

Marion Elisabeth Seebach

Dr. sc. hum.

Einfluss mesenchymaler Stromazellen auf die Knochenregeneration und das Risiko einer Osteomyelitis

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

Nicht-heilende Knochendefekte führen zu einer massiven Einschränkung in der Lebensqualität betroffener Patienten und beinhalten bedingt durch langandauernde osteosynthetische Stabilisierung und wiederholte Operationen ein erhöhtes Risiko für Knocheninfektionen. Eine zeitnahe Ausheilung dieser Knochendefekte ist daher von großem Interesse. Die Behandlung mit mesenchymalen Stromazellen (MSC) in geeigneten Trägern hat sich dabei als ein vielversprechender Ansatz herausgestellt. Initiale Konzepte der Stimulation der Knochenheilung durch MSC gehen dabei von einem direkten Beitrag der Zellen zum neu gebildeten Knochen durch Differenzierung zu Osteoblasten aus. Neben ihrem osteogenen Potential besitzen MSC jedoch auch parakrine Eigenschaften, die entscheidend für die Stimulation der Knochenheilung sein könnten aber auch gerade im Hinblick auf eine mögliche Immunsuppression das Risiko von Knocheninfektionen beeinflussen könnten. Um optimale neue MSC-basierte Therapiestrategien entwickeln und einen sicheren Einsatz gewährleisten zu können, ist es von großer Bedeutung die Rolle implantierter MSC während der Knochenheilung und einen möglichen Einfluss dieser Zellen auf Knocheninfektionen beurteilen zu können. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, einerseits die Wirkung von in einen Knochendefekt implantierten MSC auf Wirtszelleinwanderung, Angiogenese und Immunsuppression sowie den Verbleib der Zellen aufzuklären, und andererseits den Einfluss dieser Zellen auf eine Knocheninfektion zu untersuchen.

Zur Beurteilung der Wirkung implantierter MSC auf die frühe Knochenheilung wurde in weiblichen Ratten ein Platten-stabilisierter Knochendefekt im rechten Femur gesetzt und MSC aus männlichen Ratten in Fibrinhydrogel bzw. zellfreies Fibrinhydrogel in den Defekt implantiert. Die Analyse erfolgte nach 3, 6, 14 und 28 Tagen mittels Histologie, quantitativer PCR und Nachweis des Y-Chromosoms. Zur Untersuchung des Einflusses implantierter MSC auf eine Osteomyelitis wurde ein Platten-stabilisierte Femurdefekt in männlichen Ratten nur mit Fibrinhydrogel, mit in Fibrinhydrogel immobilisierten Staphylokokkus aureus (SA) oder mit SA und MSC in Fibrinhydrogel behandelt. Die Analyse erfolgte nach 3 und 4 Wochen mittels Blutparameter, Osteomyelitis-Scoring, 3D μ CT-Analyse und Histologie. Zusätzlich wurden Kokulturen von humanen MSC mit SA angesetzt.

Die implantierten MSC führten zu einer signifikant gesteigerten Einwanderung von Makrophagen und Endothelzellen in das Fibrinhydrogel, mit der Ausbildung einer von proximal nach distal durch das Implantat vordringenden, zellreichen Migrationsfront. Die Endothelzellen bildeten dabei bereits primitive Gefäßstrukturen in Richtung des besiedelten

Implantats. M1 Makrophagen dominierten entlang der Zellfront, während M2 Makrophagen nur in dem am weitesten entwickelten Tier gefunden wurden. VEGF mRNA Spiegel waren in der MSC Gruppe signifikant erhöht. Die Expression von IL-1beta, TNF-alpha und IL-10 pro Immunzelle war nicht signifikant verändert. Die männlichen MSC wurden bis Tag 14, jedoch nicht mehr an Tag 28 nachgewiesen. Alle mit SA infizierten Tiere zeigten klare Anzeichen einer Osteomyelitis (erhöhte Blutneutrophile/-monozyten, Abszessbildung, Knochenzerstörung im Röntgenbild), welche nach Implantation von MSC signifikant stärker ausgeprägt waren. Die Zerstörung des Knochens wurde verstärkt im distalen Knochenende nachgewiesen. Die 3D μ CT-Analyse ergab, dass die Knocheninfektion zu einem quantifizierbaren Verlust des distalen Knochens führte. Weiterhin wurde ein „Aufquellen“ des eigentlich kompakten kortikalen Knochens durch die Infektion aufgezeigt, welches nach MSC Implantation signifikant fortgeschritten war. Die schwammartigen Veränderungen des infizierten Knochens wurden in der Histologie bestätigt. Weiterhin konnte die Osteomyelitis mit Abszessbildung, Osteoklasten, M1 Makrophagen, und SA-Akkumulation verbunden werden. Nach Kokultivierung mit SA regulierten MSC die Expression pro- und anti-inflammatorischer Immunmediatoren hoch.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass in Fibrinhydrogel implantierte MSC eine trophische und pro-angiogene Wirkung auf die frühe Phase der Knochenheilung haben und dadurch die Einwanderung von M1 Makrophagen und Endothelzellen, Implantatintegration, eine regenerativen Mikroumgebung und endogene Reparaturmechanismen stimulieren. Eine frühe lokale Immunsuppression sowie ein dauerhafter Einbau der MSC in das Regenerationsgewebe konnten in unserem Modell nicht nachgewiesen werden. Neben dem bisherigen Ansatz, das osteogene Potential dieser Zellen zu maximieren, sollten daher auch trophische und pro-angiogene Eigenschaften während der Expansion berücksichtigt werden. Die Implantation von MSC in einen kontaminierten Knochendefekt führte zu einer beschleunigt und verstärkt ablaufenden Osteomyelitis, was zumindest teilweise mit einer immunmodulierenden Wirkung der durch die Bakterien zusätzlich aktivierten MSC erklärt werden konnte.

Diese Arbeit wies einen stimulierenden Beitrag implantierter MSC auf endogene Regenerations-mechanismen während der frühen Knochenheilung nach, jedoch konnten auch erstmalig die Risiken einer durch MSC veränderten lokalen Mikro-Umgebung auf die Entstehung und den Verlauf von Knocheninfektionen aufgezeigt werden. Auch wenn weitere Studien zur Aufklärung der Mechanismen hinter dem negativen Einfluss implantierter MSC auf Knocheninfektionen folgen müssen, warnen diese Ergebnisse bereits jetzt vor möglichen Risiken dieser Zellen in potentiell kontaminierten Knochendefekten. Die lokale Aufrüstung der Hydrogelträger mit Antibiotika in Kombination mit einer systemischen Verabreichung beinhaltet die Chance, den negativen Effekt der implantierten MSC auf eine Osteomyelitis zu verhindern und deren stimulierende Wirkung wieder herzustellen. Bis alle diese Bedenken vollständig aufgeklärt sind, sollte jedoch nach unseren Ergebnissen ein Einsatz von MSC-basierten Strategien zur Stimulation der Knochenregeneration gerade in Patienten mit erhöhtem Infektionsrisiko sorgfältig erwogen und durch eine Antibiose begleitet werden.