

**Marcus Jäger, Alexander Wild und Rüdiger Krauspe**

## **Knochenregeneration und Knochenrekonstruktion durch Stammzellen**

### **Einleitung – Epidemiologie von Substanzdefekten des knöchernen Bewegungsapparates**

Mehr als die Hälfte aller chronischen Erkrankungen bei Patienten über 60 Jahre sind heute bereits Gelenkerkrankungen. Jeder vierte Mensch in diesem Alter leidet dadurch unter starken Schmerzen und ist in seiner Beweglichkeit erheblich eingeschränkt. Allein in Deutschland haben schätzungsweise 15 Millionen Menschen zumindest zeitweise Gelenkbeschwerden.<sup>1</sup> Die Zahl der jährlich implantierten Hüftendoprothesen in Deutschland liegt bei etwa 150.000 und für Knieendoprothesen bei etwa 60.000. Die stetige Zunahme der Älteren in der Gesellschaft macht eine weitere deutliche Steigerung der Operationszahlen wahrscheinlich.<sup>2</sup> In der Wirbelsäulenchirurgie, in der Tumororthopädie und insbesondere für endoprothetische Revisionseingriffe, die häufig mit großen knöchernen Substanzdefekten einhergehen, besteht ein hoher Bedarf an Knochentransplantaten und/oder Knochenersatzmaterialien.

Auch osteoporosebedingte Frakturen haben in den letzten Jahren stark zugenommen. Untersuchungen zeigen, dass zehn Prozent aller Männer und Frauen eine oder mehrere osteoporosebedingte Wirbelkörperveränderungen haben.<sup>3</sup> Jährlich tritt bei etwa fünf Prozent aller 50- bis 79-jährigen Frauen eine neue osteoporosebedingte Wirbelkörperdeformität auf.

Durch die Weiterentwicklung interdisziplinärer Therapiemöglichkeiten konnte die Anzahl der Extremitäten erhaltenden Eingriffe bei Patienten mit primären oder sekundären Knochtumoren deutlich gesteigert werden. Für die wachsende Zahl der aus tumorchirurgischen Eingriffen resultierenden ossären Substanzdefekte stehen jedoch nur begrenzte und häufig unbefriedigende Therapieoptionen zur Verfügung.

Auch in der Traumatologie sind größere Knochendefekte von epidemiologischer Bedeutung. So wird die Häufigkeit der Schenkelhalsfrakturen für Deutschland auf über 100.000 pro Jahr geschätzt. Das Risiko, einen solchen Bruch zu erleiden, nimmt mit dem Alter exponentiell zu und verdoppelt sich jenseits des 65. Lebensjahres mit jedem Lebensjahrzehnt.

Die Erkrankungen und Verletzungen der Haltungs- und Bewegungsorgane stehen aber nicht nur bei Patienten im fortgeschrittenen Alter im Vordergrund. Mehr als 40 Prozent der jungen Erwachsenen haben ihren ersten Arztkontakt aufgrund von Erkrankungen oder Verletzungen des Stütz- und Bewegungsapparates.

---

<sup>1</sup> Vgl. *The Bone and Joint Decade* (1998) und Brundtland (2000).

<sup>2</sup> Vgl. Dreinhöfer (2000).

<sup>3</sup> Vgl. Felsenberg *et al.* (1998).

Trotz der offensichtlichen volkswirtschaftlichen und gesellschaftlichen Bedeutung dieser Erkrankungen und Verletzungen fand weltweit bisher keine adäquate Reflexion mit dem Ziel statt, die Forschungsförderung und die Ausbildung der Medizinstudierenden dieser Entwicklung anzupassen. In einer Untersuchung in den USA fand sich unter den 29 am höchsten geförderten Forschungsbereichen der National Institutes of Health (NIH) kein einziger aus dem Bereich der chronischen Erkrankungen der Bewegungsorgane. In Deutschland zeigt sich ein vergleichbares Bild: 1998 förderte die Deutsche Forschungsgemeinschaft 34 „klinische Forschergruppen“; lediglich eine beschäftigte sich mit dem Bewegungsapparat.

## Therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von Knochendefekten

Derzeit stehen mehrere Behandlungsmöglichkeiten zur Therapie von Knochendefekten zur Verfügung. Zu den operativen Verfahren gehören die Osteosynthesen, die Transplantation von Spender- sowie autologem Knochen, die Eröffnung von benachbarten Knochenarealen zur lokalen Durchblutungsverbesserung und das Einbringen von Ersatzstoffen (Biomaterialien). Während die autologe Spongiosatransplantation einen patientenbelastenden Sekundäreingriff mit einer bis zu 40-prozentigen Komorbidität (Infektion, Hämatom, Verletzung subkutaner Nerven mit Hyp- und Dysaesthesien) impliziert,<sup>4</sup> sind die derzeit im klinischen Einsatz befindlichen Biomaterialien durch eine unzureichende biologische Aktivität und/oder biomechanische Langzeitstabilität gekennzeichnet. Demgegenüber zielen nichtoperative Behandlungskonzepte überwiegend auf eine symptomatische Therapie.

Überschreiten die knöchernen Substanzdefekte jedoch eine kritische Größe (*Critical Size Defect*, CSD), die für lange Röhrenknochen bei ca. fünf bis zehn Prozent ihrer longitudinalen Länge liegt, so führen auch die angeführten Behandlungskonzepte in der Regel zu bleibenden Schäden und Funktionsverlusten und damit nicht zum gewünschten Erfolg. Die Gründe hierfür liegen insbesondere in den limitierten Ressourcen von geeigneten Knochenersatzmaterialien und deren geringer biologischer Aktivität bei steigendem Bedarf.

In den 1970er und 80er Jahren wurden mesenchymale Progenitorzellen aus dem Knochenmark isoliert, die unter geeigneten *In-vitro*-Kulturbedingungen osteoblastär differenzierten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Zellpopulation eine Multipotenz besitzt, wodurch unter geeigneten Kulturbedingungen die Differenzierung in andere mesenchymale Zellreihen möglich ist (Abb. 1). Während der 1990er Jahre wurden diese Techniken weiterentwickelt und standardisiert, so dass eine erste klinische Anwendung von mesenchymalen Stammzellen für Knochendefekte, die über eine Spongiosatransplantation hinausgeht, zukünftig eine mögliche Therapieoption darstellt. Seit wenigen Jahren gelingt auch die Isolation von mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Nabelschnurblut. Da diese Zellpopulation ein hohes *In-vitro*-Regenerationspotential zeigte, besteht Hoffnung für einen zukünftigen therapeutischen Einsatz am Bewegungsapparat.<sup>5</sup>

---

<sup>4</sup> Vgl. Gerngross *et al.* (1982).

<sup>5</sup> Vgl. Noort *et al.* (2002), Campagnoli *et al.* (2001) und Rosada (2002).

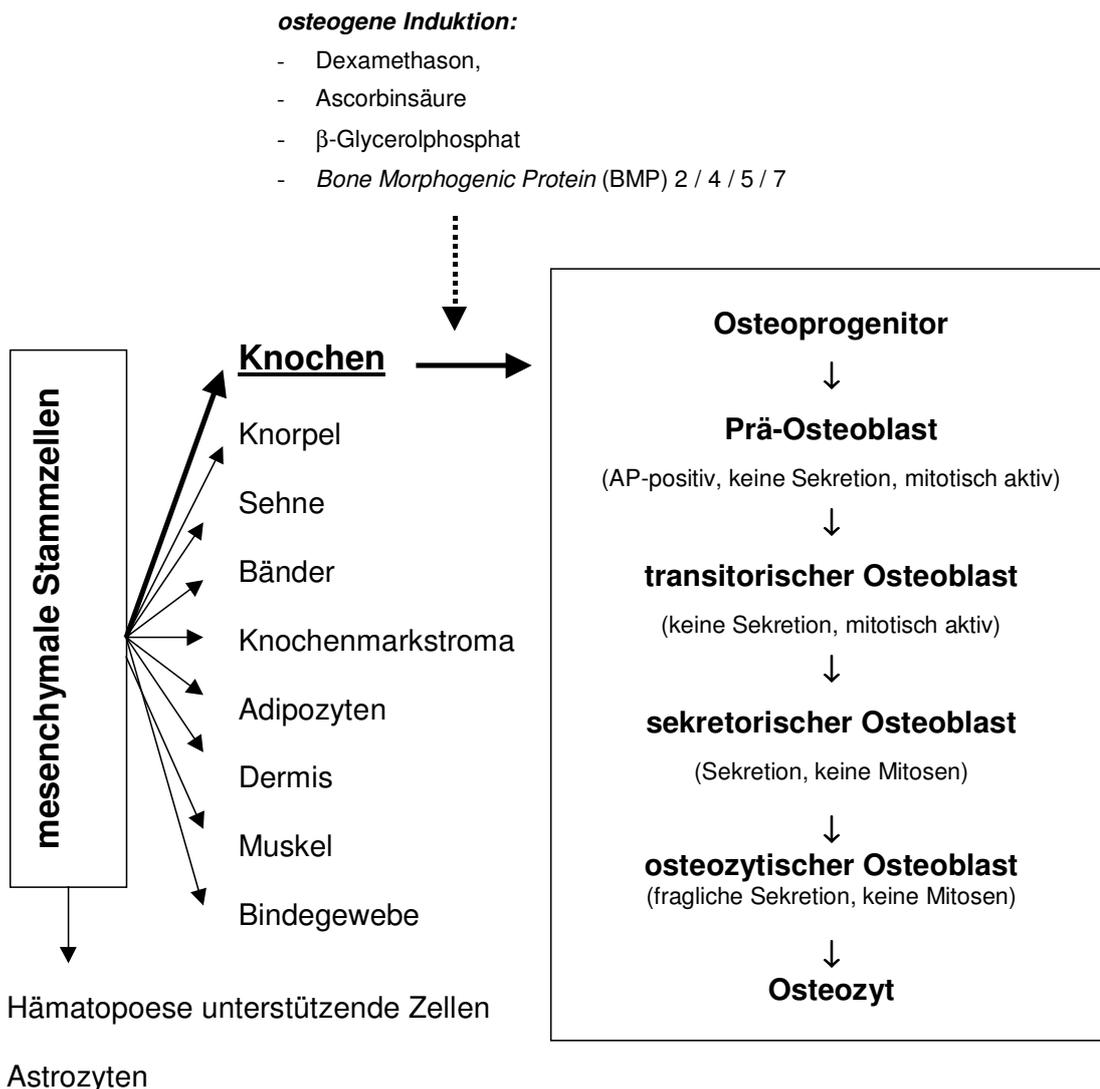


Abb. 1: Differenzierungspotential und schematische Darstellung der osteogenen Differenzierung aus mesenchymalen Knochenmark-Progenitorzellen *in vitro*; modifiziert nach Caplan (1991), Gretchen (2000) und Bahamonde und Lyons (2001).

## Die mesenchymale Stammzelle: Adulte (Knochenmark) versus frühkindliche (Nabelschnurblut) versus embryonale (Somitenmesoderm) Stammzelle

Für eine zukünftige Stammzelltherapie werden derzeit insbesondere drei verschiedene Ursprungsgewebe und die davon abgeleiteten Zellpopulationen diskutiert:

1. Mesenchymale Stammzellen aus dem adulten Knochenmark werden in der Literatur als so genannte *mesenchymal stem cell* (MSC) beschrieben: Die Hypothese von nicht hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark wurde bereits 1897 von dem deutschen Pathologen Cohnheim aufgestellt.<sup>6</sup> Die ersten Vorarbeiten zur Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMCS) gehen auf Friedenstein in den 70er Jahren

<sup>6</sup> Vgl. Cohnheim (1988).

des letzten Jahrhunderts zurück.<sup>7</sup> In den 80er Jahren kamen zahlreiche Arbeitsgruppen, z. B. von Owen<sup>8</sup>, Cheng<sup>9</sup>, Caplan<sup>10</sup> und Rickard<sup>11</sup>, hinzu. Die Gemeinsamkeit der genannten Arbeitsgruppen liegt in der Hypothese der Existenz von multipotenten hMSC, die sich in Osteoblasten, Chondroblasten, Myoblasten und Adipoblasten differenzieren können.

2. Aufgrund des hohen Regenerationspotentials wurde für die frühkindliche Stammzelle aus Nabelschnurblut die Bezeichnung „unrestringierte somatische Stammzelle“ (*unrestringated somatic stem cell*, USSC) gewählt: Im Gegensatz zu osteoblastären Progenitorzellen aus dem Knochenmark fanden sich erst Anfang dieses Jahrhunderts erste Hinweise auf ein osteoblastäres Regenerationspotential aus Nabelschnurblutzellen.<sup>12</sup> Diese Zellpopulation scheint insbesondere aufgrund ihres niedrigen Differenzierungsgrades vielversprechend für eine zukünftige therapeutische allogene Zelltransplantation.
3. Embryonale mesenchymale Stammzellen (ESC) sind für eine humane Anwendung ethisch umstritten.<sup>13</sup> Bezüglich der Herkunft von humanen mesenchymalen Progenitorzellen innerhalb der embryonalen Entwicklung wird davon ausgegangen, dass diese aus dem Somitenmesoderm des Achsenskelettes sowie dem lateralen Mesoderm des Extremitätenskelettes stammen<sup>14</sup> und nach zellulärer Aggregation chondrogenetisch und osteogenetisch differenzieren. Hierbei spielen neben den direkten zellulären Interaktionen zahlreiche lokale Faktoren eine wichtige Rolle. Zu diesen gehören die *Transforming Growth Factor* (TGF $\beta$ )-Familie, *Bone Morphogenic Protein* (BMP)-2 und -4 sowie *Sonic Hedgehog* (SHH), *Fibroblastic Growth Factor* (FGF)-2 und Wnt-7a.<sup>15</sup>

Die zellbiologische Arbeitsgruppe der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) untersucht wissenschaftliche Fragestellungen zur Zelldifferenzierung, zur Entwicklung von Stammzellregeneraten für Knochendefekte und zur Biokompatibilitätstestung orthopädischer Implantate. Hierbei werden sowohl MSC als auch USSC Zellkultursysteme eingesetzt. Durch Modifizierung der Kulturbedingungen ist es gelungen, aus den genannten Ausgangszellpopulationen eine *In-vitro*-Differenzierung in osteoblastäre, chondrozytäre und adipozytäre Zellen zu induzieren (Abb. 2). Während die Regeneration von Knorpelgewebe derzeit noch mit zahlreichen Problemen behaftet ist (dreidimensionales Wachstum, Stabilität in der Kollagenexpression), konnte eine dreidimensionale *In-vitro*-Kalzifizierung im Rahmen der osteoblastären Differenzierung für beide Progenitorzelltypen (MSC, USSC) gezeigt werden. Als charakteristische Marker für den differenzierten Osteoblasten werden die Oberflächenproteine Osteocalcin (OC), Osteopontin (PO), Osteonektin (ON) sowie Kollagen Typ I und Alkalische Phosphatase nachgewiesen. Demgegenüber wurde ein fehlender Nachweis dieser Marker bei gleichzeitiger

<sup>7</sup> Vgl. Friedenstein *et al.* (1976).

<sup>8</sup> Vgl. Owen und Friedenstein (1988).

<sup>9</sup> Vgl. Cheng *et al.* (1994).

<sup>10</sup> Vgl. Caplan (1991).

<sup>11</sup> Vgl. Rickard *et al.* (1996).

<sup>12</sup> Vgl. Campagnoli *et al.* (2001).

<sup>13</sup> Vgl. Hoffmann und Gross (2001).

<sup>14</sup> Vgl. Erlenbacher *et al.* (1995).

<sup>15</sup> Vgl. Letamendia *et al.* (2001) und Wallin *et al.* (1994).

Negativität gegenüber CD34, einer Positivität für CD13 und CD105 und morphologisch fibroblastoidem Aussehen (Monolayerkultur) als Kriterium für die Definition als mesenchymale Progenitorzelle herangezogen.

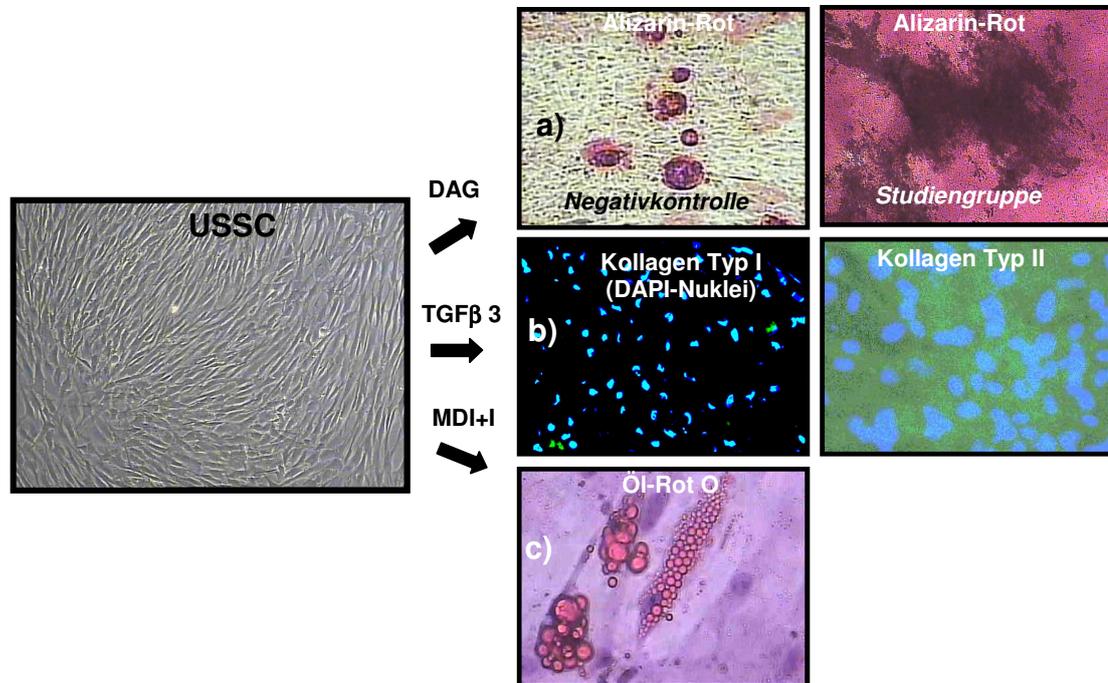


Abb. 2: USSC nach Stimulation mit verschiedenen gewebespezifischen Stimuli. Die immunochemischen Färbungen zeigen eine osteoblastäre (a), chondrozytäre (b) and adipozytäre (c) Differenzierung. Diese Ergebnisse werden durch Ergebnisse zur Proteinexpression und -kinetik bestätigt (RT-PCR).

a) Im Gegensatz zur Kontrollgruppe findet sich reichlich kalzifizierte perizelluläre Matrix nach osteoblastärer Differenzierung in der Alizarin-Rot-Färbung.

b) Nach chondrogener Stimulierung zeigt die DAPI-Färbung normale phenotypische Nuklei mit einer hellen, homogenen Leuchtreaktion bei Abwesenheit von Kollagen I. Nach chondrogener Stimulation zeigt die extrazelluläre Matrix (ECM) einen hohen Kollagen II-Gehalt.

c) Nach adipogener Differenzierung finden sich intrazelluläre Fettvakuolen (rot). DAG: Dexamethason, Ascorbinacid, Glycerolphosphat. TGF: *Transforming Growth Factor*. MDI+I: Methylisobutylxanthine, Dexamethasone, Insulin + Indomethacin. DAPI: 4'-6-Diamidino-2-phenylindole.

## ***Tissue Engineering bei Knochendefekten***

Die Bedeutung von Stammzellen aus dem Knochenmark als *In-vitro*-Screeningverfahren für die Biokompatibilitätstestung orthopädischer Implantate konnte in der Vergangenheit in verschiedenen Studien gezeigt werden.<sup>16</sup>

Um einen lokotypischen, ossären Gewebeersatz aus Stammzellen im Sinne eines therapeutischen *tissue engineering* zu erzielen, ist der verwendete Zellcarrier (Biomatrix) von

<sup>16</sup> Vgl. Wilke *et al.* (1999), Wilke *et al.* (2001a), (2001b), Wilke *et al.* (2002a), Wilke *et al.* (2002b) und Wilke *et al.* (2002c), Jäger *et al.* (2002a), Jäger *et al.* (2002b), (2002c) und Jäger und Wilke (2003).

entscheidender Bedeutung, da dieser sowohl die Vitalität und Differenzierung als auch die zytoarchitektonische Ausrichtung des Regenerates mitbestimmt. Die wichtigsten Werkstoffparameter, die die genannten Prozesse beeinflussen, sind:

- die chemiko-physikalischen Oberflächeneigenschaften (Porosität, Oberflächenspannung, Hydrophilie, etc.),
- das *In-vitro*-/*In-situ*-Resorptionsverhalten sowie
- die biomechanischen Qualitäten des Werkstoffs.

Für Osteoblastenregenerate werden derzeit insbesondere resorbierbare Werkstoffe, wie z. B. Kollagene oder Keramiken, als Trägermatrices eingesetzt. Unsere Arbeitsgruppe untersucht derzeit die Wirkungen verschiedener polymerer (Polylaktide, Polytetrafluorethylen, Kollagene. . .) metallischer (CroCoMb, Titan und Titanlegierungen) und keramischer Carrier (Tricalciumphosphat (TCP), Hydroxylapatit. . .) anhand von humanen MSC- und USSC-Zellkulturen und arbeitet an der Optimierung deren Oberflächenstruktur, um die zelluläre Adhärenz zu steigern. Erste positive Erfahrungen wurden bereits mit einem porcinem Kollagen I/III-Trägermaterial gemacht, das sowohl ein dreidimensionales Zellwachstum und eine osteoblastäre Differenzierung zulässt als auch eine *In-vitro*-Kalzifizierung ermöglicht (Abb. 3).

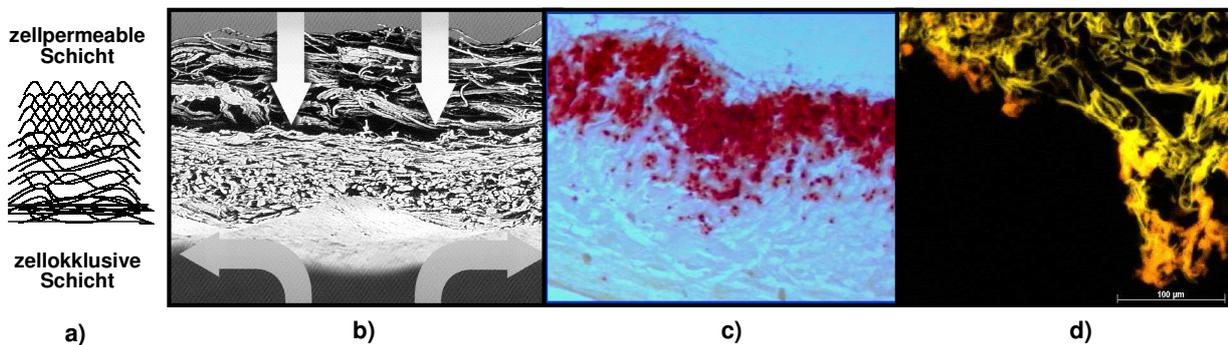


Abb. 3: a) Schematische und  
 b) makroskopische Struktur eines semipermeablen Kollagen I/III-Zell-Trägers (BioGide<sup>®</sup>). Die Oberfläche (senkrechte Pfeile) zeigt einen hohen Porositätsgrad, wohingegen die Unterseite zellokklusiv ist.  
 c) 40 Tage nach Kultivierung mit einer mononukleären Knochenmarkzellkultur und osteogener (DAG)-Stimulation finden sich in den zellbesiedelten Arealen des Kollagenträgers Kalzifizierungen (Alizarin-Rot-Färbung).  
 d) Auch in der Nabelschnurblutkultur finden sich oberflächlich gelegene Kalzifizierungen (rötliche Bereiche) als Nachweis einer Kalzifizierung im Fluoreszenzmikroskop.

## Einfluss von *In-vitro*-Kulturbedingungen auf das Wachstum mesenchymaler Stammzellen aus dem Nabelschnurblut und Knochenmark

Da die lokalen Kulturbedingungen wie pH-Wert, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Partialdruck, Temperatur und Kulturmediumbestandteile wesentlich zelluläre Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflussen, führte unsere Arbeitsgruppe eine vergleichende Studie zum Verhalten

von MSC und USSC unter Zugabe verschiedener kommerzieller Zellkulturnährmedien durch. Hierbei konnten signifikante Unterschiede in Bezug auf die Förderung einer osteoblastären Differenzierung in Abhängigkeit des verwendeten Zellkultursystems aufgezeigt werden. Nach unseren Ergebnissen eignet sich für die Kultivierung von MSC insbesondere MesenCult<sup>®</sup>, während für USSC das pyruvathaltige low-glucose DMEM Medium signifikante Vorteile bei der Differenzierung von osteoblastären Zellen zeigte.<sup>17</sup> Des Weiteren ist auch die lokale Zelldichte von entscheidender Bedeutung für die Vitalität und osteoblastäre Differenzierungspotenz eines Zellkultursystems für mesenchymale Progenitorzellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte für das USSC-Zellsystem niedrigere Toleranzwerte im Vergleich zu MSC aufzeigen (Abb. 4).

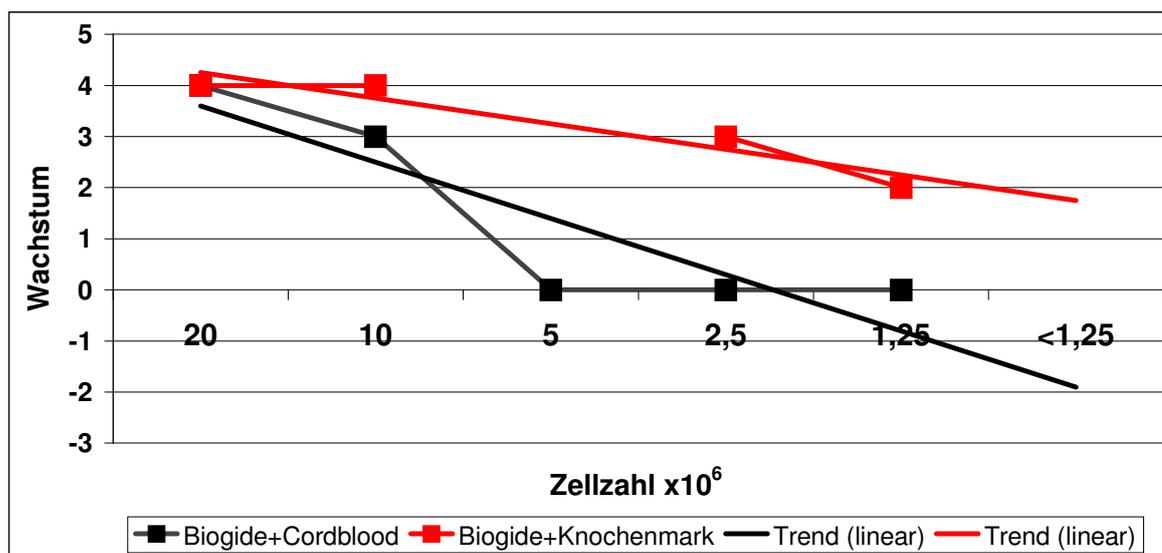


Abb. 4: Darstellung der Abhängigkeit von lokaler Zelldichte und Wachstum an alkalischer-phosphatase-positiven Knochenmarkzellen 40 d *in vitro* nach DAG-Stimulation mittels eines eigens entwickelten Score-Systems: 0 = kein Wachstum; 1 = zelluläres Wachstum; 2 = Nachweis von *bone nodules*, alkalische Phosphatase (ALP)+, OC+, OP+, ON+; 3 = Nachweis von einzelnen Kalzifizierungszentren, ALP+, OC+, OP+, ON+; 4 = deutlicher Nachweis von ALP sowie kalzifizierenden *bone nodules*. Nabelschnurblutzellen zeigen geringere Toleranzwerte in Bezug auf die zur osteoblastären Differenzierung erforderliche minimale Zelldichte der Ausgangskultur.

## Etablierung eines Kleinterversuchsmodells: Der kritische Knochendefekt (CSD) am Rattenfemur

Bisher findet sich in der Literatur kein Hinweis auf ein Kleintiermodell, das sich für Untersuchungen von xenotransplantierten mesenchymalen Stammzellen eignen würde. Daher wurde mit dessen Entwicklung begonnen, nachdem die *In-vitro*- Kultivierungsbedingungen von MSC und USSC weitgehend standardisiert und definiert waren. Primäres Ziel war hierbei, Möglichkeiten für die Untersuchung von Effekten einer Xenotransplantation von humanen Progenitorzellen aus dem Knochenmark und Nabelschnurblut in Be-

<sup>17</sup> Jäger *et al.* (2003).

zug auf Immunogenitäts- und Differenzierungsvorgänge zu erarbeiten. In einem Vorversuch wurde zunächst eine vergleichende radiomorphometrische Analyse von Rattenfemora zweier Spezies durchgeführt (Sprague Dawley *versus* Wistar-Ratte). Hierbei zeigten sich Vorteile für das Modell Wistar-Ratte. Anschließend wurde eigens ein *Mini-Fixateur externe* zur Überbrückung eines kritischen Knochendefektes (CSD) von  $\geq 3,5$  mm entwickelt und dieser zur Stabilisierung des Rattenfemurs eingesetzt. Präoperativ wurden humane Progenitorzellen aus dem Knochenmark und Nabelschnurblut zunächst auf einem Kollagen I/III-Träger kultiviert, bis eine ausreichende zelluläre Adhärenz gewährleistet war (Adhärenzermittlung anhand von Standardkurven in Abhängigkeit von der Zellzahl). Anschließend wurde das Zell-Biomaterial-Komposit in den CSD der Wistar-Ratte implantiert und fixiert. Erste Hinweise für ein Überleben einzelner USSC fand die orthopädische Arbeitsgruppe 14 Tage nach der Xenotransplantation. Die humanen Zellen waren zuvor mit dem fluoreszierenden pkh26-Antikörper markiert worden. Weitere Experimente an athymen rhnu-Ratten werden derzeit durchgeführt.

## Heterotope, autologe Zelltherapie durch Knochenmarkzellen

Anhand zweier klinischer Studien konnte die Effektivität einer heterotopen, autologen Zelltherapie demonstriert werden.

Zum einen handelte es sich um Patienten mit aneurysmatischen Knochenzysten, deren Rezidivrate auch bei operativer Therapie in der Literatur mit ca. 20 bis 40 Prozent innerhalb von zwei Jahren angegeben wird.<sup>18</sup> Zum anderen wurden Patienten mit Wirbelsäulendeformitäten im Rahmen einer dorsalen Spondylodese therapiert.

Durch eine intraoperative Vakuum-Jamshidi-Punktion des dorsalen Beckenkamms wurde ein Zellaspirat gewonnen, das einem Biomaterial (TCP, demineralisierte Knochenmatrix) zugesetzt wurde. Dieses Biomaterial-Zellkomposit wurde anschließend in die knöchernen Defektzone (Knochenzyste) eingebracht oder entsprechend im Falle der Wirbelsäulenkorrekturoperation dorsal angelagert (Abb. 5). Die Auswertung erfolgte anhand klinischer und radiomorphologischer Parameter. Von zwölf Patienten mit aneurysmatischen Knochenzysten (Durchschnittsalter: 10,25 Jahre, Standardabweichung: 3,9), die mit einer autologen Knochenmarkzelltherapie therapiert wurden, lag die Rezidivrate bei einem *Follow-Up* von durchschnittlich 20,5 Monaten (Standardabweichung: 5,6) bei 25,0 Prozent. Alle Rezidive fanden sich bei der Verwendung von demineralisierter Knochenmatrix (Grafton®), während sich bei Patienten, die Tricalciumphosphat als Zellcarrier erhielten, bisher keine Rezidive gezeigt haben.

Die Abbildung 6 zeigt beispielhaft den radiologischen Verlauf eines 13 Jahre alten Patienten mit einer aneurysmatischen Knochenzyste des proximalen Humerus vor und nach einer Knochenmarktransplantation. Im Falle der Spondylodese hat sich im Nachuntersuchungszeitraum von zwei Jahren bisher keine Pseudarthrose gezeigt.

---

<sup>18</sup> Vgl. Schulte *et al.* (2000), Schiller *et al.* (1989) und Ramirez und Stanton (2002).

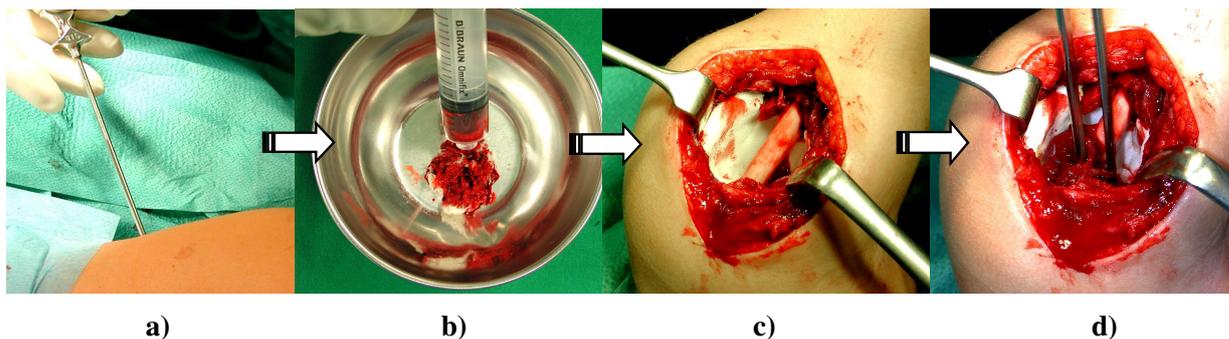


Abb. 5: Intraoperative Vorbereitung des Knochenmarkzell-Biomaterial-Komposits. Nach Jamshidi-Vakuum-Aspiration (a) aus dem Beckenkamm wird das Aspirat mit einer Biomatrix (z. B. demineralisierte Knochenmatrix, Tricalciumphosphat (TCP), Kollagen) manuell vermischt (b) und anschließend in den knöchernen Substanzdefekt implantiert (c, d).

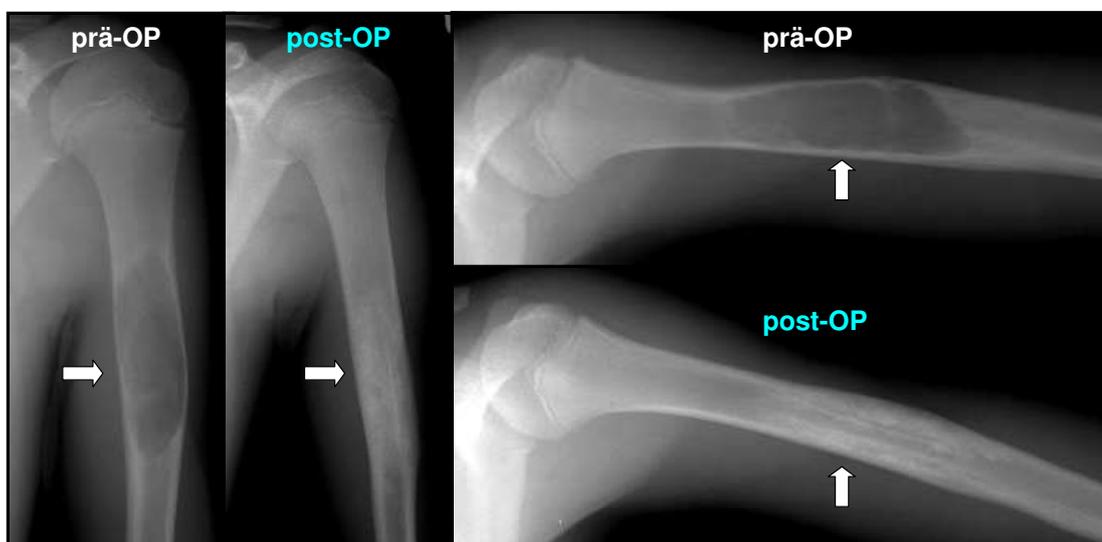


Abb. 6: Prä- und postoperative Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen des Humerus eines 13 Jahre alten Patienten mit aneurysmatischer Knochenzyste (Pfeile) nach autologer, heterotoper Knochenmarkzelltransplantation. Als Biomaterial wurde TCP verwendet. Ein autologes Fibulatransplantat diente zur primären Stabilisierung. Zwölf Monate nach dem Eingriff zeigte sich eine remodellierte, normale Kortikalisdicke mit signifikanter Knochenneubildung im Bereich des ossären Substanzdefektes.

## Grenzen, Möglichkeiten und Perspektiven einer zukünftigen Stammzelltherapie bei knöchernen Substanzdefekten

Obwohl die aktuellen Ergebnisse wissenschaftlicher Untersuchungen Grund zur Hoffnung für eine zukünftige Stammzelltherapie am Bewegungsapparat geben, kann eine heterologe Zelltransplantation derzeit nur nach HLA-Identität (*Human Leucocyte Antigene*) im Rahmen von klinischen Studien empfohlen werden. Insbesondere die derzeit bestehenden Fragen zur Immunogenität und Abstoßung sowie die biologische Sicherheit gegenüber einer neoplastischen Entdifferenzierung der transplantierten Zellen und die Gefahr viraler Infektionen verhindern derzeit noch eine breite Anwendung von Stammzelltherapeutika.

Obwohl die osteogenetische Potenz von Stammzellen aus dem Knochenmark und aus Nabelschnurblut sowie aus dem embryonalen Gewebe in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde, sind die komplexen molekularen Mechanismen der zellulären Differenzierung in weiten Bereichen noch unbekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Neben dem Ursprungsgewebe und den Spendereigenschaften beeinflussen lokale Signalproteine, zelluläre Adhärenzmechanismen, die lokale Zelldichte und die Kultivierungsbedingungen die weiteren Differenzierungsprozesse *in vitro* und *in vivo*.

**Danksagung:** Die Autoren bedanken sich bei folgenden Personen, die sie bei der Entwicklung und Durchführung des orthopädischen Stammzellprojekts unterstützt und zu dessen Gelingen beigetragen haben.

Frau Dr. med. vet. Annemarie Treiber – Leiterin der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Frau Sabine Lensing-Höhn – Leitende Medizinisch-Technische Assistentin, Orthopädisches Forschungslabor, Orthopädische Universitätsklinik am UKD

Frau PD Dr. rer. nat. Gesine Kögler – Institut für Zelltherapie und Transplantationsdiagnostik/Nabelschnurblutbank am UKD

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Peter Wernet – Direktor des Instituts für Zelltherapie und Transplantationsdiagnostik am UKD

Herrn Dr. med. vet. Martin Sager – stellvertretender Leiter der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Herrn Dr. rer. nat. Andreas Knipper – Kourion Therapeutics AG/ehem. Institut für Zelltherapie und Transplantationsdiagnostik

Herrn Özer Digestirici – Kourion Therapeutics AG/ehem. Institut für Zelltherapie und Transplantationsdiagnostik

Frau Iris Schrey – Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

## Bibliographie

BAHAMONDE, E.M. und K.M. LYONS. „BMP3: To be or not to be a BMP“, *Journal of Bone and Joint Surgery* 83-A (2001), 1-62.

BRUNDTLAND, G. H. *Eröffnungsrede zur Bone and Joint Decade am 13. Januar 2000 in Genf*. Genf 2000.

CAMPAGNOLI, C., I.A. ROBERTS, S. KUMAR, P.R. BENNETT, I. BELLANTUONO und N.M. FISK. „Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow“, *Blood* 98(8) (2001), 2396-2402.

CAPLAN, A.I. „Mesenchymal stem cells“, *Journal of Orthopaedic Research* 9 (1991), 641-650.

CHENG, S.L., J.W. YANG, L. RIFAS, S.F. ZHANG und L. V. AVIOLI. „Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone“, *Endocrinology* 134 (1994), 277-286.

COHNHEIM J. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologische Klinische Medizin* 40 (1867), 1. In: WOHLRAB F. und U. HENNOCH. „The life and work of Carl Weigert (1845-1904) in Leipzig 1878-1885“, *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie* 134(8) (1988), 743-751.

- DREINHÖFER, K. „Bone and Joint Decade 2000-2010: Prävention und Management effizienter gestalten“, *Deutsches Ärzteblatt* 97 (51-52) (2000), 3478.
- ERLENBACHER, A., E. H. FILVAROFF, S. E. GITELMAN und R. DERYNCK. „Roward a molecular understanding of skeletal development“, *Cell* 80 (1995), 371-378.
- FELSENBERG, D., E., WIELAND, C. HAMMERMEISTER, G. ARMBRECHT, W. GOWIN und H. RASPE. „Prävalenz der vertebrealen Wirbelkörperdeformationen bei Frauen und Männern in Deutschland“, *Medizinische Klinik* 93, Suppl. II (1998), 31-34.
- FRIEDENSTEIN, A. J., U. GORSKAJA und N. N. KULAGINA. „Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs“, *Experimental Hematology* 4(5) (1976), 267-274.
- GERNGROSS, H., C. BURRI, L. KINZL, J. MERK und G. W. MÜLLER. „Komplikationen an der Entnahmestelle autologer Spongiosatransplantate“, *Aktuelle Traumatologie* 3 (1982), 146.
- GRETCHEN, V. „Can old cells learn new tricks?“ *Science* 287 (2000), 1418-1419.
- HOFFMANN, A. und G. GROSS. „BMP signaling pathways in cartilage and bone formation“, *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 11(1-3) (2001), 23-45.
- JÄGER, M., A. WERNER, A. WILD, M. FUSS und R. KRAUSPE. „Vorteile von Biomatrices bei der Chondrogenese aus Pluripotenten Mesenchymalen Stammzellen“, *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 140(6) (2002a), 681-689.
- JÄGER, M., A. WILD und R. KRAUSPE. „Pluripotente Mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (I): Grundlagen. [Pluripotent Mesenchymal Stem Cells and Osteogenesis (I): The Basics]“, *Osteologie* 11(2) (2002b), 55-66.
- JÄGER, M., A. WILD und R. KRAUSPE. „Pluripotente Mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (II): Biomaterialien und klinische Anwendung. [Pluripotent Mesenchymal Stem Cells and Osteogenesis (II): Biomaterials and clinical application]“, *Osteologie* 11(2) (2002c), 78-87.
- JÄGER, M., A. WILD, S. LENSING-HÖHN und R. KRAUSPE. „Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells“, *Biomedizinische Technik* 48(9) (2003), 241-244.
- JÄGER, M. und A. WILKE. „Comprehensive Biocompatibility Testing of a New PMMA Bone Cement versus conventional PMMA Cement *in vitro*“, *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition* 2003, im Druck.
- LETAMENDIA, A., E. LABBE und L. ATTISANO. „Transcriptional Regulation by Smads: Crosstalk between the TGF- $\beta$  and Wnt Pathways“, *Journal of Bone and Joint Surgery* 83-A, Suppl. 1 (2001), 1-39.
- NOORT, W. A., A. B. KRUISSELBRINK, P. S. IN'T ANKER, M. KRUGER, R. L. VAN BEZOOIJEN, R. A. DE PAUS, M. H. HEEMSKERK, C. W. LOWIK, J. H. FALKENBURG, R. WILLEMZE und W. E. FIBBE. „Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice“, *Experimental Hematology* 30(8) (2002), 870-878.
- OWEN, M. und A. J. FRIEDENSTEIN. „Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors“, in: D. EVERED und S. HARNETT (Hrsg.). *Cell and Molecular Biology of Vertebrae hard tissue*. Chichester 1988, 42-60.
- RAMIREZ, A. R. und R. P. STANTON. „Aneurysmal bone cyst in 29 children“, *Journal of Pediatric Orthopaedics* 22(4) (2002), 533-539.
- RICKARD, D. J., M. KASSEM; T. E. HEFFERAN, G. SARKAR, T. C. SPELSBERG und B. L. RIGGS. „Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow“, *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (1996), 312-324.

- ROSADA, C., J. JUSTESEN, D. MELSVIK, P. EBBESEN und M. KASSEM. „The Human Umbilical Cord Blood: A Potential Source for Osteoblast Progenitor Cells“, *Calcified Tissue International* 2 (2002), 135-142.
- SCHILLER, C., P. RIRSCHL, R. WINDHAGER, D. KROPEJ und R. KOTZ. „The incidence of recurrence in phenol treated and non-phenol treated bone cavities following intralesional resection of non-malignant bone tumor“, *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 127(4) (1989), 398-401.
- SCHULTE, M., M. R. SARKAR, A. VON BAER, M. SCHULTHEISS, G. SUGER und E. HARTWIG. „Therapy of aneurysmal bone cyst“, *Unfallchirurg* 103(2) (2000), 115-121.
- „The Bone and Joint Decade 2000-2010 for prevention and treatment of musculo-skeletal disorders“, *Acta Orthop Scand.* 69(3), Suppl. 281 (1998), 65-86.
- WALLIN, J., J. WILTING, H. KOSEKI, R. FRITSCH, B. CHRIST und R. BALLING. „The role of Pax-1 in axial skeleton development“, *Development* 120 (1994), 1109-1121.
- WILKE, A., M. JÄGER und D. B. JONES. „Vergleichende Biokompatibilitätstestung von Osteopal HA<sup>®</sup> und Palacos R<sup>®</sup> mit Hilfe einer humanen Knochenmarkszellkultur“, *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 137-S (1999), A66.
- WILKE, A., M. JÄGER, F. TRAUB, F. WANNER und R. P. FRANKE. „Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe *in vitro*. Eine kritische Literaturübersicht. – Teil I: Methodik. [*In vitro* biocompatibility testing of orthopaedic implants. A critical review of literature. Part I: Methods]“, *Osteologie* 4 (2001a), 217-224.
- WILKE, A. M. JÄGER, F. TRAUB, F. WANNER und R. P. FRANKE. „Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe *in vitro*. Eine kritische Literaturübersicht. – Teil II: Polymere. [*In vitro* biocompatibility testing of orthopaedic implants. A critical review of literature. Part II: Polymers]“, *Osteologie* 4 (2001b), 225-249.
- WILKE, A., F. TRAUB, F. WANNER, R.P. FRANKE und M. JÄGER. „Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe *in vitro*. Eine kritische Literaturübersicht. – Teil III: Keramiken“, *Osteologie* 11(3) (2002a), 178-203.
- WILKE, A., M. JÄGER, S. ENDRES, M. LANDGRAFF, A. KIESSLING, M. PFEIFFER und P. GRISS. „Comprehensive Biocompatibility Testing of a New Semirigid Spine-Implant *In Vitro*“, *European Journal of Trauma* 5 (2002b), 279-294.
- WILKE, A., F. TRAUB, M. WILKE, F. WANNER, S. ENDRESS und M. JÄGER. „Biokompatibilitätstestung orthopädischer Werkstoffe *in vitro*. Eine kritische Literaturübersicht. – Teil IV: Metalle“, *Osteologie* II(4) (2002c), 241-265.