

Benedict Lotz

Dr. med.

Eignung humaner Mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmark und Fettgewebe zur Stimulation der Knochenregeneration in immundefizienten Mäusen

Fach/Einrichtung: Orthopädie

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

Die Behandlung großer, nicht heilender Knochendefekte stellt die Medizin vor eine Herausforderung. Zu den Therapiemöglichkeiten zählen die autologe, homologe und xenogene Knochen transplantation sowie die Implantation von Knochenersatzstoffen. Diese Verfahren sind jedoch mit Problemen und Risiken wie z.B. einer begrenzten Verfügbarkeit, Abstoßungsreaktionen sowie allgemeinen OP-Risiken aufgrund der hohen Invasivität und einer langen Heilungsphase verbunden. Ein vielversprechender Ansatz ist hierbei die Verwendung multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSC), welche aus diversen Geweben, z.B. Fettgewebe und Knochenmark, isoliert werden können. Im Gegensatz zu den Knochenmark-Stromazellen (BMSC, bone marrow stromal cells) können Fettgewebe-Stromazellen (ASC, adipose tissue-derived stromal cells) sehr einfach und in größerer Anzahl isoliert werden. Untersuchungen in einem ektopen Modell konnten zeigen, dass ASC eine geringere Neigung zur Ausdifferenzierung in Knochen aufweisen als BMSC. ASC könnten somit überwiegend über ihre trophischen Eigenschaften zur Heilung beitragen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten BMSC und ASC Zellspezies wurden in vitro charakterisiert und bezüglich ihres Differenzierungspotentials sowie ihrer trophischen Eigenschaften vergleichend beurteilt. Anschließend wurde ein kraniales Defektmodell etabliert und BMSC mit ASC orthotop in einem standardisierten 4mm großen Defekt verglichen. Als Träger wurde eine mit β -TCP-Nanopartikeln und ggf. BMSC/ASC besiedelte zweilagige Kollagenmembran verwendet. Die Auswertung erfolgte sowohl über μ CT Analysen nach 4 und 8 Wochen, als auch histologisch nach 8 Wochen. Weiterhin wurde in vitro eine Strategie für eine Vorstimulation der MSC entwickelt, welche die Knochenheilung über eine verstärkte Synthese trophischer Faktoren fördern sollte.

Die in vitro Untersuchung der verwendeten Zellspezies bestätigte die höhere mittlere Proliferationsrate der ASC. Weiterhin konnte, entsprechend des linienspezifischen Primings bestätigt werden, dass ASC Vorteile in der adipogenen Differenzierung aufweisen, während BMSC besser osteogen differenzieren. Während der osteogenen Differenzierung wurde bei ASC nur eine geringe Expression der Osteoblasten-typischen Proteine OCN, ALP sowie IBSP beobachtet.

Für den in vivo Vergleich konnte das kraniale Defektmodell etabliert und ein biologisch abbaubarer, nanopartikelhaltiger Träger mit guten μ CT Eigenschaften entwickelt werden. Nur in der BMSC Gruppe zeigten sich sowohl in der μ CT Analyse als auch in der Histologie reproduzierbare größere solide Knochenareale. Sowohl in der ASC-, als auch der Kontrollgruppe wurden hingegen überwiegend β -TCP Aggregate gefunden, die zwischen der 4. und 8. Woche weder zunahmen noch eine osteogene Differenzierung zeigten. In der ASC-Gruppe zeigten zwei Spender (2/4), in der Kontrollgruppe nur ein Spender (1/3), histologisch bestätigte vereinzelte Knochenareale. Über in-situ-Hybridisierung wurde nachgewiesen, dass BMSC direkt durch Differenzierung in Osteoblasten/-zyten zum Aufbau des neuen Knochens

beitragen. Im Gegensatz hierzu wurde der Knochen in der ASC-Gruppe durch murine Zellen aufgebaut.

Um das geringere osteogene sowie angiogene Potential von ASC in vitro auszugleichen wurde eine in vitro Vorstimulation zur Synthese parakriner Faktoren gesucht. Sowohl BMSC als auch ASC synthetisierten in der frühen chondrogenen Differenzierungsphase verstärkt sowohl VEGF als auch PDGF, was eine Heilung fördern könnte. ASC zeigten zudem einen Anstieg von IL-6. Der Einfluss von IL-6 auf die Knochenheilung kann aufgrund seiner pleiotropen Wirkung nicht sicher abgeschätzt werden.

Die erhobenen Daten zeigen im direkten Vergleich, dass humane ASC im kranialen Defektmodell der Verwendung von humanen BMSC unterlegen sind. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die orthotope Knochenumgebung die zellautonomen Defizite humaner ASC in Kombination mit dem verwendeten Träger zur spontanen Osteogenese nicht ausgleichen konnte. Es ist daher eine geeignete Vorstimulation bzw. die Zugabe von Wachstumsfaktoren notwendig, um ASC auf ein vergleichbares Potential mit BMSC anzuheben und den klinischen Einsatz dieser, aus praktischen Gründen, attraktiven Zellquelle so zu etablieren.