. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *The New England journal of medicine* 2012;366:1287–97. (Accessed February 3, 2015). eng.
- 71.** Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *The New England journal of medicine* 2012;366:9–19. eng.
- 72.** Cohen AT, Spiro TE, Büller HR, et al. Rivaroxaban for thromboprophylaxis in acutely ill medical patients. *The New England journal of medicine* 2013;368:513–23. eng.
- 73.** Lassen MR, Haas S, Kreutz R, Mantovani LG, Holberg G, Turpie, Alexander G G. Rivaroxaban for Thromboprophylaxis After Fracture-Related Orthopedic Surgery in Routine Clinical Practice. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2015. eng.
- 74.** Bayer Pharma AG. Xarelto® Summary of Product Characteristics, Stand: 22.5.2013; zitiert am 09.10.2016; URL: <https://www.xarelto.com/en/spc/>.
- 75.** Collins R, Scrimgeour A, Yusuf S, Peto R. Reduction in fatal pulmonary embolism and venous thrombosis by perioperative administration of subcutaneous heparin. Overview of results of randomized trials in general, orthopedic, and urologic surgery. *The New England journal of medicine* 1988;318:1162–73. eng.

- 76.** Hoffmann P, Keller F. Increased major bleeding risk in patients with kidney dysfunction receiving enoxaparin: a meta-analysis. *European journal of clinical pharmacology* 2012;68:757–65. eng.
- 77.** Boddi M, Peris A. Deep Vein Thrombosis in Intensive Care. *Advances in experimental medicine and biology* 2016. eng.
- 78.** Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 2001;119:64S-94S. eng.
- 79.** Linkins L-A, Dans AL, Moores LK, et al. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:e495S-530S. eng.
- 80.** Muir JM, Andrew M, Hirsh J, et al. Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. *Blood* 1996;88:1314–20. eng.
- 81.** Le Templier G, Rodger MA. Heparin-induced osteoporosis and pregnancy. *Current opinion in pulmonary medicine* 2008;14:403–7. (Accessed January 28, 2015). eng.
- 82.** Guervil DJ, Rosenberg AF, Winterstein AG, Harris NS, Johns TE, Zumberg MS. Activated partial thromboplastin time versus antifactor Xa heparin assay in monitoring unfractionated heparin by continuous intravenous infusion. *The Annals of pharmacotherapy* 2011;45:861–8. eng.
- 83.** Kwong LM. Comparative safety and efficacy of antithrombotics in the management of venous thromboembolism after knee or hip replacement surgery: focus on rivaroxaban. *Clinical pharmacology : advances and applications* 2013;5:143–8. (Accessed July 5, 2015, at 23946671). eng.
- 84.** Rezaie AR. Prothrombin protects factor Xa in the prothrombinase complex from inhibition by the heparin-antithrombin complex. *Blood* 2001;97:2308–13. eng.
- 85.** Beyer-Westendorf J, Lützner J, Donath L, et al. Efficacy and safety of rivaroxaban or fondaparinux thromboprophylaxis in major orthopedic surgery: findings from the ORTHO-TEP registry. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2012;10:2045–52. (Accessed July 5, 2015, at 22882706). eng.
- 86.** Cope J, Bushwitz J, An G, Antigua A, Patel A, Zumberg M. Clinical experience with prophylactic fondaparinux in critically ill patients with moderate to severe renal impairment or renal failure requiring renal replacement therapy. *The Annals of pharmacotherapy* 2015;49:270–7. eng.
- 87.** Hull Russell, Raskob Gary, Pineo Graham, Rosenbloom David, Evans William, Mallory Thomas, Anquist Kenneth, Smith Frank, Hughes Gary, Green David, Elliott C. Gregory, Panju Akbar, Brant Rollin. A Comparison of Subcutaneous Low-

- Molecular-Weight Heparin with Warfarin Sodium for Prophylaxis against Deep-Vein Thrombosis after Hip or Knee Implantation.
88. Leclerc JR, Geerts WH, Desjardins L, et al. Prevention of venous thromboembolism after knee arthroplasty. A randomized, double-blind trial comparing enoxaparin with warfarin. *Annals of internal medicine* 1996;124:619–26. eng.
 89. Dang CH, Durkalski VL, Nappi JM. Evaluation of treatment with direct thrombin inhibitors in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Pharmacotherapy* 2006;26:461–8. eng.
 90. Di Nisio M, Middeldorp S, Büller HR. Direct thrombin inhibitors. *The New England journal of medicine* 2005;353:1028–40. eng.
 91. Albers GW, Diener H-C, Frison L, et al. Ximelagatran vs warfarin for stroke prevention in patients with nonvalvular atrial fibrillation: a randomized trial. *JAMA* 2005;293:690–8. eng.
 92. Eriksson BI, Dahl OE, Büller HR, et al. A new oral direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, compared with enoxaparin for prevention of thromboembolic events following total hip or knee replacement: the BISTRO II randomized trial. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2005;3:103–11. eng.
 93. Hitoshi Nishio , Masahiro Ieko , Toru Nakabayashi. New therapeutic option for thromboembolism – dabigatran etexilate.
 94. Furugohri T, Sugiyama N, Morishima Y, Shibano T. Antithrombin-independent thrombin inhibitors, but not direct factor Xa inhibitors, enhance thrombin generation in plasma through inhibition of thrombin-thrombomodulin-protein C system. *Thrombosis and haemostasis* 2011;106:1076–83. eng.
 95. Perzborn E, Heitmeier S, Buetehorn U, Laux V. Direct thrombin inhibitors, but not the direct factor Xa inhibitor rivaroxaban, increase tissue factor-induced hypercoagulability in vitro and in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2014;12:1054–65. (Accessed July 5, 2015, at 24766850). eng.
 96. Perzborn E, Arndt B, Fischer E, et al. An in vivo risk – benefit comparison of the effects of rivaroxaban An in vivo risk–benefit comparison of the effects of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – with thrombin inhibitors, warfarin and clopidogrel. inhibitors, warfarin and clopidogrel. *J Thromb Haemost* 2007;(5(suppl 2):Abstract P-W-638).
 97. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2008;3 Suppl 3:S131-9. (Accessed July 5, 2015, at 18988698). eng.
 98. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 2002;173:387–94. eng.

- 99.** Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. *Archives of biochemistry and biophysics* 2008;473:183–7. eng.
- 100.** Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* 2012;23:13–27. eng.
- 101.** Keck A-V, Pecherstorfer M. Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *J Miner Stoffwechs* 2003;10:6–11. (Accessed July 5, 2015).
- 102.** Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Advances in wound care* 2013;2:306–16. (Accessed July 5, 2015, at 24527352). eng.
- 103.** Wagner ER, Luther G, Zhu G, et al. Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* 2011;2011:325238. (Accessed July 5, 2015, at 21437219). eng.
- 104.** Takegahara N, Kim H, Mizuno H, et al. Involvement of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL)-induced Incomplete Cytokinesis in the Polyploidization of Osteoclasts. *The Journal of biological chemistry* 2016;291:3439–54. eng.
- 105.** Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744–9. eng.
- 106.** Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 1999;25:517–23. eng.
- 107.** Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy* 2007;9 Suppl 1:S1. (Accessed July 5, 2015). eng.
- 108.** Manolagas Stavros C., Jilka Robert L. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *The New England journal of medicine* 1995:305–11.
- 109.** Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1990;5:311–9. eng.
- 110.** Driessen, J H M, Hansen L, Eriksen SA, et al. The epidemiology of fractures in Denmark in 2011. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2016;27:2017–25. eng.

111. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research* 1998;(355 Suppl):S7-21. eng.
112. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42:551–5. (Accessed July 5, 2015, at 21489527). eng.
113. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry* 2003;88:873–84. eng.
114. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009;27:1887–98. (Accessed July 5, 2015, at 19544445). eng.
115. Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* 2006;60:273–6. eng.
116. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics* 2006;38:1424–9. eng.
117. Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 2009;40 Suppl 3:S4-7. eng.
118. Pilge H, Fröbel J, Prodinger PM, et al. Enoxaparin and rivaroxaban have different effects on human mesenchymal stromal cells in the early stages of bone healing. *Bone & joint research* 2016;5:95–100. eng.
119. Crane JL, Zhao L, Frye JS, Xian L, Qiu T, Cao X. IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res.* 2013;1:186–94. (Accessed July 16, 2015).
120. Barbour LA, Kick SD, Steiner JF, et al. A prospective study of heparin-induced osteoporosis in pregnancy using bone densitometry. *American journal of obstetrics and gynecology* 1994;170:862–9. eng.
121. Nelson-Piercy C, Letsky EA, Swiet M de. Low-molecular-weight heparin for obstetric thromboprophylaxis: experience of sixty-nine pregnancies in sixty-one women at high risk. *American journal of obstetrics and gynecology* 1997;176:1062–8. eng.
122. Wawrzynska L, Tomkowski WZ, Przedlacki J, Hajduk B, Torbicki A. Changes in bone density during long-term administration of low-molecular-weight heparins or acenocoumarol for secondary prophylaxis of venous thromboembolism. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 2003;33:64–7. eng.

- 123.** Hurley MM, Kessler M, Gronowicz G, Raisz LG. The interaction of heparin and basic fibroblast growth factor on collagen synthesis in 21-day fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1992;130:2675–82. eng.
- 124.** Kanzaki S, Takahashi T, Kanno T, et al. Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *Journal of cellular physiology* 2008;216:844–50. (Accessed January 28, 2015, at 18449905). eng.
- 125.** Rajgopal R, Bear M, Butcher MK, Shaughnessy SG. The effects of heparin and low molecular weight heparins on bone. *Thrombosis research* 2008;122:293–8. (Accessed January 28, 2015, at 17716711). eng.
- 126.** Street JT, McGrath M, O'Regan K, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Thromboprophylaxis using a low molecular weight heparin delays fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research* 2000;(381):278–89. eng.
- 127.** Klüter T, Weuster M, Brüggemann S, et al. Rivaroxaban does not impair fracture healing in a rat femur fracture model: an experimental study. *BMC musculoskeletal disorders* 2015;16:79. (Accessed July 5, 2015, at 25886252). eng.
- 128.** Xia J, Zhang Z, Wang J, Zu J, Wang N, Wang D. Comparison of the effects of heparin and the direct factor Xa inhibitor, rivaroxaban, on bone microstructure and metabolism in adult rats. *Connective tissue research* 2015;56:477–82. eng.
- 129.** Handschin AE, Trentz OA, Hoerstrup SP, Kock HJ, Wanner GA, Trentz O. Effect of low molecular weight heparin (dalteparin) and fondaparinux (Arixtra) on human osteoblasts in vitro. *The British journal of surgery* 2005;92:177–83. eng.
- 130.** Handschin AE, Egermann M, Trentz O, et al. Cbfa-1 (Runx-2) and osteocalcin expression by human osteoblasts in heparin osteoporosis in vitro. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2006;12:465–72. eng.
- 131.** Winkler T, Perka C, Matziolis D, Matziolis G. Effect of a direct thrombin inhibitor compared with dalteparin and unfractionated heparin on human osteoblasts. *The open orthopaedics journal* 2011;5:52–8. eng.
- 132.** Kock HJ, Handschin AE. Osteoblast growth inhibition by unfractionated heparin and by low molecular weight heparins: an in-vitro investigation. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2002;8:251–5. eng.
- 133.** Gigi R, Salai M, Dolkart O, et al. The effects of direct factor Xa inhibitor (Rivaroxaban) on the human osteoblastic cell line SaOS2. *Connective tissue research* 2012;53:446–50. (Accessed July 16, 2015, at 22800431). eng.
- 134.** Somjen D, Katzburg S, Gigi R, et al. Rivaroxaban, a direct inhibitor of the coagulation factor Xa interferes with hormonal-induced physiological modulations in

- human female osteoblastic cell line SaSO2. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2013;135:67–70. (Accessed January 28, 2015, at 23333933). eng.
- 135.** Solayar GN, Walsh PM, Mulhall KJ. The effect of a new direct Factor Xa inhibitor on human osteoblasts: an in-vitro study comparing the effect of rivaroxaban with enoxaparin. *BMC musculoskeletal disorders* 2011;12:247. (Accessed January 28, 2015, at 22035050). eng.
- 136.** Sauerbier S, Stricker A, Kuschnierz J, et al. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. *Tissue engineering. Part C, Methods* 2010;16:215–23. eng.
- 137.** Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity. *Cell transplantation* 2008;16:1059–69. eng.
- 138.** Jager M, Jelinek EM, Wess KM, et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009;4:34–43. eng.
- 139.** Gessmann J, Köller M, Godry H, Schildhauer TA, Seybold D. Regenerate augmentation with bone marrow concentrate after traumatic bone loss. *Orthopedic reviews* 2012;4:e14. eng.
- 140.** Marchenko S, Flanagan L. Counting human neural stem cells. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2007;(7):262. eng.
- 141.** Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7. eng.
- 142.** Ellensen VS, Abrahamsen I, Lorens J, Jonung T. Effects of enoxaparin and dalteparin on proliferation and migration of patient-derived vascular smooth muscle cells. *VASA. Zeitschrift für Gefässkrankheiten* 2014;43:124–31. (Accessed July 16, 2015, at 24627318). eng.
- 143.** Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning, A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 volumes. ISBN: 0-87969-576-5.
- 144.** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001;25:402–8. eng.
- 145.** Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry* 2004;329:77–84. eng.

- 146.** Tiago Ferreira & Wayne Rasband. ImageJ User Guide, Version IJ 1.46r; Stand: 02.10.2012; zitiert am 09.10.2016; URL: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>.
- 147.** Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC genomics* 2007;8:70. (Accessed July 5, 2015, at 17352823). eng.
- 148.** Geyh S, Oz S, Cadeddu R-P, et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia* 2013;27:1841–51. (Accessed January 28, 2015, at 23797473). eng.
- 149.** Granéli C, Thorfve A, Ruetschi U, et al. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem cell research* 2014;12:153–65. (Accessed January 15, 2015, at 24239963). eng.
- 150.** Leung KS, Fung KP, Sher AH, Li CK, Lee KM. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 1993;75:288–92. eng.
- 151.** Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta orthopaedica Scandinavica* 1980;51:595–600. eng.
- 152.** Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1991;9:383–90. eng.
- 153.** Ton FN, Gunawardene SC, Lee H, Neer RM. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2005;20:464–70. eng.
- 154.** Sandberg OH, Aspenberg P. Glucocorticoids inhibit shaft fracture healing but not metaphyseal bone regeneration under stable mechanical conditions. *Bone & joint research* 2015;4:170–5. eng.
- 155.** Gimble JM, Morgan C, Kelly K, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *Journal of cellular biochemistry* 1995;58:393–402. eng.
- 156.** Osip SL, Butcher M, Young E, Yang L, Shaughnessy SG. Differential effects of heparin and low molecular weight heparin on osteoblastogenesis and adipogenesis in vitro. *Thrombosis and haemostasis* 2004;92:803–10. eng.
- 157.** Matziolis G, Perka C, Disch A, Zippel H. Effects of fondaparinux compared with dalteparin, enoxaparin and unfractionated heparin on human osteoblasts. *Calcified*

- tissue international 2003;73:370–9. (Accessed January 28, 2015, at 12874702).
eng.
- 158.** Jones G, Sambrook PN. Drug-induced disorders of bone metabolism. Incidence, management and avoidance. *Drug safety* 1994;10:480–9. eng.
- 159.** Matzsch T, Bergqvist D, Hedner U, Nilsson B, Ostergaard P. Effects of low molecular weight heparin and unfragmented heparin on induction of osteoporosis in rats. *Thrombosis and haemostasis* 1990;63:505–9. eng.
- 160.** Muir JM, Hirsh J, Weitz JI, Andrew M, Young E, Shaughnessy SG. A histomorphometric comparison of the effects of heparin and low-molecular-weight heparin on cancellous bone in rats. *Blood* 1997;89:3236–42. eng.
- 161.** Kock HJ, Werther S, Uhlenkott H, Taeger G. Influence of unfractionated and low-molecular-weight heparin on bone healing: an animal model [Beeinflussung der Knochenheilung durch unfraktionierte und niedermolekulare Heparine: eine tierexperimentelle Studie]. *Der Unfallchirurg* 2002;105:791–6. ger.
- 162.** Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteoprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue engineering* 2007;13:2311–20. (Accessed July 16, 2015, at 17523879). eng.
- 163.** Prodinger PM, Burgkart R, Kreutzer K, et al. Does Anticoagulant Medication Alter Fracture-Healing? A Morphological and Biomechanical Evaluation of the Possible Effects of Rivaroxaban and Enoxaparin Using a Rat Closed Fracture Model. *PloS one* 2016;11:e0159669. eng.
- 164.** Pilge H, Fröbel J, Mrotzek SJ, et al. Effects of thromboprophylaxis on mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation: an in-vitro study comparing enoxaparin with rivaroxaban. *BMC musculoskeletal disorders* 2016;17:108. eng.
- 165.** Jameson SS, Rymaszewska M, Hui, Anthony C W, James P, Serrano-Pedraza I, Muller SD. Wound complications following rivaroxaban administration: a multicenter comparison with low-molecular-weight heparins for thromboprophylaxis in lower limb arthroplasty. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2012;94:1554–8. eng.
- 166.** Somjen D, Sharfman ZT, Katzburg S, et al. Rivaroxaban significantly inhibits the stimulatory effects of bone-modulating hormones: In vitro study of primary female osteoblasts. *Connective tissue research* 2016:1–6. eng.
- 167.** Magnusson P, Sharp CA, Farley JR. Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts. *Clinica Chimica Acta* 2002;325:59–70.

- 168.** Farley JR, Baylink DJ. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism: clinical and experimental* 1986;35:563–71. eng.
- 169.** Wada S, Fukawa T, Kamiya S. Osteocalcin and bone. *Clinical calcium* 2007;17:1673–7. jpn.
- 170.** Heldin CH, Miyazono K, Dijke P ten. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997;390:465–71. eng.
- 171.** Anderson GJ, Darshan D. Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nature chemical biology* 2008;4:15–6. eng.
- 172.** Luu HH, Song W-X, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2007;25:665–77. eng.
- 173.** Prall WC, Haasters F, Heggebo J, et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation. *Biochemical and biophysical research communications* 2013;440:617–22. eng.
- 174.** Robubi A, Berger C, Schmid M, Huber KR, Engel A, Krugluger W. Gene expression profiles induced by growth factors in in vitro cultured osteoblasts. *Bone & joint research* 2014;3:236–40. eng.
- 175.** Cheng SL, Lecanda F, Davidson MK, et al. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1998;13:633–44. eng.
- 176.** Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–50. eng.
- 177.** He XC, Zhang J, Tong W-G, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature genetics* 2004;36:1117–21. eng.
- 178.** Lin L, Qiu Q, Zhou N, et al. Dickkopf-1 is involved in BMP9-induced osteoblast differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *BMB reports* 2016;49:179–84. eng.
- 179.** Minuto F, Palermo C, Arvigo M, Barreca AM. The IGF system and bone. *Journal of endocrinological investigation* 2005;28:8–10. eng.
- 180.** Conover CA, Khosla S. Role of extracellular matrix in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 regulation of IGF-II action in normal human osteoblasts. *Growth Hormone & IGF Research* 2003;13:328–35. (Accessed July 16, 2015).

- 181.** Conover CA, Johnstone EW, Turner RT, et al. Subcutaneous administration of insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF binding protein-2 complex stimulates bone formation and prevents loss of bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 2002;12:178–83. eng.
- 182.** De-Ugarte L, Yoskovitz G, Balcells S, et al. MiRNA profiling of whole trabecular bone: identification of osteoporosis-related changes in MiRNAs in human hip bones. *BMC medical genomics* 2015;8:75. eng.
- 183.** Xi G, Wai C, DeMambro V, Rosen CJ, Clemmons DR. IGFBP-2 directly stimulates osteoblast differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2014;29:2427–38. (Accessed July 16, 2015, at 24839202). eng.
- 184.** Galea GL, Meakin LB, Williams CM, et al. Protein kinase C α (PKC α) regulates bone architecture and osteoblast activity. *The Journal of biological chemistry* 2014;289:25509–22. (Accessed July 16, 2015, at 25070889). eng.
- 185.** Irie A, Takami M, Kubo H, Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. *Bone* 2007;41:165–74. eng.
- 186.** Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry* 2006;99:1233–9. eng.
- 187.** Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *Journal of cellular biochemistry* 2002;87:1–8. eng.
- 188.** Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17–29. eng.
- 189.** Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews* 1993;14:424–42. (Accessed July 16, 2015). eng.
- 190.** Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Ellefsen K, et al. Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2000;15:1266–74. (Accessed July 16, 2015). eng.
- 191.** Moursi AM, Globus RK, Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *Journal of cell science* 1997;110 (Pt 18):2187–96. eng.

- 192.** Kaabeche K, Guenou H, Bouvard D, Didelot N, Listrat A, Marie PJ. Cbl-mediated ubiquitination of alpha5 integrin subunit mediates fibronectin-dependent osteoblast detachment and apoptosis induced by FGFR2 activation. *Journal of cell science* 2005;118:1223–32. eng.
- 193.** Hamidouche Z, Fromigué O, Ringe J, et al. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:18587–91. (Accessed July 5, 2015). eng.
- 194.** Hamidouche Z, Fromigué O, Ringe J, Häupl T, Marie PJ. Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation. *BMC cell biology* 2010;11:44. (Accessed July 5, 2015, at 20573191). eng.
- 195.** Han B, Tang B, Nimni ME. Combined effects of phosphatidylcholine and demineralized bone matrix on bone induction. *Connective tissue research* 2003;44:160–6. eng.
- 196.** Folwarczna J, Janiec W, Gawor M, Pytlik M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Nowińska B. Effects of enoxaparin on histomorphometric parameters of bones in rats. *Polish journal of pharmacology* 2004;56:451–7. (Accessed July 16, 2015). eng.
- 197.** Folwarczna J, Janiec W, Sliwiński L. Effects of heparin and low-molecular-weight heparins on bone mechanical properties in rats. *Thromb Haemost* 2004.
- 198.** Sarahrudi K, Kaiser G, Thomas A, et al. The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing. *International orthopaedics* 2012;36:1095–8. (Accessed July 5, 2015, at 22038446). eng.

6. Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Angriffspunkte von Rivaroxaban, Heparin und direkten Thrombin-Inhibitoren (DTIs) auf die Gerinnungskaskade.	6
Abb. 2: Osteogene Differenzierung.	16
Abb. 3: Entnahme des Knochenmarks aus dem Darmbein bei einem operativen Eingriff.	24
Abb. 4: Bone Marrow Aspirate Concentrate (BMAC) vermischt mit Knochenersatzmaterial (Orthoss®).	25
Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Zellkulturarbeit.	30
Abb. 6: Prinzip der Reversen Transkription.	33
Abb. 7: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.	34
Abb. 8: Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.	39
Abb. 9: Belegung der 12-well-Platten für die Durchführung der Färbungen.	40
Abb.10: Effekte auf die Proliferation.	44
Abb. 11: Veränderung der relative Genexpression durch osteogene Differenzierung.	46
Abb. 12: Genexpression von ALPL, BGLAP, BMP2 und COL1A1.	48
Abb. 13: Genexpression von CDH11 und DKK1.	49
Abb. 14: Genexpression von IGF2 und IGFBP2.	50
Abb. 15: Genexpression von PRKCa, RANKL, Runx2 und SP7.	52
Abb. 16: Punktwolkendiagramme zur Expression der Oberflächenmoleküle CD34 und CD45.	54
Abb. 17: Änderung der Expression der Oberflächenmoleküle CD73, CD90 und CD105 während 21 Tage osteogener Differenzierung.	55
Abb. 19: Expression von CD10 und CD92.	58
Abb. 20: Expression CD49e.	59
Abb. 21: Beispiel-wells der Färbung der Alkalischen Phosphatase an Tag 21 und statistische Auswertung.	61
Abb. 22: Beispiel-wells der Färbung mit Alizarin-Rot an Tag 21 und statistische Auswertung.	63
Abb. 23: Einfluss von Enoxaparin und Rivaroxaban auf die Migrationsfähigkeit der mesenchymalen Stromazellen.	80
Abb. 24: Genexpression von CXCR4, TNFα, CryaB, IGF1, IGF2 und BMP2.	81

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Zusammensetzung des individuellen Thrombose-Risikos.	2
Tabelle 2: Risiko für eine venöse Thromboembolie (VTE) bei Operationen.	3
Tabelle 3: Indikationen und entsprechende Dosierung für den Einsatz von Enoxaparin. .	8
Tabelle 4: Indikationen und entsprechende Dosierung für den Einsatz von Rivaroxaban.	11
Tabelle 5: Beispiele für Vor- und Nachteile von Rivaroxaban und Enoxaparin.	12
Tabelle 6: Zusammensetzung des Basalmediums.	26
Tabelle 7: Zusammensetzung des Osteogenen Differenzierungsmediums.	28
Tabelle 8: Medikamentenkonzentrationen.	28/29
Tabelle 9: Pipettierschema für die cDNA-Synthese.	33
Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer.	35
Tabelle 11: Liste der verwendeten Antikörper.	37/38

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. R. Krauspe für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in diesem Rahmen durchführen zu können.

Ein großer Dank geht an Dr. Julia Fröbel und Dr. Hakan Pilge für die Hilfe bei der Durchführung des Projektes, die stetige Unterstützung und nicht zuletzt die Korrektur der Arbeit. Nach Höhen und Tiefen in der Arbeit im Forschungslabor freue ich mich sehr über die Ergebnisse unserer Forschung und die damit verbundenen gemeinsamen Veröffentlichungen.

Vielen lieben Dank an Sabine Lensing-Höhn. Ohne dich wäre die Laborarbeit undenkbar gewesen und du standest mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders danken möchte ich auch Prof. Dr. J. Fischer unter anderem für die Unterstützung beim Erwerb der Zellen und Dr. S. Geyh für die Hilfe bei der Durchführung der Durchflusszytometrie. Mein Dank gilt Prof. Dr. Zilkens sowohl für die Bereitstellung von Patientenmaterial, als auch für die Unterstützung während meiner Zeit an der Uniklinik Düsseldorf.

Ganz besonders möchte ich meine Eltern danken, die mich während Studium und Promotion immer unterstützt haben und mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Ziele nach meinen Vorstellungen umzusetzen. Danke auch an meine Brüder Christian und Alex, die immer für mich da sind. Nicht zuletzt gilt mein Dank Simone, der besten Zwillingsschwester, die man sich wünschen kann. Danke für deine Anregungen und Hilfestellungen bei der Doktorarbeit, aber auch für alles andere.

In Gedenken an meine Oma Elfriede und meine Oma Hedwig.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 23.11.2016

Silvia Jasmin Mrotzek