

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow)

**Faktoren mit Einfluss auf die erfolgreiche Gewinnung mesenchymaler
Stromazellen aus dem humanen Knochenmark**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Josephine Schneider
geboren am 27.02.1990 in Sondershausen

Betreuer: PD Dr. med. Lutz P. Müller

Gutachter: 1. PD Dr. med. Lutz P. Müller
2. apl. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wienke
3. Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schmitt (Heidelberg)

12.07.2016

24.02.2017

REFERAT

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) sind Teil der Knochenmarknische, ihre funktionelle Rolle für die gesunde Hämatopoese und maligne hämatopoetische Neoplasien sowie ihr therapeutischer Nutzen sind Gegenstand aktueller Forschung. Bislang fehlen Studien mit hohen Fallzahlen um den Einfluss verschiedener probandenabhängiger Faktoren auf die Isolierbarkeit von MSC zu bewerten. Ziel dieser Arbeit war es, durch die retrospektive Analyse eines umfangreichen Datensatzes (N=328) Parameter zu ermitteln, welche die Präsenz von MSC im Knochenmark und damit auch deren Gewinnung negativ beeinflussen.

Es erfolgte zunächst die Isolierung der mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark mittels Dichtegradientenzentrifugation sowie die Kultivierung der Zellen nach standardisierten Verfahren. Die Endpunkte MSC-Präsenz, Anzahl MSC/ml KM, sowie die Expansionsdauer jeder Isolierung wurden dokumentiert und durch probandenbezogene Daten aus den Krankenakten ergänzt. Die statistische Auswertung erfolgte retrospektiv deskriptiv und mittels mehrfaktorieller univarianter Analyse, sowie im Allgemeinen Linearen Modell.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gewinnung von MSC aus dem KM beim Vorliegen bestimmter Einflussfaktoren signifikant erschwert ist.

Mit steigendem Alter der Probanden ließen sich MSC schlechter aus dem Knochenmark isolieren, dies deutet auf eine altersbedingte Schädigung der Knochenmarknische hin. Als Ausdruck einer möglichen hormonellen Regulation der Nische konnten bei Frauen seltener MSC gewonnen werden als bei Männern. Für die spezifische Prägung von MSC durch bestimmte Erkrankungen spricht die reduzierte Isolierbarkeit der Zellen bei Vorliegen von MDS oder AML. Die Behandlung mit Chemotherapie, vor allem aber eine erfolgte Stammzelltransplantation, insbesondere eine allogene Transplantation beeinflussten die Isolierbarkeit von MSC deutlich. Die schlechtere Gewinnung von MSC nach Transplantation lässt auf einen spezifischen Schädigungsmechanismus schließen.

Durch die analysierten Parameter kann die Auswahl der optimalen Spender-MSC anhand klar definierter Kriterien getroffen werden. Dies stellt die Grundlage zur Verbesserung der Ausgangsbedingungen bei der therapeutischen Anwendung von MSC dar. Den vorliegenden Ergebnissen nach zu urteilen, eignen sich vor allem allogene Ansätze mit jungen, gesunden Probanden.

Josephine Schneider: Faktoren mit Einfluss auf die erfolgreiche Gewinnung mesenchymaler Stromazellen aus dem humanen Knochenmark
Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 53 Seiten, 2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1.	<i>MSC – Definition und Charakteristika</i>	1
1.2.	<i>Gewinnung und Identifikation von MSC</i>	2
1.3.	<i>Physiologische Rolle von MSC</i>	3
1.4.	<i>Therapeutische Anwendung von MSC</i>	4
1.5.	<i>Faktoren mit Einfluss auf Gewinnung und Funktionalität von MSC</i>	5
2	ZIELSTELLUNG	6
2.1.	<i>Hintergrund</i>	6
2.2.	<i>Hypothese</i>	6
2.3.	<i>Zielstellung</i>	6
3	MATERIAL UND METHODIK	7
3.1.	<i>Materialien und Geräte</i>	7
3.1.1.	<i>Zellen</i>	7
3.1.2.	<i>Geräte</i>	7
3.1.3.	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	7
3.1.4.	<i>Medien und Substanzen</i>	7
3.2.	<i>Isolierung und Kultivierung von MSC</i>	8
3.3.	<i>Datenerfassung und Generierung einer Datenbank</i>	9
3.4.	<i>Statistische Auswertung</i>	10
4	ERGEBNISSE	12
4.1.	<i>Charakterisierung des Probandenkollektivs</i>	12
4.1.1.	<i>Demografische Daten</i>	12
4.1.2.	<i>Daten zum Vorliegen maligner Erkrankungen und deren Therapie</i>	13
4.2.	<i>Analyse der Gewinnung von MSC aus Knochenmarkspiraten</i>	14
4.2.1.	<i>Gewinnung von MSC in definierten Probandengruppen</i>	14
4.2.2.	<i>Multifaktorieller Einfluss auf die MSC-Gewinnung</i>	20
4.3.	<i>Analyse der Anzahl MSC im Knochenmark</i>	21
4.3.1.	<i>Anzahl MSC pro ml Knochenmark in definierten Probandengruppen</i>	21

4.3.2.	Multifaktorieller Einfluss auf die Anzahl MSC pro ml Knochenmark	23
4.4.	<i>Analyse der MSC- Expansionsdauer</i>	24
4.4.1.	Expansionsdauer von MSC in definierten Probandengruppen	24
4.4.2.	Multifaktorielle Einfluss auf die MSC-Expansionsdauer	26
4.5.	<i>Spezifische Analyse des Einflusses von Stammzelltransplantation auf die Gewinnung von MSC</i>	27
4.5.1.	Vergleich der Gewinnung von MSC vor und nach Stammzelltransplantation	27
4.5.2.	Zellzahlanalyse vor und nach Stammzelltransplantation	28
4.5.3.	Analyse der MSC-Expansionsdauer vor und nach Stammzelltransplantation	29
5	DISKUSSION	30
5.1.	<i>Wesentliche Ergebnisse der Studie</i>	30
5.2.	<i>Einflussfaktor Alter</i>	31
5.3.	<i>Einflussfaktor Geschlecht</i>	32
5.4.	<i>Einflussfaktor maligne Erkrankung</i>	33
5.5.	<i>Einflussfaktor Chemotherapie</i>	35
5.6.	<i>Einflussfaktor Stammzelltransplantation</i>	37
5.7.	<i>Stärken und Schwächen der Studie</i>	38
6	ZUSAMMENFASSUNG	40
7	LITERATURVERZEICHNIS	42
8	THESEN	52
	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	1
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	2
	ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE	3
	DANKSAGUNG	4

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BM-MSC	Bone marrow derived mesenchymal stem cell
CD	Cluster of differentiation
CFU-F	Kolonie-bildende Fibroblasten ähnliche Einheit
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CTX	Chemotherapie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
FACS	Durchflusszytometrie
FKS	Fetales Kälberserum
HL	Hodgkin Lymphom
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
KMP	Knochenmarkpunktion
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MM	Multiples Myelom
MNZ	Mononukleäre Zellen
MSC	Mesenchymale Stromazelle
NHL	Non Hodgkin Lymphom
OMF	Osteomyelofibrose
OR	Odds Ratio
PBS	Phosphate Buffered Saline
RT-PCR	Reverse Transkripte-Polymerase-Kettenreaktion
RTx	Bestrahlung
SD	Standardabweichung
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	Total body irradiation
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 EINLEITUNG

1.1. MSC – Definition und Charakteristika

Humane MSC, ursprünglich von Friedenstein et al. beschrieben (Friedenstein et al. 1968) haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung und wissenschaftlichem Interesse gewonnen.

Im Jahre 1970 gelang es erstmalig, MSC aus dem KM zu isolieren. Auf Grund ihrer Plastikadhärenz konnten sie *in vitro* als Kolonie-bildende Fibroblasten-ähnliche Einheit (*colony-forming unit-fibroblast*, CFU-F) proliferieren (Friedenstein et al. 1970). Diese Kolonien entsprechen dem Äquivalent der Mesenchymalen Stromazelle (Caplan 1991) und besitzen die Fähigkeit zur Selbstreplikation (Pittenger et al. 1999).

Um einen einheitlichen Standard zu generieren, veröffentlichte die International Society for Cellular Therapy eine Definition der *in vitro* Eigenschaften von MSC (Dominici et al. 2006):

- (1) Plastikadhärenz unter standardisierten Kulturbedingungen.
- (2) Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90, sowie Fehlen der Merkmale CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR.
- (3) Fähigkeit zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung *in vitro*.

Ihr multipotentes Differenzierungspotential befähigt adulte MSC zu spezialisierten Zellen ihres Keimblattes zu differenzieren. Ihre besondere Fähigkeit liegt dabei in der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Ausreifung (Pittenger et al. 1999). Eine Transdifferenzierung der MSC in Gewebe anderer Keimblätter (Anderson et al. 2001), beispielsweise in Zellen mit neuronalen (Anghileri et al. 2008), myokardialen (Kadivar et al. 2006) oder hepatozytären (Aurich et al. 2007) Charakter wurde bereits beschrieben (Siehe hierzu auch Abbildung 1; Kuhn u. Tuan 2010).

MSC können aus einer Vielzahl von Geweben isoliert werden, beispielsweise aus Knochenmark, Gehirn, Leber, Milz, Niere, Pankreas, Thymus und Muskel (da Silva Meirelles, Lindolfo et al. 2006). Desweiteren besteht die Möglichkeit der Isolation aus Fettgewebe (Zuk et al. 2002) und Nabelschnurblut (Lee et al. 2004).

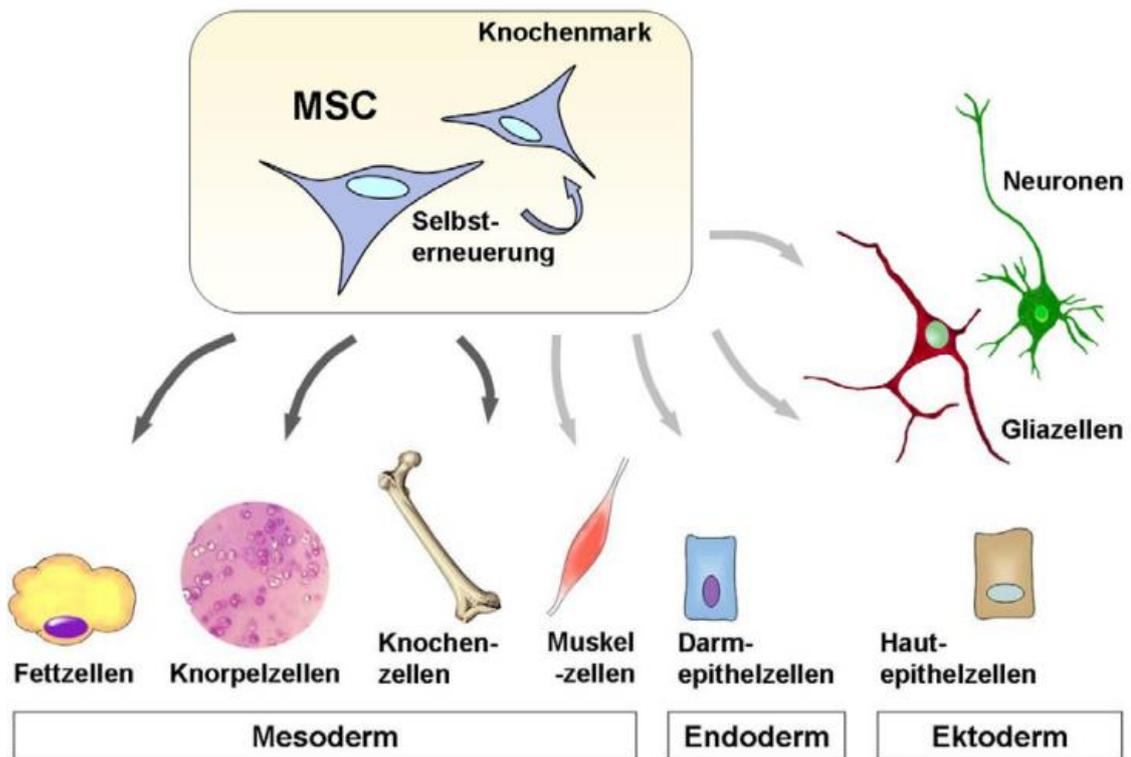


Abb. 1 - Kuhn, Tuan 2010 - Differenzierungswege der MSC (Vogler 2009)

1.2. Gewinnung und Identifikation von MSC

MSC können aus zahlreichen Geweben des menschlichen Körpers gewonnen werden und sind daher der in vitro-Kultivierung einfach zugänglich. Da die Frequenz von MSC unter 1% aller kernhaltiger Zellen des KM liegt, ist für ihre therapeutische Anwendung eine kulturelle Vermehrung unabdingbar (Pittenger et al. 1999). Da bislang kein spezifischer Marker zur Charakterisierung von MSC bekannt ist, erfolgte die Einigung auf die oben genannten Minimalkriterien zur Beschreibung dieser Zellen (Dominici et al. 2006).

Für die Expansion sind die Kultivierungsbedingungen und die Zusammensetzung der zugeführten Wachstumsmedien entscheidend. Hierzu dienen beispielsweise fetales Kälberserum oder humanes Plättchenlysate (Mueller et al. 2006).

Eine Methode zur Zellisolierung stellt die Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Adhärenzselektion dar (Pittenger et al. 1999). Dabei werden mononukleäre Zellen auf Grund ihrer Dichte separiert und anschließend in Plastikkulturgefäßen kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen werden verworfen, adhärenente Zellen werden weiter kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz passagiert. Ab dem Zeitpunkt der Koloniebildung spricht man von CFU-F (Boyum et al. 1968).

Zur phänotypischen Identifizierung von MSC dient die Expression der Oberflächenmarker CD 105, CD 73 und CD 90, sowie das Fehlen bestimmter hämatopoetischer Antigene (siehe 1.1.) (Dominici et al. 2006). Eine genauere Charakterisierung gelingt durch das multipotente Differenzierungspotential der Zellen, über die Expression spezifischer Gene sowie zytochemische Nachweisverfahren (Pittenger et al. 1999).

Standardisierte Verfahren zur Gewinnung und Identifizierung von MSC sind die Voraussetzung für das Verständnis ihres in-vitro-Verhaltens und letztlich ihrer sicheren therapeutischen Anwendung.

1.3. Physiologische Rolle von MSC

MSC sind in verschiedenen Geweben direkt an Blutgefäßen lokalisiert (da Silva Meirelles, Lindolfo et al. 2008) und somit Teil der perivaskulären Nische (Shi u. Gronthos 2003). Sie können diese verlassen und ins periphere Blut übertreten, wo sie unter Umständen in geringer Zahl nachweisbar sind (Kassis et al. 2006).

Bevorzugt werden MSC aus dem KM isoliert. Hier sorgt die Interaktionen zwischen MSC und HSC für die Aufrechterhaltung der Stammzellnische. Dieses Gefüge setzt sich aus HSC, Osteoblasten, Endothelzellen und Stromazellen zusammen (Wilson u. Trumpp 2006). MSC sezernieren Proteine wie beispielsweise Fibronectin oder Kollagen, welche Einfluss auf die hämatopoetische Homöostase nehmen können und die Reifung hämatopoetischer Zellen beeinflussen. (Valtieri u. Sorrentino 2008). Auch der direkte Zell-Zell-Kontakt scheint für die Mikroumgebung innerhalb der Nische wichtig zu sein (Watt u. Hogan 2000). Es wird vermutet das in diesem hoch spezialisierten Milieu die Pathogenese verschiedener Erkrankungen begründet liegt (Schneider 2013).

MSC besitzen einen hypoinmunogenen Charakter, da ihnen kostimulatorische Moleküle der Immunabwehr fehlen. Sie selbst können keine oder nur eine geringe Interferon- γ Antwort auslösen und damit die zelluläre Abwehr nur gering stimulieren (Aggarwal u. Pittenger 2005). In vitro zeigen sie sowohl immunsuppressive, als auch immunmodulatorische Eigenschaften (Rasmusson 2006). Beschrieben ist vor allem die Wirkung der MSC auf Natürliche Killerzellen, T- und B-Lymphozyten und Antigenpräsentierende Zellen sowie die damit verbundene Konzentrationsänderung an Interleukinen (Di Nicola et al. 2002; Polchert et al. 2008; Rasmusson 2006). Diese Eigenschaften befähigen MSC zum Einsatz bei der Behandlung unerwünschter Immunreaktionen.

1.4. Therapeutische Anwendung von MSC

Eine rasche Proliferationsrate und ein kurzer Zellzyklus ermöglichen eine rasche Vervielfältigung von MSC in vitro und bieten damit optimale Bedingungen für ihre therapeutische Verwendung (Bruder et al. 1998). Es existieren sowohl autologe, als auch allogene Therapieansätze.

Das beschriebene immunmodulierende Potential der Zellen eröffnet Optionen für die Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie dem Sjögren-Syndrom (Xu et al. 2012), der Sklerodermie (Keyszer et al. 2011) oder dem Systemischen Lupus Erythematodes (Zhang et al. 2010). Auch die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen durch intravenöse Applikation von MSC wurde bereits beschrieben (Duijvestein et al. 2010).

Von großem Interesse ist die Therapie der GVHD, einer gefürchteten Komplikation nach allogener Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Le Blanc et al. berichten über den erfolgreichen Einsatz von MSC bei akuter GVHD (Le Blanc et al. 2004). Der Toxizitätsverringende Effekt von gleichzeitiger Infusion von MSC und HSC konnte auch von anderen Autoren beobachtet werden (Aksu et al. 2008). Es existieren nur wenige Studien zur prophylaktischen Anwendung von MSC (Kuzmina et al. 2012) und auch die Therapie chronischer GVHD scheint weniger erfolgversprechend zu sein (Zhou et al. 2010).

Ein weiteres Einsatzgebiet der MSC liegt in der regenerativen Medizin, begründet im multipotenten Differenzierungspotential der Zellen sowie ihrer Fähigkeit zur Selbstreplikation. So wirkt sich beispielsweise die intraartikuläre Injektion von BM-MSCs im Tierexperiment positiv auf das Abheilen von Knorpelschäden im Gelenk aus (Mokbel et al. 2011). Eine Verbesserung der Knochenheilung wird diskutiert, die Studienlage hierzu ist allerdings nicht eindeutig und ausreichende Erfahrungen am Menschen fehlen (Jorgensen u. Noel 2011). Jiang et al. beobachteten eine signifikante Verbesserung der Querschnittssymptomatik (Motorik, Sensorik und autonome Funktionen) bei Rückenmarkverletzten nach intrathekaler MSC-Applikation (Jiang et al. 2013). Auch in der Kardiologie kommen MSC zum Einsatz, eine verbesserte linksventrikuläre Funktion nach intrakoronarer MSC-Infusion (autologe KM-MSCs) bei Patienten mit Herzinfarkt konnte beschrieben werden (Lee et al. 2014).

Es existieren zahlreiche weitere Therapieansätze mit MSC, wie zum Beispiel in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie (Zhang et al. 2012) oder des Diabetes mellitus Typ I (Vanikar et al. 2010).

Ebenso vielversprechend ist der Einsatz genetisch modifizierter MSC bei degenerativen Erkrankungen und Tumoren. Eine zielgerichtete Tumorthherapie ist beispielsweise durch Einschleusung proapoptotischer Signale in maligne Zellen möglich (Myers et al. 2010). So hemmt unter anderen die TNF- gesteuerte Apoptose das Tumorwachstum von Mamma- und Zervixkarzinomen und steigert so die Überlebenszeit der Patienten (Myers et al. 2010) (Grisendi et al. 2010).

Desweiteren werden MSC als Vektoren eingesetzt um in malignen Zellen Wachstumshemmung zu induzieren, beispielsweise durch Replikation von Adenoviren (Komarova et al. 2006) (Hakkarainen et al. 2007).

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Vermittlung immunmodulatorischer Signale via MSC, so kann die Angiogenese in Tumorgewebe durch den löslichen VEGF-Rezeptor gehemmt werden (Kyriakou et al. 2006).

1.5. Faktoren mit Einfluss auf Gewinnung und Funktionalität von MSC

Es ist bislang nicht eindeutig geklärt ob bestimmte Eigenschaften, Erkrankungen oder Therapien Einfluss auf die Funktionalität und Gewinnung von MSC aus dem KM nehmen und ob es nach Zellschädigung ein Regenerationspotential gibt. Bislang vorliegende Konsensus-Charakteristika sind ohne klaren Bezug zu möglichen, in vivo relevanten funktionellen Eigenschaften.

Für die meisten der genannten Therapieoptionen liegen allogene Ansätze mit MSC aus dem KM vor, eine möglichst genaue Kenntnis über die Gewinnung von MSC ist deshalb Grundlage für die weitere Verbesserung ihres klinischen Einsatzes. Ebenso wichtig ist der Hinweis darauf, dass MSC wahrscheinlich in vivo relativ resistent gegenüber Schädigungen sind (Mueller et al. 2006). Nishida und Kollegen zeigten, dass MSC lebenslang im Organismus persistieren und auch noch in hohem Lebensalter gewonnen werden können (Nishida et al. 1999). Das wissenschaftliche Interesse wird daher momentan auch auf Zellanalysen bei erkrankten oder älteren Personen gerichtet, um so auch autologe Therapieansätze zu ermöglichen.

2 ZIELSTELLUNG

2.1. Hintergrund

MSC zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation und multipotenten Differenzierung aus, ihr Einsatz in der regenerativen Medizin, sowie Immun- und Tumortherapie gewinnt daher zunehmend an Bedeutung.

Die Kenntnis eines möglichen Einflusses spezifischer Faktoren auf die Gewinnung von MSC ist wesentlich, zum einen für das Verständnis der Pathophysiologie von malignen Erkrankungen, zum anderen für die therapeutische Anwendung in vitro expandierter autologer oder allogener MSC.

2.2. Hypothese

Es gibt bestimmte probandenabhängige Eigenschaften, die sich negativ auf die Isolierbarkeit von MSC in vitro auswirken. Die erfolgreiche Gewinnung von MSC aus dem humanen KM lässt sich daher anhand bestimmter Faktoren voraussagen.

2.3. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener probandenabhängiger Parameter auf die

- (1) Gewinnung von CFU-F aus dem humanen KM, als Quantitätsmarker,
- (2) Anzahl der isolierbaren Zellen, als Maß für die Proliferationskapazität sowie
- (3) Dauer bis zur Expansion von CFU-F zur Abschätzung der Wachstumskinetik zu analysieren.

Voraussetzung hierfür war die Erstellung einer umfangreichen Datenbank, welche durch hohe Fallzahlen und detailliert erhobene Parameter als Grundlage für diese, aber auch folgende Studien gilt. Angesichts der unzulänglichen in vivo Charakterisierung von CFU-F ist die Untersuchung der genannten Ziele nur in großen Probandengruppen mit wenigen Parametern sinnvoll.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Zellen

Die verwendeten Zellen stammen von Probanden, die sich im Rahmen von Diagnostik oder Stammzellspende, einer Knochenmarkpunktion unterzogen hatten.

Zur Zellgewinnung wurde nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Probanden eine Knochenmarkpunktion mit Aspiration durchgeführt. Das positive Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag vor.

3.1.2. Geräte

Laminar Flow- Werkbank	HeraSafe (Heraeus Instruments)
Mikroskop	Axiovert 40 CFL (Zeiss)
Brutschrank	BB 16 (Heraeus Instruments)
Zentrifuge	Labofuge 400 (Heraeus Instruments)
Durchflusszytometer	FACSCalibur mit CellQuest software (BD Biosciences)

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

Set zur KMP (Punktionsnadel, Sterile Tücher/Tupfer, Desinfektionsmittel, sterile Spritzen)

Citrat-Monovetten	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	TPP
Pipetten	Eppendorf oder Gilson
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Pipettierhilfe	Hirschmann
Kulturschalen	TPP
Neubauer-Kammer	Carl Roth

3.1.4. Medien und Substanzen

Pancoll	PAN Biotech GmbH
PBS	Sigma Aldrich
DMEM	Gibco/life technologies
FKS	PAN Biotech GmbH
Trypsin-EDTA	PAN Biotech GmbH
Penicillin/Streptomycin	Biochrom

- Wachstumsmedium für MSC: DMEM, 15 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin
- Antikörper inklusive Isotypen für Durchflusszytometrie
- Zusätze für osteogenes /adipogenes /chondrogenes Differenzierungsmedium

3.2. Isolierung und Kultivierung von MSC

Die Materialgewinnung erfolgte über KMP in Lokalanästhesie und Aspiration von KM in Citrat-Monovetten. Von der Entnahme bis zur Weiterverarbeitung der Zellen durch die Labormitarbeiter vergingen im Regelfall maximal 3 Stunden.

Im Labor wurde das Aspirat anschließend 10 min bei 300 x g zentrifugiert und die Zellfraktion mit PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein Gradientenmedium (Pancoll) geschichtet und erneut für 30 min bei 300 x g zentrifugiert. Dadurch schichtete sich das KM in verschiedene Phasen. Die MNC setzten sich dabei als weißer Ring unterhalb des Plasmas ab. Diese Interphase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und separiert. Nach Spülen in PBS wurden die Zellen mit Zugabe des Wachstumsmedium in Zellkultur gebracht.

Nicht-adhärenente Zellen wurden durch Wechsel des Mediums nach 24 Stunden entfernt. Die Kultivierung erfolgte bei 36,5°C Lufttemperatur, der Wechsel des Wachstumsmedium alle 2-4 Tage bis zur Bildung einer Kolonie. Die Passage der adhärenente Zellen erfolgte mittels Trypsin bei Semikonfluenz von 50-80%. Die Zeit bis zur Bildung einer Kolonie (CFU-F) wurde als Expansionsdauer in Tagen dokumentiert. Zeigte sich nach 20d keine konfluente Einheit wurde dies als Misserfolg der MSC-Kultivierung dokumentiert. Kolonien bildende Zellen (CFU-F) wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, die Anzahl der Zellen pro ml KM wurde zum Abschätzen der Proliferationskapazität dokumentiert. Anschließend wurden die CFU-F durch die Arbeitsgemeinschaft entsprechend dem Standard nach Dominici (Dominici et al. 2006) eindeutig als MSC charakterisiert, sodass ab diesem Zeitpunkt in allen folgenden Analysen von MSC gesprochen wird. Der Phänotyp wurde mittels Durchflusszytometrie für das Vorliegen bzw. Fehlen der definierten Antigene bestimmt. Das Potential zur adipogenen und osteogenen in vitro Differenzierung wurde durch spezielle Färbetechniken und RT-PCR analysiert, da dies nicht Teil der vorliegenden Arbeit ist, wird hierauf nicht weiter eingegangen. Die gewonnenen MSC wurden teilweise für weitere Forschungszwecke kryokonserviert.

3.3. Datenerfassung und Generierung einer Datenbank

Um den ausgewerteten Datensatz zu generieren, wurden Probandeninformation aus den Jahren 2003 bis 2011 retrospektiv analysiert und die Ergebnisse der KM-Untersuchungen dokumentiert. Alle Probanden befanden sich zu genannten Zeitraum in Betreuung des Universitätsklinikums Halle/Wittenberg, ihre Daten wurden pseudonymisiert erfasst.

Einige Probanden wurden im Laufe ihrer Krankengeschichte mehrfach KM- punktiert, um einen Bias zu vermeiden wurde jeder Proband nur ein Mal in den Datensatz aufgenommen. Patienten mit Mehrfachpunktionen wurden nachbeobachtet und jedes Punktionsergebnis einzeln dokumentiert. So war es möglich die Erfolgsrate der MSC-Isolationen im Verlauf einer Erkrankung zu vergleichen. Insbesondere die erfolgreiche Gewinnung von MSC vor und nach Stammzelltransplantation war dabei von besonderer Bedeutung. Als relevante Punktion wurde die Erstpunktion eines jeden Probanden gewählt, ausgenommen Probanden die bereits eine SZT erhalten hatten, hier wurde die Punktion nach Transplantation in die Auswertung einbezogen. Bei Probanden die sowohl autolog, als auch allogene transplantiert wurden (N=12) erfolgte die Auswertung der Punktion nach allogener SZT.

Alle Probandeninformationen wurden in das Statistik-Programm SPSS Statistics 20 (IBM) eingearbeitet und entstammen aus den Krankenakten sowie den Untersuchungsbefunden (KM-Histologie, KM-Zytologie, FACS-Analyse) des jeweiligen Falles.

In der Datenbank wurden für jeden Probanden folgende Parameter erfasst: Geschlecht, Geburtsdatum, maligne Erkrankung, Therapieart und -dauer (Chemotherapie, Bestrahlung, SZT), Nebenerkrankungen, Dauermedikationen, sowie verschiedene Werte zur Beurteilung des KM. Als zu untersuchende Endpunkte der vorliegenden Analysen dienen:

- (1) die erfolgreiche Gewinnung von MSC, definiert als Präsenz von mindestens einer semikonfluenten CFU-F, mit homogener typischer Morphologie
- (2) die Anzahl von MSC bei erster Passage (bezogen auf die Zellzahl pro ml gewonnenem KM)
- 3) die Expansionsdauer, definiert als Zeitraum vom Plattieren der Zellen bis zur Subkultivierung.

3.4. Statistische Auswertung

Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics 20.

Es erfolgte initial die Charakterisierung des Probandenkollektivs über die Auswertung demografischer Daten und Häufigkeitsanalysen verschiedener Begleitfaktoren (Siehe 4.1.).

Für jeden Endpunkt (Gewinnung von MSC, Zellzahl, Expansionsdauer) wurde zunächst eine deskriptive Analyse der Parameter mittels Kreuztabellen durchgeführt, um den Einfluss jedes Einzelfaktors zu begutachten und empirische Daten zu erstellen (Siehe 4.2.1.; 4.3.1. und 4.4.1.). Die Signifikanz wurde mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt.

Aufgrund einer begründeten Vorauswahl (N >5 und ausreichend vorhandene Probandeninformationen), sowie unter Berufung auf Studien anderer Arbeitsgruppen (Wang et al. 2013b) reduzierten wir die Auswertung der erhobenen probandenabhängigen Faktoren (siehe 3.3.) auf folgende Punkte:

Alter, Geschlecht, Chemotherapie, allogene/autologe SZT, NHL, MM, AML, und MDS.

probandenabhängige

Einflussfaktoren

Alter
Geschlecht
Chemotherapie
SZT (allogen/ autolog)
AML, MDS, NHL, MM

Untersuchte Endpunkte

Gewinnung von MSC (Isolationserfolg aus KM)
Zellzahl pro ml KM
Expansionsdauer in Tagen

Anhand des Altersmedians wurden drei Altersgruppen definiert: <40Jahre, >/=40 Jahre bis <60 Jahre und >/=60 Jahre.

Den deskriptiven Untersuchungen folgten multifaktorielle Analysen in verschiedenen statistischen Modellen. Da eine erste Berechnung das Nichtwachsen von MSC nur schlecht voraus gesagt hatte, wurde eine Bereinigung des Datensatzes durchgeführt, indem die Residuen (N=3) entfernt wurden. Alle multifaktoriellen Berechnungen erfolgten daher in einem Datensatz mit N= 325.

Um den Gesamteinfluss der Faktoren und die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Gewinnung von MSC beurteilen zu können, wurde eine binär logistische Regression durchgeführt (Methode: Vorwärts schrittweise). Die Präsenz von MSC wurde als abhängige Variable definiert. Als Kovarianten wurden folgende Variablen festgelegt: In

einem ersten Schritt Geschlecht, Alter, Chemotherapie, allogene SZT und autologe SZT. In einem zweiten Schritt wurden AML, NHL, MM und MDS in das Modell eingegeben (Siehe 4.2.2.).

Um den Zusammenhang zwischen den erfassten Parametern und der Zahl von MSC pro ml KM, bzw. der Expansionsdauer darzustellen, wurde eine Berechnung im Allgemeinen Linearen Modell durchgeführt (Siehe 4.3.2. und 4.4.2.). Die Zellzahl pro ml, beziehungsweise die Expansionsdauer in Tagen wurden als abhängige Variablen definiert. Geschlecht, Chemotherapie, allogene SZT und autologe SZT sind in diesem Modell als feste Faktoren, das Alter als Kovariante anzusehen. Der Levene-Test $> 0,05$ bestätigte die Varianzgleichheit im Modell. (Siehe 4.3. und 4.4.)

Aufgrund der, durch genannte Methoden erhobenen Ergebnisse schloss sich eine gesonderte Analyse der stammzelltransplantierten Patienten an. Sie soll als orientierende Untersuchung für weitere Arbeiten dienen.

Das Vorhandensein von MSC vor und nach Transplantation wurde mittels Kreuztabelle analysiert, Zellzahl und Expansionsdauer mittels T-Test bei verbundenen Stichproben (siehe 4.5.).

Die Auswahl der statistischen Methoden, sowie die Auswertung und Interpretation der vorliegenden Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Susanne Unverzagt vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg.

4 ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung des Probandenkollektivs

4.1.1. Demografische Daten

Für die vorliegende Arbeit wurden Knochenmarkaspirate von 328 Probanden untersucht, darunter 198 Männern und 130 Frauen, die im Durchschnitt 57,6 Jahre alt waren.

Tab. 1 - Verteilung des Geschlechts im Gesamtkollektiv

Geschlecht	N	%
männlich	198	60,4
weiblich	130	39,6

Tab. 2 - Altersanalyse des Gesamtkollektiv

Alter in Jahren	
Mittelwert	57,6
Median [Minimum-Maximum]	61 [15-86]

Tab. 3 - Verteilung der Probanden in den verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe in Jahren	N	%
≤ 40	44	13,4
>40 bis ≤ 60	114	34,8
< 60	170	51,8

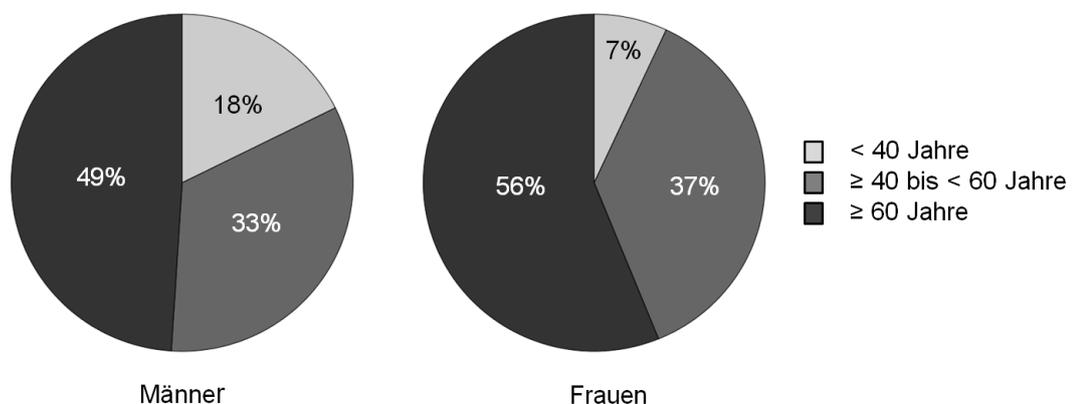


Abb. 2 - Altersverteilung in männlicher und weiblicher Probandengruppe

4.1.2. Daten zum Vorliegen maligner Erkrankungen und deren Therapie

Das Gesamtkollektiv umfasst 328 Probanden, darunter 233 (71,03%) Personen mit hämatoonkologischen Erkrankungen. Am häufigsten fanden sich NHL, MM und AML (siehe Tab. 4). 86 Personen (26,2%) des Kollektivs wurden auf Grund von Blutbildveränderungen bzw. Verdacht auf ein Malignom im Rahmen der Diagnostik knochenmarkpunktiert, ohne das sich eine Neoplasie bestätigte. Neun Probanden (2,7%) waren gesunde Stammzellspender.

Diese 95 gesunden Probanden, sowie 55 der 233 Erkrankten erhielten bis zum Zeitpunkt der Punktion keinerlei Chemotherapie. 178 Probanden (54,3%) wurden vor Gewinnung des untersuchten Materials mit Chemotherapie behandelt. Vor Punktion erhielten 39 Probanden (11,9%) eine autologe Stammzelltransplantation, 38 (11,6%) wurden allogenen transplantiert. Eine Bestrahlung erhielten 70 der 328 Probanden (21,3%), bei 18 Patienten wurde im Rahmen der Therapie eine TBI durchgeführt (5,5%).

Zur Beurteilung des Knochenmarks wurden zytologische und histologische Befunde herangezogen. Bei 180 Patienten (54,9%) lag zur aktuellen Punktion oder zu einem früheren Zeitpunkt eine Infiltration des Knochenmarks durch die Grunderkrankung vor.

Da eine erste Berechnung das Nichtwachsen von MSC nur schlecht voraus gesagt hatte (Prozentsatz der Richtigen 6,8%), wurde eine Bereinigung des Datensatzes durchgeführt, indem die Residuen für die multifaktoriellen Analysen entfernt wurden. In zwei der als Residuen definierten Fälle, lag als Grunderkrankung eine Aplastische Anämie vor, in einem dritten ein embryonales Rhabdomyosarkom. Die Aplastische Anämie ist eine seltene Erkrankung, man muss von einem spezifischen und möglicherweise auch systemischen Einfluss ausgehen, dies rechtfertigt den Ausschluss dieser Fälle. Alle multifaktoriellen univarianten Analysen wurden im bereinigten Datensatz (N= 325) durchgeführt.

Tab. 4 - Verteilung maligner Erkrankungen im Gesamtkollektiv (N=328)

Erkrankungen	N	%
NHL	77	23,5
MM	63	19,2
AML	42	12,8
ALL	17	5,2
CLL	15	4,6
HL	7	2,1
MDS	6	1,8
CML	3	0,9
OMF	3	0,9

4.2. Analyse der Gewinnung von MSC aus Knochenmarkaspiraten

4.2.1. Gewinnung von MSC in definierten Probandengruppen

Nach der Datenerhebung erfolgte zunächst die Auswertung der Isolierbarkeit von MSC, dabei wurde untersucht ob sich MSC unter bestimmten Einflussfaktoren aus dem KM gewinnen lassen. Wie eingangs beschrieben wurden dafür CFU-F aus dem KM isoliert und als MSC charakterisiert. Die Rate an erfolgreichen Isolationen diene dabei als Quantitätsmaß für MSC im KM.

Das Probandenkollektiv bei denen keine MSC gewonnen werden konnten, lässt sich auf Grund der umfangreichen Datenerhebung gut charakterisieren. In insgesamt 29,9% der Fälle (N=328) konnten auch nach 20-tägiger Kultivierung keine MSC isoliert werden. Es zeigte sich bei mehreren Einflussfaktoren eine signifikant niedrigere Rate an MSC-Isolationen gegenüber ihrer Vergleichsgruppe (siehe Tab. 5).

Tab. 5 - Deskriptive Analyse der MSC-Gewinnung

Gewinnung von MSC					
		N	Nicht erfolgreich	erfolgreich	p-Wert
Geschlecht	Männlich	198	48 (24,2%)	150 (75,8%)	0,006
	Weiblich	130	50 (38,5%)	80 (61,5%)	
Alter in Jahren	<40	44	5 (11,4%)	39 (88,6%)	0,015
	≥40 bis <60	114	36 (31,6%)	78 (68,4%)	
	≥60	170	57 (33,5%)	113 (66,5%)	
Erkrankung	Keine	95	20 (21,1%)	75 (78,9%)	0,005
	AML	42	21 (50,0%)	21 (50,0%)	
	MDS	6	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
	NHL	77	20 (26,0%)	57 (74,0%)	
	MM	63	21 (33,3%)	42 (66,7%)	
	Andere	45	12 (26,7%)	33 (73,3%)	
Chemo-therapie	Nein	150	36 (24,0%)	114 (76,0%)	0,033
	Ja	178	62 (34,8%)	116 (65,2%)	
Stammzell-transplantation	Keine SZT	263	67 (25,5%)	196 (74,5%)	0,002
	Allogene SZT	38	18 (47,4%)	20 (52,6%)	
	Autologe SZT	27	13 (48,1%)	14 (51,9%)	

Unter anderem konnten deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede detektiert werden. Auf Grund der hohen Fallzahl war ein guter Vergleich zwischen beiden Gruppen möglich. Bei Frauen konnten signifikant seltener MSC gewonnen werden. Bei Männern lag die Rate an erfolgreichen Isolationen um 10% höher (75,8% vs. 61,5%) (siehe Abb. 3).

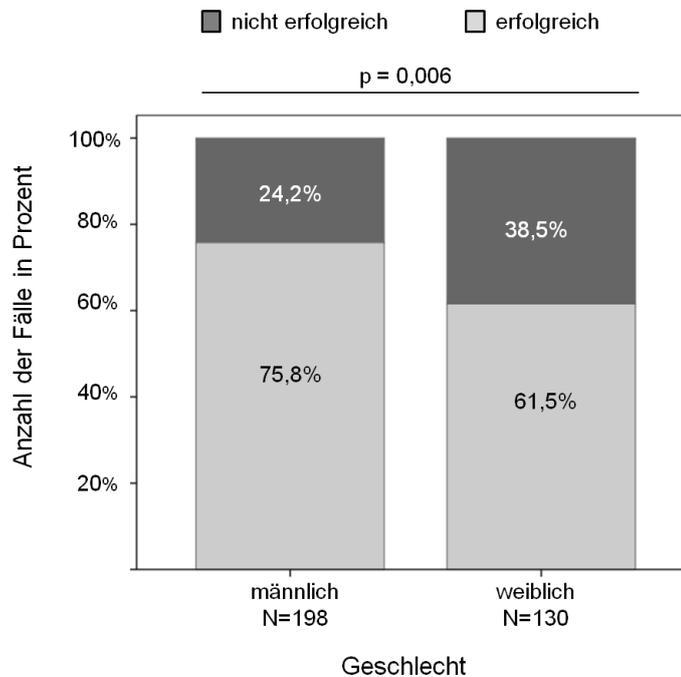


Abb. 3 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung vom Geschlecht

Zur Beurteilung der Altersabhängigkeit der MSC-Präsenz erfolgte eine Drittelung der Population nach vorherrschender Altersstruktur. Zwischen der jüngsten Kollektivgruppe mit <40 Jahren und der ältesten Gruppe mit ≥ 60 Jahren konnte eine 22%ige Differenz bezüglich der erfolgreichen MSC-Isolationen zu Gunsten der Jüngeren analysiert werden. Auch in der Gruppe der ≥ 40 -<60 Jährigen zeigten sich gegenüber den <40 Jährigen deutliche Einbußen in der Gewinnung von MSC. Mit steigendem Alter lassen sich folglich seltener MSC aus dem KM isolieren (Siehe Abb. 4).

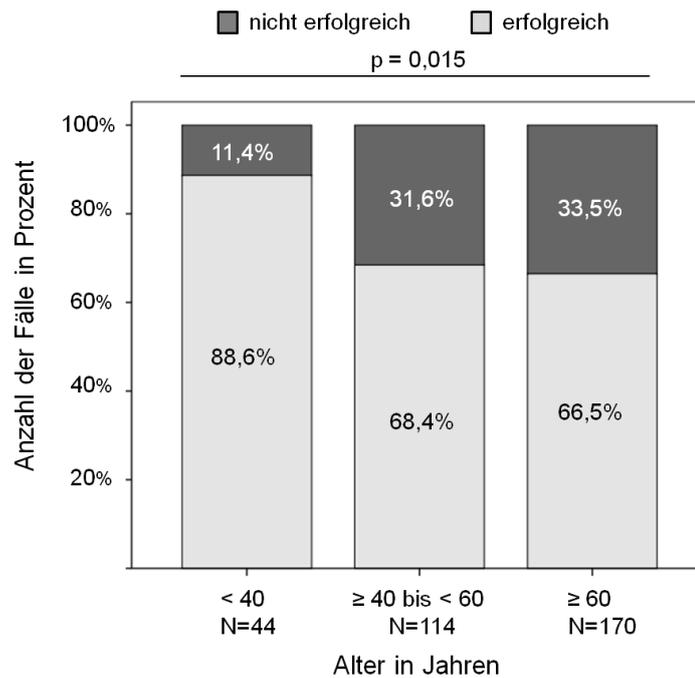


Abb. 4 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung vom Alter

Betrachtet man die Altersgruppe mit den niedrigsten Isolationsraten, die der ≥ 60 Jährigen, nach Geschlechtern getrennt, bestätigt sich erneut die schlechtere Isolierbarkeit bei Frauen. MSC lassen sich demnach bei Frauen nach dem 60. Lebensjahr besonders schlecht isolieren. Bei Männern in diesem Alter lag die Isolationsrate noch bei 74,2% (Siehe Abb. 5).

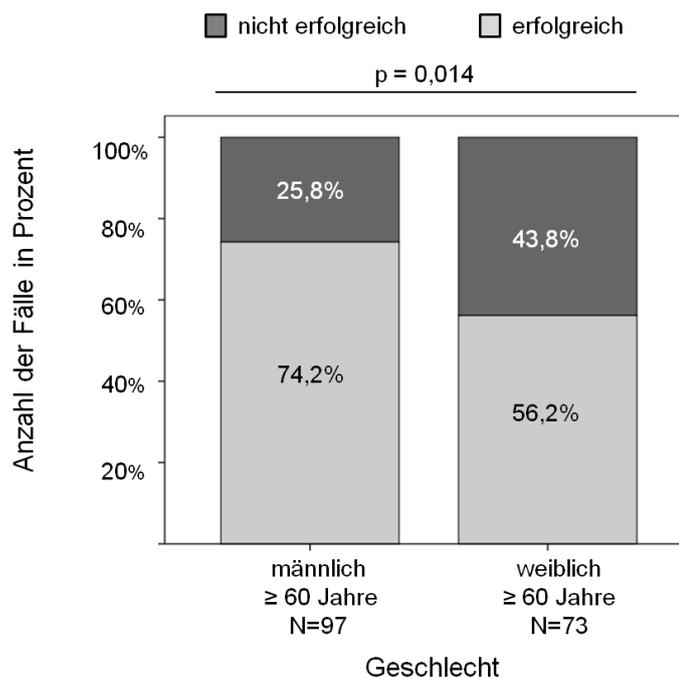


Abb. 5 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung von Alter und Geschlecht

Auf Grund der hohen Fallzahl war es möglich ein breites Spektrum an Erkrankungen bezüglich ihres Einflusses auf die MSC-Präsenz zu untersuchen. Die folgenden Analysen beziehen sich auf Erkrankungen die auf Grundlage vorausgegangener Studien von besonderem wissenschaftlichem Interesse sind (Wang et al. 2013).

Unter den Probanden, bei denen zum Punktionszeitpunkt eine AML vorlag, konnte eine um 50% signifikant niedrigere Rate an erfolgreichen MSC-Isolationen beobachtet werden. Unter MDS-Patienten war die Rate gegenüber der Vergleichsgruppe ohne hämatoonkologische Grunderkrankung um 33% signifikant erniedrigt (Siehe Abb. 6). Auch bei weiteren Erkrankungen konnten niedrigere Isolationsraten ausgemacht werden.

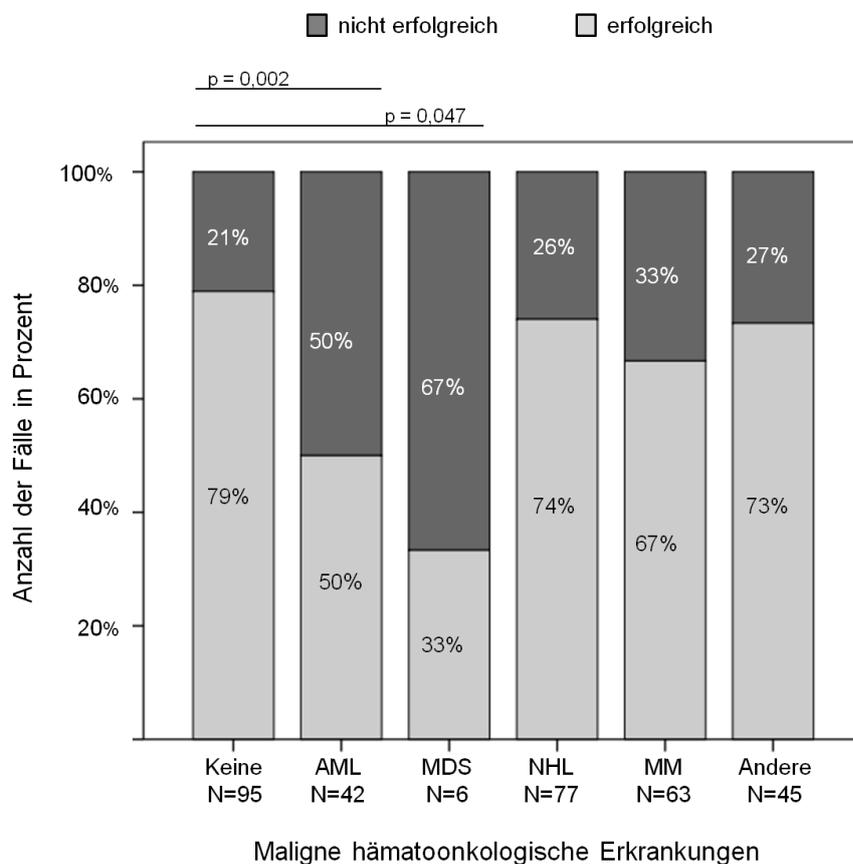


Abb. 6 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung vom Vorliegen maligner Erkrankungen

Des Weiteren zeigte sich, dass sich MSC aus dem KM von Probanden die mit Zytostatika behandelt wurden, schlechter gewinnen ließen. Hier wurde eine ca. 10 % niedrigere Rate an erfolgreichen MSC-Isolationen registriert (Siehe Abb. 7).

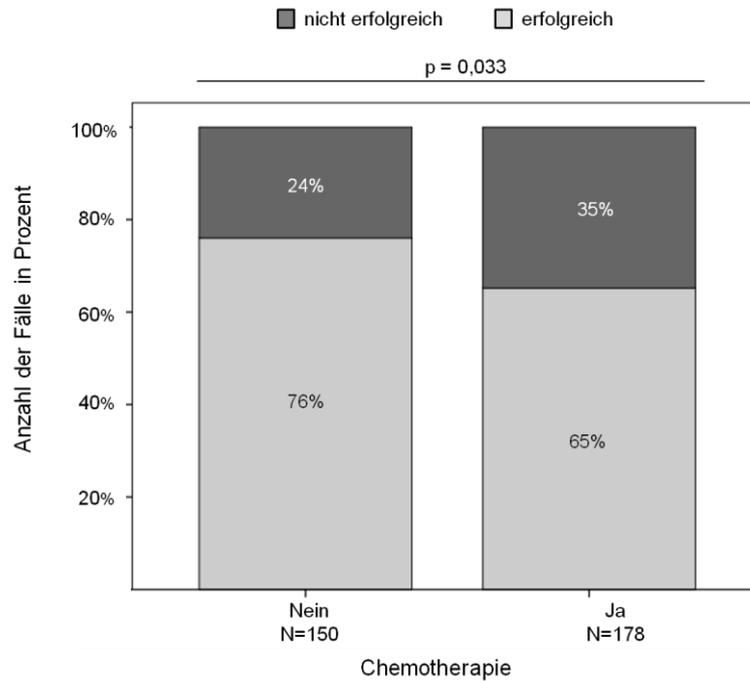


Abb. 7 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung von Chemotherapie

Die Analyse von zytostatischen Einzelsubstanzen erfolgte unter Bezug auf vorangegangene Studien (Li et al. 2010). Daunorubicin (N=23) scheint dabei eine Sonderstellung unter den Therapeutika einzunehmen. Die Rate an erfolgreichen MSC-Isolationen sank signifikant um 14% (Siehe Abb. 8), im Vergleich zu allen anderen Probanden mit und ohne Chemotherapie, sowie um ca. 20% ($p = 0,061$) im Vergleich zu Probanden die mit anderen Chemotherapeutika behandelt wurden.

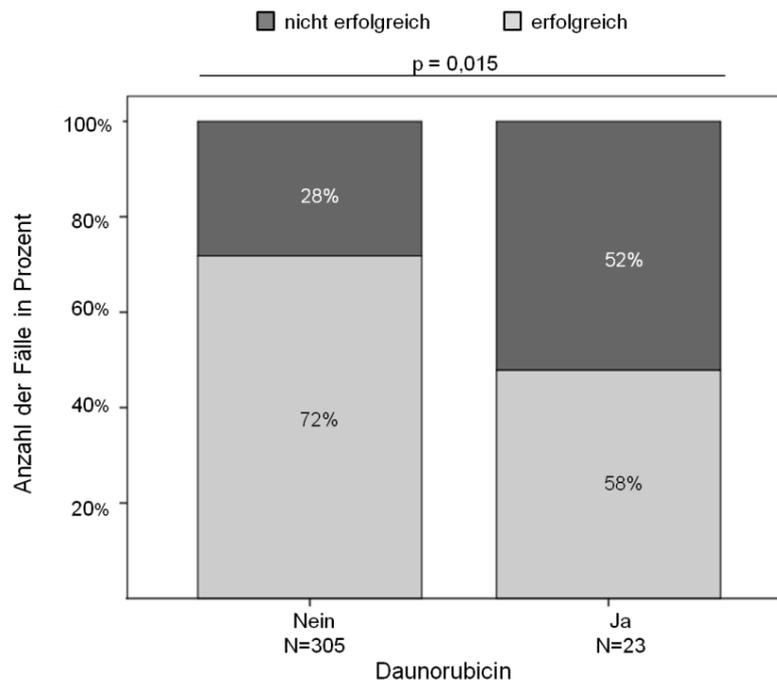


Abb.8 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung von Daunorubicin-Therapie

Vergleicht man die Erfolgsraten der MSC-Gewinnung von Probanden die eine SZT erhielten mit Probanden ohne SZT zeigt sich deutlich, dass nach allogener ($p= 0,012$), sowie autologe SZT ($p= 0,018$) nur noch in der Hälfte der Fälle MSC gewonnen werden konnten (Siehe Abb. 9).

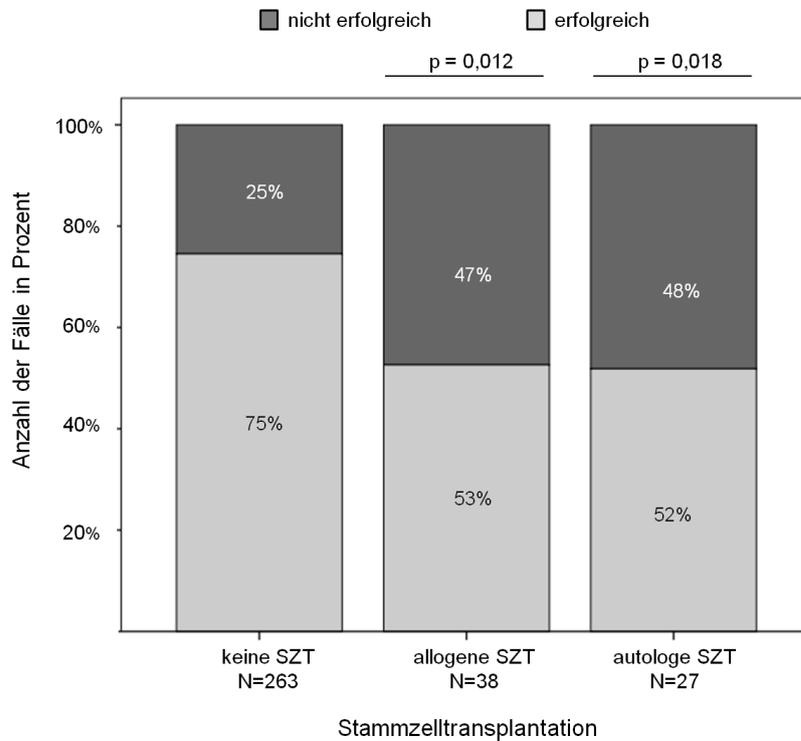


Abb. 9 - Abhängigkeit der erfolgreichen MSC-Gewinnung von der Durchführung einer SZT

4.2.2. Multifaktorieller Einfluss auf die MSC-Gewinnung

In der multifaktoriellen univariaten Analyse (binär logistische Regression), zur Ermittlung des gemeinsamen Einflusses der untersuchten Einflussfaktoren zeigten sich folgende Ergebnisse:

Die Chance bei Frauen MSC aus dem KM zu isolieren lag um 46% niedriger als bei Männern (OR=0,54, p=0,02, KI(0,32;0,89)).

Bei Probanden der Altersgruppe zwischen 40 und 60 Jahren sank die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher MSC-Isolationen um 88% gegenüber den unter 40 Jährigen, bei den über 60 Jährigen gegenüber den unter 40 Jährigen waren es 89%.

Nach allogener SZT lag die Chance, dass sich MSC isolieren lassen um 56% niedriger. Patienten mit AML hatten ein fast doppelt so hohes Risiko, dass aus ihrem KM keine MSC gewonnen werden konnten (OR= 0,48).

Die Parameter Chemotherapie, autologe SZT, sowie die Erkrankungen NHL, MM und MDS zeigen in der multifaktoriellen, univariaten binär logistischen Analyse keinen signifikanten Einfluss auf die Gewinnung von MSC.

Tab. 6 - Multifaktorielle Analyse der erfolgreichen Gewinnung von MSC

	Odds Ratio	p-Wert	95% KI
Weibliches Geschlecht	0,54	0,02	[0,32 - 0,89]
Altersgruppen			
< 40Jahre		0,02	
< 40Jahre vs. ≥ 40 bis < 60 Jahre	0,12	0,005	[0,03 - 0,53]
< 40Jahre vs. ≥ 60 Jahre	0,11	0,004	[0,03 - 0,499]
Allogene SZT	0,44	0,04	[0,21 - 0,95]
AML	0,49	0,05	[0,235 - 1,00]

KI = Konfidenzintervall

4.3. Analyse der Anzahl MSC im Knochenmark

4.3.1. Anzahl MSC pro ml Knochenmark in definierten Probandengruppen

Ließen sich MSC isolieren erfolgte anschließend die Bestimmung der Zellzahl. Durch Analyse der Anzahl MSC pro ml KM-Aspirat lässt sich eine Aussage über die Frequenz, aber auch über die Vermehrungskapazität der MSC treffen. Ziel war es Faktoren zu bestimmen, die Einfluss auf diese Zellproliferation nehmen, um so Voraussagen über Isolationserfolge machen zu können. Hierfür wurden Kolonien bildende Zellen (CFU-F), welche als MSC-Äquivalent gelten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und deren Mittelwert bzw. Median in verschiedenen Probandengruppen verglichen. Die Auswertung erfolgte bewusst pro ml KM und nicht auf die Anzahl mononukleärer Zellen bezogen. So sollen Fehlinterpretationen vermieden werden, die beispielsweise durch das zellreiche KM von Leukämiepatienten entstehen können. Nicht bei allen isolierten CFU-F war eine Angabe zum Volumen des KM-Aspirates dokumentiert, sodass die Fallzahlen hier gegenüber der Analysen aus 4.2. geringfügig niedriger liegen.

Die durchschnittliche Anzahl MSC unter allen Fällen lag bei 21.340 pro ml KM, maximal wurden 804.000 Zellen pro ml KM gewonnen.

Bei Frauen konnten fast 25 % mehr MSC pro ml KM isoliert werden als bei Männern (siehe Abb.10). Probanden, die jünger als 40 Jahre waren, zeigten die höchste Zellzahl, im Durchschnitt 68.156 Zellen pro ml Knochenmark. Die geringste Zellzahl konnte bei Probanden im Alter zwischen 40 und 60 Jahren ermittelt werden (siehe Abb.11).

Lagen AML, NHL, MM oder MDS vor, zeigte sich eine deutlich geringere Anzahl MSC im Vergleich zu Probanden, bei denen die jeweilige Erkrankung nicht vorlag. Die geringste Anzahl Zellen konnte bei AML-Patienten beobachtet werden.

Mussten sich die Erkrankten einer Chemotherapie unterziehen, konnten nur ca. halb so viele MSC pro ml KM gewonnen werden wie in der Vergleichsgruppe ohne zytostatische Therapie (14.451 vs. 28.293 pro ml KM).

Auch die Transplantation von HSC scheint die Proliferationskapazität zu beeinflussen, so sind vor allem nach allogener SZT deutlich weniger Zellen zu isolieren gewesen. Eine Signifikanz von $p < 0,05$ konnte von den aufgeführten Faktoren allerdings nur das Alter erreichen.

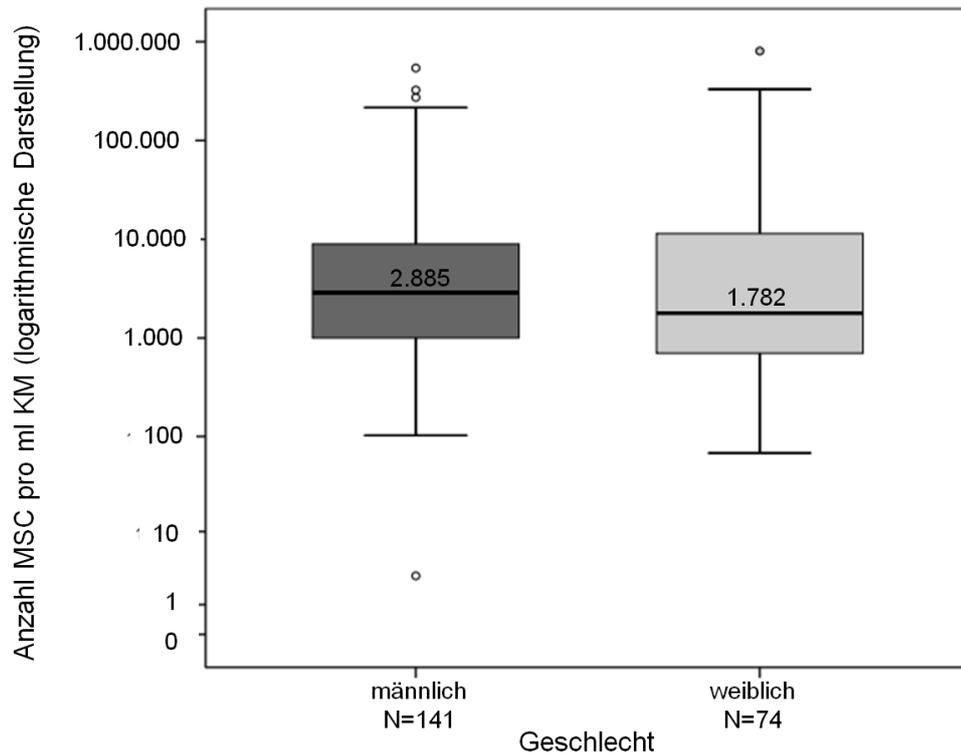


Abb. 10 - Anzahl MSC/ml KM bei Männern und Frauen; $p=0,59$ (Median inkl. SD und Ausreißer)

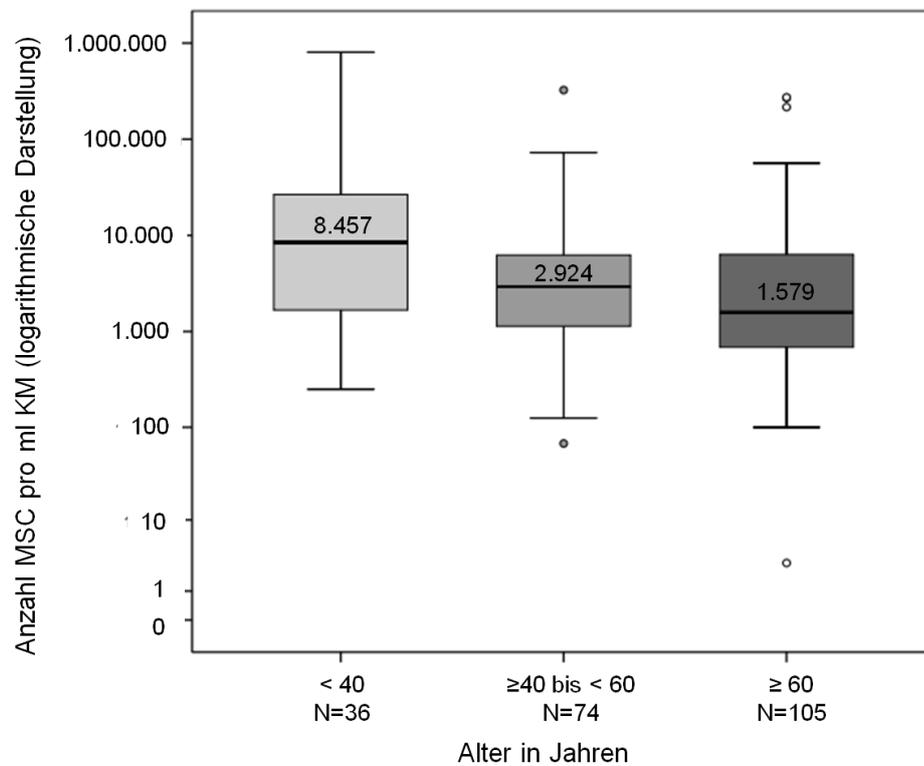


Abb. 11 - Anzahl MSC/ml KM in verschiedenen Altersgruppen; $p=0,001$ (Median inkl. SD und Ausreißer).

Tab. 7 - Deskriptive Analyse der Anzahl gewonnener MSC pro ml KM

Anzahl MSC pro ml KM					
		N	Mittelwert	SD	p-Wert
Geschlecht	Männlich	141	19.219	63.315	0,591
	Weiblich	74	25.382	104.117	
Alter in Jahren	<40	36	68.156	165.672	<0,001
	≥40 bis <60	74	10.772	38.585	
	≥60	105	12.737	42.759	
Erkrankung	Keine	75	42.292	128.970	0,176
	AML	20	6.761	8.063	
	MDS	2	12.569	8.937	
	NHL	53	9.567	25.888	
	MM	38	14.214	44.723	
	Andere	30	11.185	22.670	
Chemotherapie	Nein	107	28.294	103.181	0,203
	Ja	108	14.451	44.889	
Stammzell- transplantation	Keine	182	22.449	83.910	0,780
	Allogene SZT	20	9.411	24.601	
	Autologe SZT	13	24.160	73.786	

4.3.2. Multifaktorieller Einfluss auf die Anzahl MSC pro ml Knochenmark

Die multifaktorielle univariante Analyse im Allgemeinen Linearen Modell zeigte, dass die Zellzahl pro Lebensjahr signifikant um 1.253 Zellen pro ml Knochenmark sank ($p < 0,001$).

Tab. 8. - Multifaktorielle Analyse MSC pro ml/KM

	Regressions- koeffizient B	p-Wert	95% KI
Alter pro Lebensjahr	-1.253	<0,001	[-1.913 - (-592)]
Männer /Frauen	3.265	0,96	[-113.453 - 119.984]
Chemotherapie	23.618	0,23	[-15.347 - 62.583]
Allogene SZT	74.499	0,21	[-42.269 - 191.267]
Autologe SZT	-4.395	0,95	[-144.003 - 135.213]

KI = Konfidenzintervall

4.4. Analyse der MSC- Expansionsdauer

4.4.1. Expansionsdauer von MSC in definierten Probandengruppen

Die Expansionsdauer wurde als Zeitraum vom Isolieren und Plattieren der MNZ des KM, bis zum Auszählen der semikonfluenten CFU-F in Tagen dokumentiert.

Zur ersten Passage lag diese im Median bei 10 Tagen (Mittelwert: 10,62 Tage).

Es zeigte sich eine signifikante Verlängerung der medianen Expansionsdauer nach allogener/ autologer SZT im Vergleich zu Probanden die keine SZT erhalten hatten ($p=0,042$) (siehe Abb. 12.).

Bei Probanden mit MDS ließ sich eine Verlängerung um 2,5 Tage nachweisen ($p=0,32$) (siehe Abb. 13.).

Weitere Untersuchungen verblieben ohne signifikante Befunde (siehe Tab. 9).

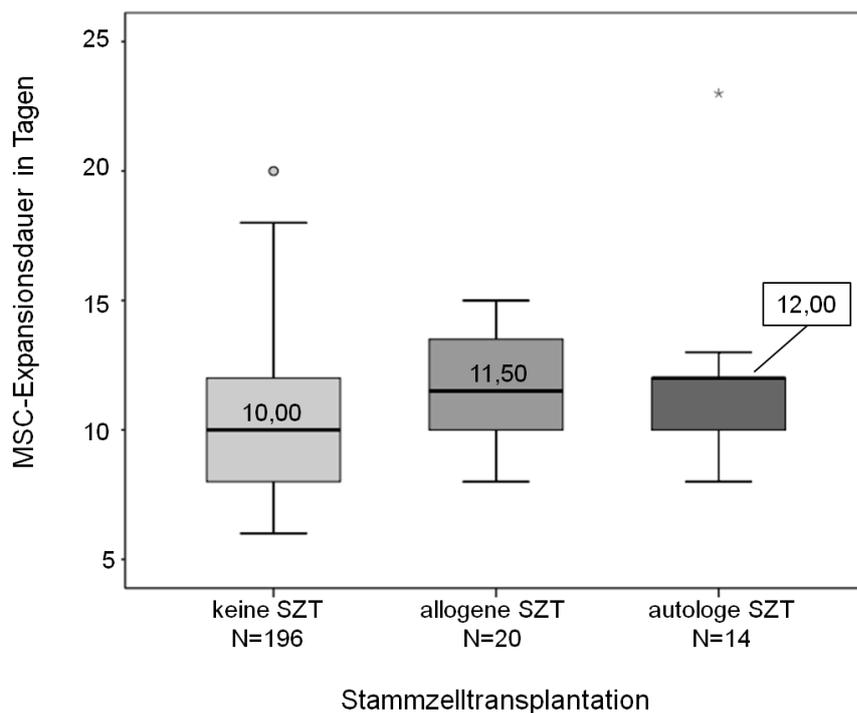


Abb. 12 - Analyse der MSC-Expansionsdauer nach SZT (Median inkl. SD und Ausreißer) .

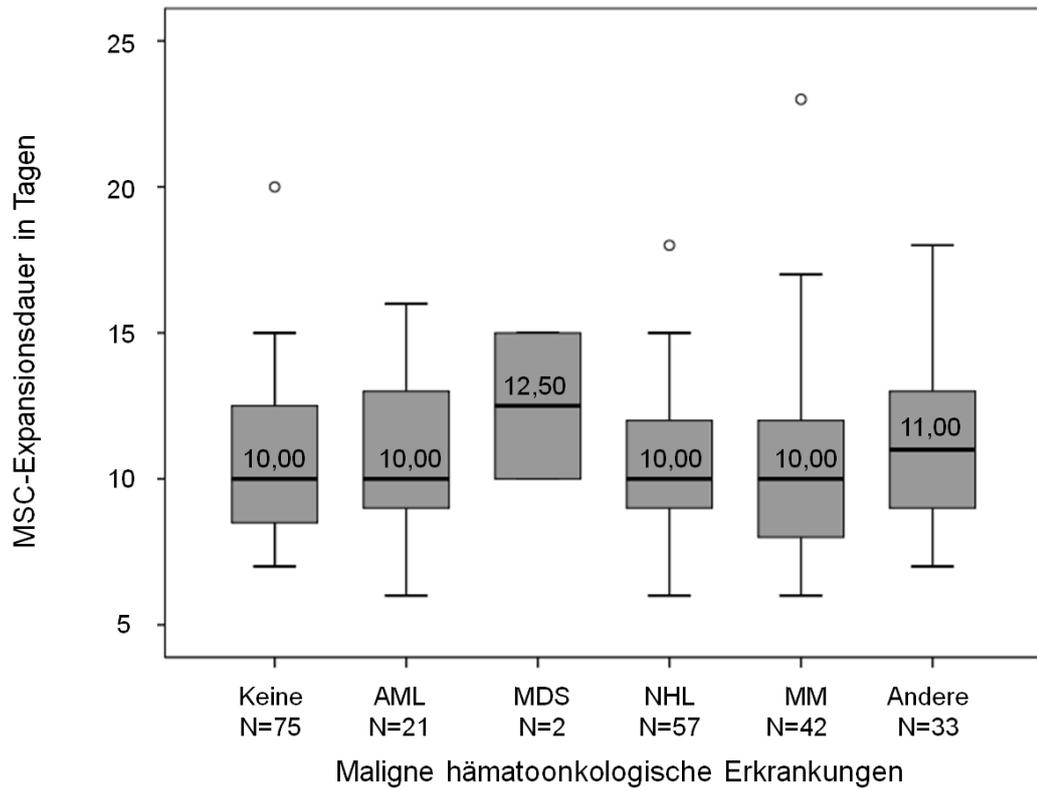


Abb. 13 - Mediane MSC-Expansionsdauer bei verschiedenen Erkrankungen; (Median inkl. SD und Ausreißer)

Tab. 9 - Deskriptive Analyse der MSC-Expansionsdauer

Expansionsdauer in Tagen					
		N	Mittelwert	SD	Signifikanz (p)
Geschlecht	Männlich	150	10,57	2,72	0,696
	Weiblich	80	10,71	2,63	
Alter In Jahren	<40	39	10,77	2,51	0,904
	≥ 40 - <60	78	10,64	2,75	
	≥60	113	10,55	2,72	
Erkrankung	Keine	75	10,56	2,51	0,711
	AML	21	10,71	2,76	
	MDS	2	12,50	3,54	
	NHL	57	10,35	2,49	
	MM	42	10,52	3,16	
	Andere	33	11,15	2,76	
Chemotherapie	Nein	114	10,59	2,64	0,869
	Ja	116	10,65	2,74	
Stammzell- transplantation	Keine SZT	196	10,42	2,64	0,042
	Allogene SZT	20	11,55	2,06	
	Autologe SZT	14	11,86	3,57	

4.4.2. Multifaktorielle Einfluss auf die MSC-Expansionsdauer

Um den gemeinsamen Einfluss der Variablen auf die Expansionsdauer zu analysieren, wurde eine Berechnung im Allgemeinen Linearen Modell durchgeführt (N=325).

Hierbei ließen sich keine signifikanten Interaktionen erkennen.

4.5. Spezifische Analyse des Einflusses von Stammzelltransplantation auf die Gewinnung von MSC

4.5.1. Vergleich der Gewinnung von MSC vor und nach Stammzelltransplantation

Einige der Probanden wurden aus diagnostischen Gründen oder zur Verlaufskontrolle ihrer Erkrankung mehrmals knochenmarkpunktiert (N=52). So war es möglich, Knochenmarkbefunde von Probanden vor und nach SZT miteinander zu vergleichen (N=21). 16 Probanden erhielten allogene Stammzellen, 5 wurden autolog transplantiert. Aufgrund des umfangreichen Datensatzes und der Erkenntnis, dass nach SZT signifikant weniger oft MSC aus dem KM gewonnen werden können, bietet diese Analyse die Möglichkeit die Dynamik dieses Prozesses zu verdeutlichen (siehe 4.2.1.). Die vorliegenden Daten sind als orientierende Untersuchungen anzusehen, detaillierte Darstellungen sollen in weiteren Studien folgen.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der MSC-Präsenz nach allogener SZT ($p=0,02$). Konnten vor Transplantation noch von 15 der 16 Probanden MSC isoliert werden, war dies nach der allogenen SZT nur noch bei 7 Probanden möglich. Auch nach autologer SZT reduzierten sich die erfolgreichen Isolationen um 50% ($p=0,197$).

Tab. 10 - MSC-Präsenz vor und nach allogener SZT

	Gewinnung von MSC	
	nicht erfolgreich	erfolgreich
vor allogener SZT (N= 16)	6,3% (N= 1)	93,8% (N= 15)
nach allogener SZT (N= 16)	56,3% (N= 9)	43,8% (N= 7)

Tab. 11 - MSC-Präsenz vor und nach autologer SZT

	Gewinnung von MSC	
	nicht erfolgreich	erfolgreich
vor autologer SZT (N= 5)	20% (N= 1)	80% (N= 4)
nach autologer SZT (N= 5)	60% (N= 3)	40% (N= 2)

4.5.2. Zellzahlanalyse vor und nach Stammzelltransplantation

Bei den sieben Probanden, bei denen sich nach allogener bzw. bei den zwei Probanden nach autologer Transplantation MSC gewinnen ließen, erfolgte die Auszählung der Anzahl MSC pro ml KM zur Beurteilung der Proliferationskapazität. Bei der Analyse muss die geringe Probandenzahl beachtet werden, ein gewisser Einfluss ist dennoch erkennbar. Nach allogener SZT konnten im Mittel durchschnittlich ca. 1400 weniger Zellen pro ml KM isoliert werden. ($T = 1,154$; $p = 0,29$).

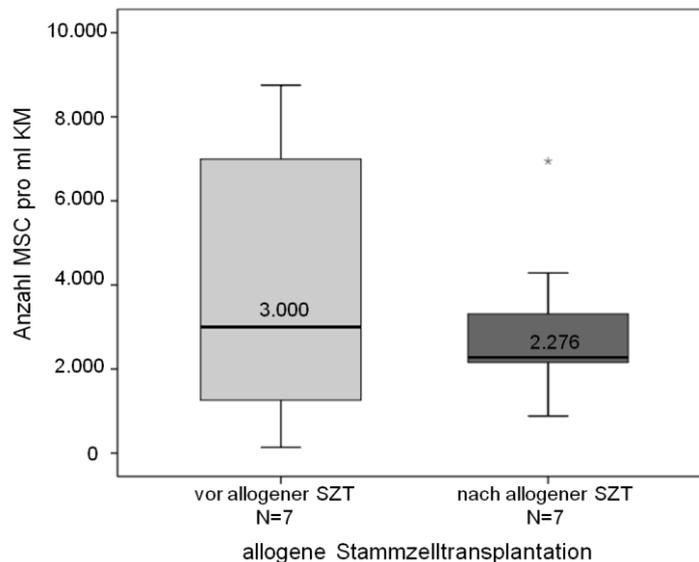


Abb. 14 - Anzahl MSC pro ml KM vor und nach allogener SZT (rein deskriptive Darstellung; inklusive Median, SD und Ausreißer)

Nach autologer SZT konnten im Mittel durchschnittlich ca. 2940 mehr Zellen pro ml KM isoliert werden. ($T = -630$; $p = 0,64$).

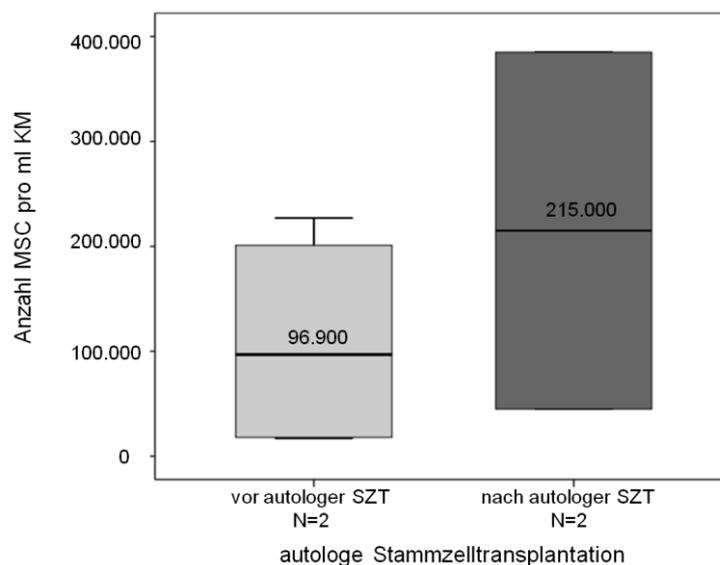


Abb. 15 - Anzahl MSC pro ml KM vor und nach autologer SZT (rein deskriptive Darstellung; inklusive Median, SD und Ausreißer)

4.5.3. Analyse der MSC-Expansionsdauer vor und nach Stammzelltransplantation

Die Expansionsdauer wurde als Maß für die Wachstumskinetik der Zellen erfasst. Nach allogener SZT verlängerte sich die Dauer bis zur Expansion von MSC im Mittel um ca. 2,6 Tage ($T = -2,47$; $p = 0,049$). Nach autologer SZT mussten MSC im Mittel 1,5 Tage kürzer kultiviert werden ($T = 3,0$; $p = 0,21$). Auch hier ist die geringe Probandenzahl zu beachten.

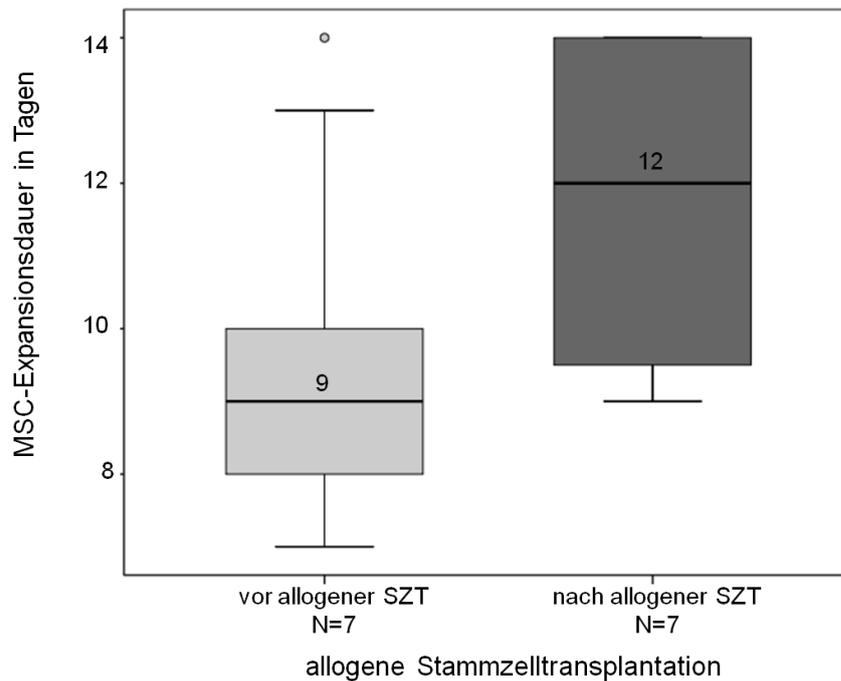


Abb. 16 - Mediane MSC-Expansionsdauer in Tagen vor und nach allogener SZT (rein deskriptive Darstellung; inklusive Median, SD und Ausreißer)

5 DISKUSSION

5.1. Wesentliche Ergebnisse der Studie

Durch Auswerten des umfangreichen Datensatzes (328 KM-Punktionen) ist es möglich, verschiedene Faktoren zu benennen, die Einfluss auf die Gewinnung von MSC aus dem humanen KM haben und somit bei Therapiekonzepten und Risikoprofilen beachtet werden sollten.

Die Parameter weibliches Geschlecht, höheres Lebensalter, Vorliegen von AML oder MDS und Zustand nach Chemotherapie oder SZT erniedrigten die Chance auf erfolgreiche Gewinnung von MSC signifikant. MSC von älteren, beziehungsweise an verschiedenen Erkrankung leidenden Menschen zeigten Defizite in ihrer KM-Präsenz. Zellen von jungen, gesunden Spendern scheinen daher zur therapeutischen Anwendung besser geeignet.

Die Zellzahl zeigte sich beim Vorliegen folgender Parameter jeweils erniedrigt: Alter zwischen 40-60 Jahren, männliches Geschlecht, sowie Zustand nach Chemo- oder Stammzelltherapie.

Die Untersuchungen zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Expansionsdauer von MSC unter Berücksichtigung der verschiedenen Faktoren, es ist also von einer relativ konstanten Wachstumskinetik der Zellen auszugehen.

Die Endpunkte Zellzahl und Expansionsdauer unterliegen subjektiven Fehlern, die Gewinnung von MSC, welche der MSC-Präsenz im KM entspricht, hingegen kann als valides Kriterium zur Beurteilung der Zellen angesehen werden.

Im Folgendem werden die analysierten Einzelfaktoren bezüglich ihrer Aussagekraft diskutiert und den Ergebnissen anderer Studien gegenüber gestellt.

5.2. Einflussfaktor Alter

Die vorliegenden Untersuchungen beschreiben einen negative Einfluss höheren Lebensalters auf die Quantität von MSC und bestätigen somit die Beobachtungen von Shamsul et al. (Shamsul et al. 2004).

Mit zunehmenden Probandenalter ließen sich seltener MSC aus dem KM gewinnen. Die Anzahl MSC pro ml sank mit jedem Lebensjahr um 1253 Zellen. Die geringste Zellzahl konnte bei Patienten im Alter zwischen 40 und 60 Jahren ermittelt werden, im höheren Alter stieg sie wieder leicht an. Dies könnte möglicherweise darin begründet sein, das Probanden hören Alters mit weniger aggressiven Therapien behandelt wurden. Die Expansionsdauer der Zellen hingegen scheint durch das Alter nicht beeinflusst zu werden.

Interessant ist, ob der Alterungsprozess der MSC und damit die Qualität der hämatopoetischen Nische durch äußere und innere Einflüsse gesteuert werden kann, denn wie in der Literatur bereits beschrieben, unterliegt auch die Fähigkeit zur Immunmodulation altersbedingten Veränderungen (Wu et al. 2014). Genetische Veränderungen, DNA-Schädigungen und oxidativer Stress innerhalb der Stammzellnische konnten bereits als Ursachen des Alterungsprozesses ausgemacht werden (Beausejour 2007). Diese Einschränkungen in Quantität und Qualität der Zellen können den Erfolg autologer Transplantationsansätze mit MSC möglicherweise schmälern. Für allogene Therapien mit MSC scheinen damit jüngere Zellspender besser geeignet.

Desweiteren stellt sich die Frage, ob die Reduktion von MSC im KM das Entstehen maligner Erkrankungen begünstigt. Gealterte MSC zeigen in vitro einen Qualitätsverlust, der sich in einer eingeschränkten Fähigkeit zur Selbsterneuerung und multipotenten Differenzierung widerspiegelt (Gharibi et al. 2014; Stolzing et al. 2008; Beausejour 2007). Es zeigten sich im Tierversuch Veränderungen in Morphologie, Lebens- und Kultivierungsdauer, Migrationsverhalten und Expressionsmuster, zusätzlich zeigte sich ein schlechteres Differenzierungspotential (Wang et al. 2013b). Verschiedene Einflüsse, wie beispielsweise oxidativer Stress scheinen das Altern der MSC zu begünstigen (Raggi u. Berardi 2012; Brandl et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich MSC prinzipiell auch noch in hohen Lebensalter aus dem KM gewinnen lassen, die Rate an erfolgreichen Isolationen jedoch bei jungen Probanden deutlich höher liegt und diese somit als MSC-Spender von besonderem Interesse sind.

5.3. Einflussfaktor Geschlecht

Die Analysen zeigten einen signifikanten Unterschied in der Gewinnung von MSC aus dem KM von Frauen und Männer. Bei weiblichen Probanden lag die MSC-Isolationsrate 14,3 % unter der Rate der männlichen Vergleichsgruppe. Die absolute Anzahl der zu isolierenden Zellen war hingegen bei den Probandinnen deutlich höher. Die Positionierungen in der gegenwärtigen Literatur über den Zusammenhang von Geschlecht und Präsenz bzw. Funktionalität der MSC sind kontrovers.

Einige Autoren konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede erkennen (Shamsul et al. 2004), andere Studien hingegen bestätigen die dargestellten Differenzen. So berichteten Wang et al., sowie Strube et al. über die eingeschränkte Gewinnung von MSC bei Frauen (Wang et al. 2013b; Strube et al. 2009). Auch im Mausmodell wurde eine höhere MSC Dichte in männlichen Mäusen beschrieben (Katsara et al. 2011).

Crisostomo et al. hingegen zeigten im Mausmodell, dass weibliche MSC weniger Apoptosen, TNF und IL-6 aufweisen und somit resistenter gegenüber Stress sind (Crisostomo et al. 2007). Östrogene wirken sich laut Aussage mehrerer Studien positiv auf die Proliferation von MSC aus (Breu et al. 2011) (Hong et al. 2011). Generell ist zu sagen, dass Östrogen die Proliferation von MSC zu steigern scheint (Hong et al. 2009). Sinkende Östrogenspiegel im Alter erklären möglicherweise die schlechteren Isolationsraten bei älteren Frauen.

5.4. Einflussfaktor maligne Erkrankung

Der große Datensatz ermöglicht es, den Einfluss verschiedener Erkrankungen auf das Verhalten von MSC zu untersuchen. Alle in der vorliegenden Arbeit erfassten Erkrankungen reduzierten die Anzahl der MSC pro ml KM.

Besonderes Interesse ist dabei den hämatologischen Malignomen AML und MDS zu widmen. AML und MDS sind Erkrankungen der multipotenten Stammzelle und charakterisiert durch eine ineffektive Hämatopoese (Bernasconi 2008).

Die schlechte Gewinnung von MSC aus dem KM von AML-Patienten und die stark reduzierte Zellzahl pro ml KM lassen vermuten, dass die Pathophysiologie dieser Leukämieform und die Funktionalität der mesenchymalen Stromazellen in engem Zusammenhang stehen. Blau et al. beschrieben 2011, dass genetische Veränderungen in MSC die Expansion maligner Zellen erleichtern und so möglicherweise ihren Teil zur Entstehung von Leukämien beitragen (Blau et al. 2011). Auch Zhao et al. beschrieben Veränderungen der Zellbiologie in den von AML-Patienten stammenden MSC, wie beispielsweise Einschränkungen in der Proliferationskapazität und in der Aufrechterhaltung der Hämatopoese (Zhao et al. 2007). Das funktionsfähige MSC aber auch in der Lage sind spontane und induzierte Apoptosen zu verhindern, sowie die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika abzumildern zeigten Konopleva et al. Sie beobachteten bei Kokultivierung von Leukämiezellen mit murinen funktionsfähigen MSC eine niedrigere Apoptoserate von MSC (Konopleva et al. 2002).

Neben der AML war auch bei Patienten mit MDS eine signifikant niedrigere MSC-Präsenz erkennbar. Meydounf beschrieb eine Programmierung der MSC durch MDS-Zellen, welche die Ausbreitung der Erkrankung im KM ermöglicht (Meydounf et al. 2014). MSC von Patienten mit MDS zeigten auch in andern Studien ein reduziertes Proliferationspotenzial (Klaus et al. 2010) und eine geringere Fähigkeiten zur osteogenen und adipogenen Differenzierung (Pavlaki et al. 2014). Die Arbeitsgruppe um Blau et al. beschrieb, dass MSC von Patienten mit AML bzw. MDS spezifische chromosomale Veränderungen aufweisen, die eine Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen spielen könnten (Blau et al. 2007).

Chromosomale Aberrationen und genetische Mutationen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von AML und MDS, aber auch die hämatopoetische Nische trägt ihren Teil zu Pathogenese bei (Blau et al. 2011). Die zentrale Komponente dieser Nische sind MSC. Sie kontrollieren den korrekten Ablauf der Hämatopoese durch Produktion sowie Sekretion von Zytokinen und extrazellulärer Matrix. Die Regulation erfolgt zum einen durch direkte Interaktion mit HSC, zum anderen indirekt durch

Sekretion von Regulationsmolekülen, welche sich wiederum positiv oder negativ auf das Wachstum der HSC auswirken (Konopleva et al. 2009). So wurde beispielsweise beobachtet, dass AML-MSC eine niedrigere Konzentration an MCP-1 (monocyte chemoattractant protein -1) produzieren, welches die Migration von Monozyten und Makrophagen steuert und so protektiv gegen die Entstehung von Malignomen wirkt. Kommt es zu Störungen dieses sensiblen Gefüges, kann die Entstehung von Malignomen begünstigt werden (Huang et al. 2015).

Ob die Veränderungen der MSC bei hämatologischen Erkrankungen primär oder sekundär sind ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Da die Zellen in Interaktion mit der hämatopoetischen Nische stehen, scheint es möglich, dass Defekte auf beiden Seiten zum Auftreten maligner hämatologischer Erkrankungen führen können. Zum besseren Verständnis pathophysiologischer Mechanismen verschiedener Erkrankungen ist es wichtig, genauere Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen HSC und MSC zu erlangen.

Es lässt sich schlussfolgern, dass MDS/ AML-Patienten besonders von einer allogenen MSC-Transplantation profitieren würden. Das Wissen über die schlechtere Qualität und niedrigere Quantität der Zellen bei diesen Patienten, kann das Versagen autologer Therapieansätze möglicherweise verhindern. Ziel weiterer Forschung ist es in Studien zu analysieren, ob die gesetzten Schädigungen im zeitlichen Verlauf reversibel sind.

Durch Erkrankungen wie ALL, NHL, und CML scheinen MSC weniger geprägt zu werden, es konnten bislang keine eindeutigen Veränderungen in der Zellbiologie beobachtet werden (Zhao et al. 2006 und 2007). Dies eröffnet neue Therapieansätze für die autologe MSC-Transplantation bei dieser Patientengruppe.

Wie Eingangs beschrieben, wurde für die statistische multifaktorielle Analyse eine Modellbereinigung durchgeführt, um den positiven Vorhersagewert für eine erfolgreiche MSC-Gewinnung zu optimieren. Dabei ist der Datensatz um 3 Fälle bereinigt worden. Interessanterweise lag in zwei dieser Fälle eine Aplastische Anämie (AA) vor, eine seltene Erkrankung bei der es durch Störungen der Knochenmarkfunktion zu einer Panzytopenie kommt (Svinareva et al. 2009). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass bei dieser Erkrankung neben einer Schädigung der HSC möglicherweise auch die Funktionalität von MSC beeinträchtigt ist. Veränderungen der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von AA-MSC wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Kastrinaki et al. 2013) (Chao et al. 2010). Auch Li et al. beschrieben eine reduzierte Proliferationsrate von MSC bei Patienten mit Aplastischer Anämie (Li et al. 2012).

5.5. Einflussfaktor Chemotherapie

Die Untersuchungen zeigten, dass nach Chemotherapie die Rate der erfolgreichen Gewinnung von MSC, gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Therapie, um 10 % niedriger lag (34,8 % vs. 24 %). In der multifaktoriellen Analyse bestätigte sich der negative Einfluss der zytotoxischen Substanzen. Die Zellzahl war bei Probanden nach Chemotherapie im Mittel auf die Hälfte reduziert.

Zum Einfluss von Chemotherapeutika auf das Verhalten von MSC sind in der Literatur bisher widersprüchliche Angaben zu finden. Einige Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass MSC relativ resistent gegen chemotherapieassoziierte Apoptoseinduktion sind (Mueller et al. 2006). Resistenzen gegenüber spezifischen Substanzen, wie Doxorubicin (Cruet-Hennequart et al. 2012) oder Cisplatin (Prendergast et al. 2011), aber auch gegenüber Radiotherapie (Prendergast et al. 2011; Sugrue et al. 2013) wurden bereits beschrieben. Andere Arbeitsgruppen gehen hingegen von einem signifikant schädlichen Einfluss der Chemotherapeutika aus. Unter Therapie mit Cyclophosphamid, Melphalan (Kemp et al. 2011) oder Hochdosis Cytarabin konnte eine Abnahme der CFU-F-Proliferation beobachtet werden (Ben-Ishay u. Barak 2001). Vor allem Hochdosis-Chemotherapie scheint das MSC-Wachstum negativ zu beeinflussen (Kemp et al. 2010). Buttiglieri et al. berichteten von irreparablen Telomerverkürzungen in MSC nach Chemotherapie (Buttiglieri et al. 2011). Auch die Therapie mit Immunsuppressiva kann sich auf die Zellproliferation auswirken (Wang et al. 2013b; Ma et al. 2014). Azathioprin beispielsweise hemmt das Wachstum und steigert die Zellapoptose (Huang et al. 2014).

Einzelne Substanzen scheinen demnach einen spezifischen Effekt auf MSC zu haben. So konnten die vorliegenden Analysen einen signifikant niedrigere Rate an MSC-Isolationen nach Therapie mit Daunorubicin beobachten. Auch Li et al. zeigten, dass die zu den Anthrazyklinen gehörende Substanz die Apoptose von MSC induziert (Li et al. 2010). Daunorubicin wird vor allem zur Behandlung akuter Leukämien eingesetzt. Wie schon ausführlich erläutert scheinen MSC vor allem bei der myeloischen Form der akuten Leukämie eine wichtige Rolle zu spielen.

Der spezifische Einfluss einzelner Zytostatika lässt sich allerdings nur schwer nachweisen, da häufig Kombinationen verschiedener Präparate in unterschiedlichen Dosierungen verabreicht werden.

Es gilt zu klären ob durch Pharmaka verursachte Schäden an MSC regeneriert werden können, welchen Zeitraum dieser Prozess in Anspruch nimmt und ob er durch bestimmte Konditionen von außen beeinflusst werden kann. Es ist bislang nicht eindeutig geklärt, ob spezifische Zelleigenschaften, wie beispielsweise

Immunmodulation oder die Fähigkeit zur Differenzierung überhaupt ein Regenerationspotential besitzen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MSC wahrscheinlich relativ resistent gegenüber Schädigungen durch Zytostatika sind, dass ihre Funktionalität u.a. ihr Differenzierungspotential (Alves et al. 2010) jedoch durch Langzeit-Chemotherapie und spezielle Substanzen beeinträchtigt werden kann (Wang et al. 2013b).

5.6. Einflussfaktor Stammzelltransplantation

In der gegenwärtigen Literatur existieren bislang nur wenige Daten über das Verhalten von MSC vor und nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MSC nach HSC-Transplantation vom Empfänger stammen (Wang et al. 2013a). Vergleichende Untersuchungen von Präsenz und Eigenschaften von MSC vor und nach Transplantation eines jeweiligen Probanden sind deshalb von besonderem Interesse und versprechen neue Erkenntnisse über das Verhalten dieser Zellen.

Die vorliegenden Analysen konnten deutlich zeigen, dass sich nach SZT beim gleichen Probanden seltener MSC aus dem KM gewinnen ließen, als vor der Therapie. Nach allogener SZT konnte eine niedrigere Anzahl von MSC pro ml KM, sowie eine verlängerte Expansionsdauer während der *in vitro* Kultivierung beobachtet werden.

Dies sind orientierende Ergebnisse, die weitere Nachbeobachtungen spannend machen, unter anderem auch um ein mögliches Regenerationspotential der Stammzellnische und damit der MSC-Gewinnung zu erkennen. Fragen nach Regenerationsdauer, sowie externer und interner Beeinflussung dieser könnten dadurch bald beantwortet werden. In einer Arbeit von Ding et al konnte gezeigt werden, dass die Quantität von MSC nach allogener SZT reduziert ist, sich jedoch nach 9 Monaten eine Erholung auf das Ausgangsniveau einstellt (Ding et al. 2014).

Die Erkenntnis, dass die körpereigenen Reserven an MSC nach SZT geschwächt sind, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für die schon Eingangs beschriebene Co-Transplantation von MSC und HSC dar. Es besteht die Hoffnung dadurch Komplikationen der Transplantation wie die GVHD zu vermeiden und die Etablierung der neuen Hämatopoese zu beschleunigen (Aksu et al. 2008). Wichtig ist dabei die Bedingungen und Durchführung der Stammzellübertragung zu verbessern, da bisherige Studien zeigen konnten, dass nach MSC-Transplantation nur ein geringer Teil der transplantierten Zellen im KM des Empfängers nachweisbar sind (Allers et al. 2004), (Miura et al. 2013). Zusätzlich scheint die Überlebensdauer von Spender-MSK zeitlich begrenzt zu sein (Ball et al. 2007). Trotz des temporären Einflusses stellt die allogene oder third party Transplantation von MSC einen viel versprechenden Therapieansatz dar. Hierfür bedarf es weiterer klinischer Studien.

5.7. Stärken und Schwächen der Studie

Das Herausstellungsmerkmal der vorliegenden Studie stellt die hohe Fallzahl mit 328 analysierten Probanden dar. Bislang fehlen Arbeiten mit einem vergleichbar großem Probandenkollektiv.

Auf Grund der ungenügenden in vivo Charakterisierung von MSC bietet die erstellte Datenbank, durch ihre umfangreiche Analyseparameter, die Möglichkeit das Verhalten von MSC besser zu verstehen. Es erfolgte eine sorgfältige und homogene Datenerhebung, wodurch die Daten gut strukturierbar sind.

Die durchgeführten Analysen zur Isolierung von MSC aus dem KM erbrachten signifikante Ergebnisse. Diese sind dank der eingehaltenen Standardbedingungen zur MSC-Kultivierung gut mit anderen internationalen Studien vergleichbar.

Aus den präsentierten Resultaten haben sich neue Forschungsansätze ergeben, die bereits in der Arbeitsgemeinschaft der Klinik für Innere Medizin IV geprüft werden.

Bei der Wertung der vorliegenden Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass es sich um retrospektive Analysen handelt und Kausalzusammenhänge nicht immer eindeutig zu klären sind.

Es wurde versucht den Einfluss einzelner Zytostatika auf die Isolierbarkeit von MSC nachzuweisen. Dies ist nur schwer möglich, da häufig eine Kombinationstherapie aus verschiedenen Präparaten in unterschiedlichen Dosierungen verabreicht wurde und so der Einfluss von Einzelsubstanzen nur eingeschränkt zu beurteilen ist.

Eine weitere Limitation ist die ungleichmäßige Altersverteilung im Probandenkollektiv, zu Gunsten der über 60 Jährigen. Zum Ausgleich der Altersstrukturen wäre beispielsweise eine Zusammenarbeit mit der pädiatrischen Onkologie denkbar.

Bei der Auswertung der MSC-Analysen vor und nach SZT ist zu beachten, dass hier nur eine geringe Fallzahl vorlag und das gewisse Störgrößen wie beispielsweise das Verabreichen unterschiedlicher Hochdosis-Chemotherapie keine Beachtung fanden. Um hierzu bessere Aussagen treffen zu können läuft in der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums Halle/Wittenberg aktuell eine weitere Studie auf Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Die entsprechenden Laborarbeiten zur Gewinnung und Charakterisierung der MSC unterlagen einer gewissen Subjektivität. Die Passage der Zellen erfolgte bei Semikonfluenz der CFU-F, Schwankungen der Expansionsdauer sind daher als Folge von Laborabläufen und Personalarbeitszeiten einzuräumen. Desweiteren ist mit einer Varianz der Anzahl MSC pro ml/KM zu rechnen, da die Aspiration des KM durch unterschiedliche Ärzte und die Kultivierung durch wechselndes Laborpersonal erfolgte.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die MSC-Präsenz, welche der Proliferation von CFU-F entspricht und somit klar definiert ist, als Endpunkt zur Beurteilung der Quantität von MSC gut geeignet ist. Die Parameter Anzahl MSC pro ml KM, sowie Expansionsdauer hingegen unterliegen subjektiven Schwankungen und sind somit in ihrer Aussagekraft in gewissem Maße eingeschränkt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) sind Teil der Knochenmarknische. Ihre funktioneller Rolle bei der gesunden Hämatopoese, malignen hämatologischen Erkrankungen, sowie ihr therapeutischer Nutzen sind Gegenstand aktueller Forschung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss verschiedener probandenabhängiger Faktoren auf die Präsenz von MSC im humanen KM zu analysieren. Hierfür erfolgte die Erstellung einer Datenbank und die retrospektive statistische Auswertung eines großen Probandenkollektivs (N=328).

Es wurde der Einfluss der Faktoren Alter, Geschlecht, maligne Erkrankung, Chemotherapie und SZT auf die Endpunkte MSC-Präsenz (entspricht dem Nachweis von CFU-F), Anzahl MSC/ml KM, sowie Expansionsdauer untersucht.

Es zeigte sich, dass bei Frauen signifikant seltener MSC gewonnen werden konnten als bei Männern ($p=0,006$). Auch das Alter beeinflusste die Isolierbarkeit von MSC; mit steigendem Probandenalter ließen sich MSC schlechter aus dem KM isolieren ($p=0,015$). Maligne hämatopoetische Neoplasien wirkten sich negativ auf die Gewinnung von MSC aus, besonders herauszustellen sind dabei AML und MDS, deren Vorliegen mit einer signifikant reduzierten Isolierbarkeit einherging. Nach Vorbehandlung durch SZT und in gewissem Maße auch durch Chemotherapie ließen sich seltener MSC isolieren. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der MSC-Präsenz nach allogener SZT ($p= 0,02$). Orientierende vergleichende Untersuchungen vor und nach SZT eines jeweiligen Probanden zeigten einen deutlichen Rückgang der MSC-Präsenz nach Transplantation von Blutstammzellen.

Die durchschnittlich isolierbare Zellzahl unter allen Fällen lag bei 21.340 pro ml KM. Alle genannten Faktoren wirkten sich negativ auf die Anzahl der Zellen und damit ihre Vermehrungskapazität aus.

Die Expansionsdauer lag im Median bei 10 Tagen. Nach SZT zeigte sich der Zeitraum bis zur Semikonfluenz einer CFU-F signifikant verlängert.

Der nachgewiesene geschlechtsspezifische Unterschied bei der Gewinnung von MSC wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert und kann Ausdruck einer möglichen hormonellen Regulation der Knochenmarknische sein. Die Beeinflussbarkeit durch das Alter deutet auf eine altersbedingte Schädigung des Zellgefüges hin. Gegenüber Zytostatika scheinen MSC relativ resistent zu sein, Langzeit-Chemotherapie und spezielle Substanzen können die sensible Nische jedoch schädigen. Der spezifische Einfluss von Stammzelltransplantationen auf die Präsenz von MSC stellt einen interessanten Forschungsansatz dar und verspricht ein besseres Verständnis über die Rolle von MSC in der Knochenmarknische.

Die gewonnenen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass zur therapeutischen Anwendung von MSC vor allem allogene Ansätze mit jungen, gesunden Spendern geeignet sind.

Ziel weiterer Forschung ist es zu klären ob die Einschränkungen der Zellproliferation nach Erkrankung und Therapie im zeitlichen Verlauf reversibel sind und in wieweit gewisse Funktionen der MSC Regenerationspotential besitzen. In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe wird aktuell, durch Nachbeobachtung der hier analysierten Probanden, evaluiert ob und nach welcher Zeit die Präsenz und Vermehrungskapazität von MSC nach SZT regeneriert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Isolierbarkeit von MSC und damit die Präsenz von MSC im KM gut zur Beurteilung der Zellquantität geeignet ist. Die isolierte Zellzahl als Maß für die Proliferationskapazität, sowie die Expansionsdauer zum Abschätzen der Wachstumskinetik hingegen unterliegen zahlreichen Einflüssen und haben daher eine geringere Aussagekraft.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aggarwal, S. u. Pittenger, M. F. (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105 (4): 1815–1822.

Aksu, A. E.; Horibe, E.; Sacks, J.; Ikeguchi, R.; Breitingner, J.; Scozio, M.; Unadkat, J. u. Feili-Hariri, M. (2008): Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 127 (3): 348–358.

Allers, C.; Sierralta, W. D.; Neubauer, S.; Rivera, F.; Minguell, J. J. u. Conget, P. A. (2004): Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* 78 (4): 503–508.

Alves, H.; Munoz-Najar, U.; Wit, J. de; Renard, Auke J S; Hoeijmakers, Jan H J; Sedivy, J. M.; van Blitterswijk, C. u. Boer, J. de (2010): A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 14 (12): 2729–2738.

Anderson, D. J.; Gage, F. H. u. Weissman, I. L. (2001): Can stem cells cross lineage boundaries? *Nature medicine* 7 (4): 393–395.

Anghileri, E.; Marconi, S.; Pignatelli, A.; Cifelli, P.; Galie, M.; Sbarbati, A.; Krampera, M.; Belluzzi, O. u. Bonetti, B. (2008): Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 17 (5): 909–916.

Aurich, I.; Mueller, L. P.; Aurich, H.; Luetzkendorf, J.; Tisljar, K.; Dollinger, M. M.; Schormann, W.; Walldorf, J.; Hengstler, J. G.; Fleig, W. E. u. Christ, B. (2007): Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56 (3): 405–415.

Ball, L. M.; Bernardo, M. E.; Roelofs, H.; Lankester, A.; Cometa, A.; Egeler, R. M.; Locatelli, F. u. Fibbe, W. E. (2007): Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 110 (7): 2764–2767.

Beausejour, C. (2007): Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence. *Handbook of experimental pharmacology* (180): 67–88.

- Ben-Ishay, Z. u. Barak, V. (2001): Bone marrow stromal dysfunction in mice administered cytosine arabinoside. *European journal of haematology* 66 (4): 230–237.
- Bernasconi, P. (2008): Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions-a review. *British Journal of Haematology* 142 (5): 695–708.
- Blau, O.; Baldus, C. D.; Hofmann, W.-K.; Thiel, G.; Nolte, F.; Burmeister, T.; Turkmen, S.; Benlasfer, O.; Schumann, E.; Sindram, A.; Molkentin, M.; Mundlos, S.; Keilholz, U.; Thiel, E. u. Blau, I. W. (2011): Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood* 118 (20): 5583–5592.
- Blau, O.; Hofmann, W.-K.; Baldus, C. D.; Thiel, G.; Serbent, V.; Schumann, E.; Thiel, E. u. Blau, I. W. (2007): Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Experimental hematology* 35 (2): 221–229.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21(Suppl. 97):77-89, 1968.
- Brandl, A.; Meyer, M.; Bechmann, V.; Nerlich, M. u. Angele, P. (2011): Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* 317 (11): 1541–1547.
- Breu, A.; Sprinzing, B.; Merkl, K.; Bechmann, V.; Kujat, R.; Jenei-Lanzl, Z.; Prantl, L. u. Angele, P. (2011): Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29 (10): 1563–1571.
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N.; Ricalton, N. S.; Mosca, J. D.; Kraus, K. H. u. Kadiyala, S. (1998): Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clinical orthopaedics and related research* (355 Suppl): S247-56.
- Buttiglieri, S.; Ruella, M.; Risso, A.; Spatola, T.; Silengo, L.; Avvedimento, E. V. u. Tarella, C. (2011): The aging effect of chemotherapy on cultured human mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 39 (12): 1171–1181.
- Caplan, A. I. (1991): Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5): 641–650.
- Chao, Y.-H.; Peng, C.-T.; Harn, H.-J.; Chan, C.-K. u. Wu, K.-H. (2010): Poor potential of proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells derived from children with severe aplastic anemia. *Annals of hematology* 89 (7): 715–723.

- Crisostomo, P. R.; Wang, M.; Herring, C. M.; Markel, T. A.; Meldrum, K. K.; Lillemoe, K. D. u. Meldrum, D. R. (2007): Gender differences in injury induced mesenchymal stem cell apoptosis and VEGF, TNF, IL-6 expression: role of the 55 kDa TNF receptor (TNFR1). *Journal of molecular and cellular cardiology* 42 (1): 142–149.
- Cruet-Hennequart, S.; Prendergast, A. M.; Shaw, G.; Barry, F. P. u. Carty, M. P. (2012): Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells. *International journal of hematology* 96 (5): 649–656.
- da Silva Meirelles, Lindolfo; Caplan, A. I. u. Nardi, N. B. (2008): In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (9): 2287–2299.
- da Silva Meirelles, Lindolfo; Chagastelles, P. C. u. Nardi, N. B. (2006): Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 119 (Pt 11): 2204–2213.
- Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P. D.; Matteucci, P.; Grisanti, S. u. Gianni, A. M. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99 (10): 3838–3843.
- Ding, L.; Zhu, H.; Yang, Y.; Wang, Z.-D.; Zheng, X.-L.; Yan, H.-M.; Dong, L.; Zhang, H.-H.; Han, D.-M.; Xue, M.; Liu, J.; Zhu, L.; Guo, Z.-K. u. Wang, H.-X. (2014): Functional mesenchymal stem cells remain present in bone marrow microenvironment of patients with leukemia post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia & lymphoma*.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D. u. Horwitz, E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4): 315–317.
- Duijvestein, M.; Vos, Anne Christine W; Roelofs, H.; Wildenberg, M. E.; Wendrich, B. B.; Verspaget, H. W.; Kooy-Winkelaar, Engelina M C; Koning, F.; Zwaginga, J. J.; Fidler, H. H.; Verhaar, A. P.; Fibbe, W. E.; van den Brink, Gijs R u. Hommes, D. W. (2010): Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59 (12): 1662–1669.
- Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K. u. Lalykina, K. S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3 (4): 393–403.

Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I. u. Frolova, G. P. (1968): Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6 (2): 230–247.

Gharibi, B.; Farzadi, S.; Ghuman, M. u. Hughes, F. J. (2014): Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio).

Grisendi, G.; Bussolari, R.; Cafarelli, L.; Petak, I.; Rasini, V.; Veronesi, E.; Santis, G. de; Spano, C.; Tagliazzucchi, M.; Barti-Juhasz, H.; Scarabelli, L.; Bambi, F.; Frassoldati, A.; Rossi, G.; Casali, C.; Morandi, U.; Horwitz, E. M.; Paolucci, P.; Conte, P. u. Dominici, M. (2010): Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer research* 70 (9): 3718–3729.

Hakkarainen, T.; Sarkioja, M.; Lehenkari, P.; Miettinen, S.; Ylikomi, T.; Suuronen, R.; Desmond, R. A.; Kanerva, A. u. Hemminki, A. (2007): Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antitumor activity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors. *Human gene therapy* 18 (7): 627–641.

Hong, L.; Sultana, H.; Paulius, K. u. Zhang, G. (2009): Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 114 (3-5): 180–185.

Hong, L.; Zhang, G.; Sultana, H.; Yu, Y. u. Wei, Z. (2011): The effects of 17-beta estradiol on enhancing proliferation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro. *Stem cells and development* 20 (5): 925–931.

Huang, H.-R.; Zan, H.; Lin, Y. u. Zhong, Y.-Q. (2014): Effects of azathioprine and infliximab on mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of rats in vitro. *Molecular medicine reports* 9 (3): 1005–1012.

Huang, J. C.; Basu, S. K.; Zhao, X.; Chien, S.; Fang, M.; Oehler, V. G.; Appelbaum, F. R. u. Becker, P. S. (2015): Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration. *Blood Cancer Journal* 5 (4): e302.

Jiang, P.-C.; Xiong, W.-P.; Wang, G.; Ma, C.; Yao, W.-Q.; Kendell, S. F.; Mehling, B. M.; Yuan, X.-H. u. Wu, D.-C. (2013): A clinical trial report of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine* 6 (1): 140–146.

Jorgensen, C. u. Noel, D. (2011): Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases. *Regenerative medicine* 6 (6 Suppl): 44–51.

- Kadivar, M.; Khatami, S.; Mortazavi, Y.; Shokrgozar, M. A.; Taghikhani, M. u. Soleimani, M. (2006): In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 340 (2): 639–647.
- Kassis, I.; Zangi, L.; Rivkin, R.; Levdansky, L.; Samuel, S.; Marx, G. u. Gorodetsky, R. (2006): Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone marrow transplantation* 37 (10): 967–976.
- Kastrinaki, M.-C.; Pavlaki, K.; Batsali, A. K.; Kouvidi, E.; Mavroudi, I.; Pontikoglou, C. u. Papadaki, H. A. (2013): Mesenchymal stem cells in immune-mediated bone marrow failure syndromes. *Clinical & developmental immunology* 2013: 265608.
- Katsara, O.; Mahaira, L. G.; Iliopoulou, E. G.; Moustaki, A.; Antsaklis, A.; Loutradis, D.; Stefanidis, K.; Baxevanis, C. N.; Papamichail, M. u. Perez, S. A. (2011): Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 20 (9): 1549–1561.
- Kemp, K.; Morse, R.; Sanders, K.; Hows, J. u. Donaldson, C. (2011): Alkylating chemotherapeutic agents cyclophosphamide and melphalan cause functional injury to human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Annals of hematology* 90 (7): 777–789.
- Kemp, K.; Morse, R.; Wexler, S.; Cox, C.; Mallam, E.; Hows, J. u. Donaldson, C. (2010): Chemotherapy-induced mesenchymal stem cell damage in patients with hematological malignancy. *Annals of hematology* 89 (7): 701–713.
- Keyszer, G.; Christopheit, M.; Fick, S.; Schendel, M.; Taute, B. M.; Behre, G.; Muller, L. P. u. Schmoll, H.-J. (2011): Treatment of severe progressive systemic sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis and rheumatism* 63 (8): 2540–2542.
- Klaus, M.; Stavroulaki, E.; Kastrinaki, M.-C.; Fragioudaki, P.; Giannikou, K.; Psyllaki, M.; Pontikoglou, C.; Tsoukatou, D.; Mamalaki, C. u. Papadaki, H. A. (2010): Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem cells and development* 19 (7): 1043–1054.
- Komarova, S.; Kawakami, Y.; Stoff-Khalili, M. A.; Curiel, D. T. u. Pereboeva, L. (2006): Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular cancer therapeutics* 5 (3): 755–766.

- Konopleva, M.; Konoplev, S.; Hu, W.; Zaritskey, A. Y.; Afanasiev, B. V. u. Andreeff, M. (2002): Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 16 (9): 1713–1724.
- Konopleva, M.; Tabe, Y.; Zeng, Z. u. Andreeff, M. (2009): Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 12 (4-5): 103–113.
- Kuhn, N. Z. u. Tuan, R. S. (2010): Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of cellular physiology* 222 (2): 268–277.
- Kuzmina, L. A.; Petinati, N. A.; Parovichnikova, E. N.; Lubimova, L. S.; Gribanova, E. O.; Gaponova, T. V.; Shipounova, I. N.; Zhironkina, O. A.; Bigildeev, A. E.; Svinareva, D. A.; Drize, N. J. u. Savchenko, V. G. (2012): Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem cells international* 2012: 968213.
- Kyriakou, C. A.; Yong, K. L.; Benjamin, R.; Pizzey, A.; Dogan, A.; Singh, N.; Davidoff, A. M. u. Nathwani, A. C. (2006): Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model. *The journal of gene medicine* 8 (3): 253–264.
- Le Blanc, K.; Rasmusson, I.; Sundberg, B.; Gotherstrom, C.; Hassan, M.; Uzunel, M. u. Ringden, O. (2004): Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363 (9419): 1439–1441.
- Lee, J.-W.; Lee, S.-H.; Youn, Y.-J.; Ahn, M.-S.; Kim, J.-Y.; Yoo, B.-S.; Yoon, J.; Kwon, W.; Hong, I.-S.; Lee, K.; Kwan, J.; Park, K. S.; Choi, D.; Jang, Y. S. u. Hong, M. K. (2014): A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *Journal of Korean medical science* 29 (1): 23–31.
- Lee, O. K.; Kuo, T. K.; Chen, W.-M.; Lee, K.-D.; Hsieh, S.-L. u. Chen, T.-H. (2004): Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103 (5): 1669–1675.
- Li, J.; Law, H. K.-W.; Liu, Y.-L. u. Chan, G. C.-F. (2010): Effect of cisplatin, topotecan, daunorubicin and hydroxyurea on human mesenchymal stem cells. *Zhongguo shi yan*

xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology 18 (4): 991–996.

Li, J.; Yang, S.; Lu, S.; Zhao, H.; Feng, J.; Li, W.; Ma, F.; Ren, Q.; Liu, B.; Zhang, L.; Zheng, Y.; Han, Z. C. u. Rameshwar, P. (2012).

Medyouf, H.; Mossner, M.; Jann, J.-C.; Nolte, F.; Raffel, S.; Herrmann, C.; Lier, A.; Eisen, C.; Nowak, V.; Zens, B.; Mudder, K.; Klein, C.; Oblander, J.; Fey, S.; Vogler, J.; Fabarius, A.; Riedl, E.; Roehl, H.; Kohlmann, A.; Staller, M.; Haferlach, C.; Muller, N.; John, T.; Platzbecker, U.; Metzgeroth, G.; Hofmann, W.-K.; Trumpp, A. u. Nowak, D. (2014): Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell stem cell* 14 (6): 824–837.

Miura, Y.; Yoshioka, S.; Yao, H.; Takaori-Kondo, A.; Maekawa, T. u. Ichinohe, T. (2013): Chimerism of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: is it clinically relevant? *Chimerism* 4 (3): 78–83.

Mokbel, A. N.; El Tookhy, Omar S; Shamaa, A. A.; Rashed, L. A.; Sabry, D. u. El Sayed, Abeer M (2011): Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskeletal disorders* 12: 259.

Mueller, L. P.; Luetzkendorf, J.; Mueller, T.; Reichelt, K.; Simon, H. u. Schmoll, H.-J. (2006): Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (12): 2753–2765.

Myers, T. J.; Granero-Molto, F.; Longobardi, L.; Li, T.; Yan, Y. u. Spagnoli, A. (2010): Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert opinion on biological therapy* 10 (12): 1663–1679.

Nishida, S.; Endo, N.; Yamagiwa, H.; Tanizawa, T. u. Takahashi, H. E. (1999): Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *Journal of bone and mineral metabolism* 17 (3): 171–177.

Pavlaki, K.; Pontikoglou, C. G.; Demetriadou, A.; Batsali, A. K.; Damianaki, A.; Simantirakis, E.; Kontakis, M.; Galanopoulos, A.; Kotsianidis, I.; Kastrinaki, M. C. u. Papadaki, H. A. (2014): Impaired proliferative potential of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes is associated with abnormal WNT signaling pathway. *Stem cells and development*.

Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S. u. Marshak, D. R. (1999): Multilineage

potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411): 143–147.

Polchert, D.; Sobinsky, J.; Douglas, G.; Kidd, M.; Moadsiri, A.; Reina, E.; Genrich, K.; Mehrotra, S.; Setty, S.; Smith, B. u. Bartholomew, A. (2008): IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European journal of immunology* 38 (6): 1745–1755.

Prendergast, A. M.; Cruet-Hennequart, S.; Shaw, G.; Barry, F. P. u. Carty, M. P. (2011): Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or gamma-irradiation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (21): 3768–3777.

Raggi, C. u. Berardi, A. C. (2012): Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine. *Muscles, ligaments and tendons journal* 2 (3): 239–242.

Rasmusson, I. (2006): Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* 312 (12): 2169–2179.

Schneider, R. K. (2013): Mesenchymale Stromazellen und ihre Nische. *Der Pathologe* 34 (2): 264-268.

Shamsul, B. S.; Aminuddin, B. S.; Ng, M H Angela u. Ruszymah, B H I (2004): Age and gender effect on the growth of bone marrow stromal cells in vitro. *The Medical journal of Malaysia* 59 Suppl B: 196–197.

Shi, S. u. Gronthos, S. (2003): Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (4): 696–704.

Stolzing, A.; Jones, E.; McGonagle, D. u. Scutt, A. (2008): Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development* 129 (3): 163–173.

Strube, P.; Mehta, M.; Baerenwaldt, A.; Trippens, J.; Wilson, C. J.; Ode, A.; Perka, C.; Duda, G. N. u. Kasper, G. (2009): Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone* 45 (6): 1065–1072.

Sugrue, T.; Lowndes, N. F. u. Ceredig, R. (2013): Mesenchymal stromal cells: radio-resistant members of the bone marrow. *Immunology and cell biology* 91 (1): 5–11.

- Svinareva, D. A.; Petrova, T. V.; Shipunova, I. N.; Momotiuk, K. S.; Mikhailova, E. A. u. Drize, N. I. (2009): The study of parameters of mesenchymal stromal cells differentiation in donors and patients with aplastic anemia. *Terapevticheskii arkhiv* 81 (7): 66–70.
- Valtieri, M. u. Sorrentino, A. (2008): The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Journal of cellular physiology* 217 (2): 296–300.
- Vanikar, A. V.; Dave, S. D.; Thakkar, U. G. u. Trivedi, H. L. (2010): Cotransplantation of adipose tissue-derived insulin-secreting mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells: a novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. *Stem cells international* 2010: 582382.
- Vogler, M. (2009): *Plastizität humaer multipotenter mesenchymaler Stromazellen und ihre Präparation für die regenerationsmedizinische Anwendung in der Pädiatrie.* Tübingen. 133 S.
- Wang, J.; Huang, X.-J.; Xu, L.-P.; Liu, D.-H.; Chen, H.; Chen, Y.-H.; Lai, Y.-Y.; Hou, R.-Q.; Qin, X.-Y. u. Liu, K.-Y. (2013a): Monitoring the source of mesenchymal stem cells in patients after transplantation of mismatched-sex hematopoietic stem cells plus third-party cells. *Chinese medical journal* 126 (22): 4254–4259.
- Wang, J.; Liao, L.; Wang, S. u. Tan, J. (2013b): Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. *Cytotherapy* 15 (8): 893–904.
- Watt, F. M. u. Hogan, B. L. (2000): Out of Eden: stem cells and their niches. *Science (New York, N.Y.)* 287 (5457): 1427–1430.
- Wilson, A. u. Trumpp, A. (2006): Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology* 6 (2): 93–106.
- Wu, L. W.; Wang, Y.-L.; Christensen, J. M.; Khalifian, S.; Schneeberger, S.; Raimondi, G.; Cooney, D. S.; Lee, W P Andrew u. Brandacher, G. (2014): Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Transplant immunology*.
- Xu, J.; Wang, D.; Liu, D.; Fan, Z.; Zhang, H.; Liu, O.; Ding, G.; Gao, R.; Zhang, C.; Ding, Y.; Bromberg, J. S.; Chen, W.; Sun, L. u. Wang, S. (2012): Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome. *Blood* 120 (15): 3142–3151.

Zhang, H.; Zeng, X. u. Sun, L. (2010): Allogenic bone-marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation as a novel therapy for systemic lupus erythematosus. *Expert opinion on biological therapy* 10 (5): 701–709.

Zhang, Z.-H.; Lu, Y.; Luan, Y. u. Zhao, J.-J. (2012): Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on experimental pulmonary arterial hypertension. *Experimental and therapeutic medicine* 4 (5): 839–843.

Zhao, Z.-G.; Liang, Y.; Li, K.; Li, W.-M.; Li, Q.-B.; Chen, Z.-C. u. Zou, P. (2007): Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem cells and development* 16 (4): 637–648.

Zhou, H.; Guo, M.; Bian, C.; Sun, Z.; Yang, Z.; Zeng, Y.; Ai, H. u. Zhao, R. C. (2010): Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 16 (3): 403–412.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, Daniel A; Huang, J. I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z. C.; Fraser, J. K.; Benhaim, P. u. Hedrick, M. H. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13 (12): 4279–4295.

8 THESEN

1. Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) sind Teil der Knochenmarknische, ihre funktionelle Rolle für die gesunde Hämatopoese und maligne hämatopoetische Neoplasien sowie ihr therapeutischer Nutzen sind Gegenstand aktueller Forschung.
2. Es gibt Faktoren, welche die Präsenz von MSC im Knochenmark und damit auch deren Gewinnung negativ beeinflussen.
3. Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener probandenabhängiger Parameter auf die Isolierbarkeit von MSC ist die Analyse eines großen Probandenkollektivs notwendig.
4. Die Isolierbarkeit von MSC aus der Fraktion mononukleärer Zellen des Knochenmarkspirates eignet sich zur Beurteilung der Präsenz von MSC im Knochenmark. Die isolierte Zellzahl und notwendige Expansionsdauer unterliegen zahlreichen Einflüssen und haben daher eine geringere Aussagekraft.
5. Mit steigendem Alter des Probanden lassen sich MSC schlechter aus dem Knochenmark isolieren. Dies deutet auf eine altersbedingte Schädigung der Knochenmarknische hin.
6. Als Ausdruck einer möglichen hormonellen Regulation der Nische können bei Frauen seltener MSC gewonnen werden als bei Männern.
7. Während sich bei anderen malignen Erkrankungen des Knochenmarks kein bedeutender Einfluss findet, geht das Vorliegen von MDS oder AML mit einer reduzierten Isolierbarkeit von MSC einher.
8. Eine erfolgte Stammzelltransplantation und dabei insbesondere eine allogene Transplantation beeinflussen unabhängig und deutlich die Isolierbarkeit von MSC aus dem Knochenmark.
9. Zur therapeutischen Anwendung von MSC eignen sich vor allem allogene Ansätze mit jungen, gesunden Spendern.

10. Der spezifische Einfluss von Stammzelltransplantationen auf die Präsenz von MSC stellt einen interessanten Forschungsansatz dar und verspricht Erkenntnisse über die Rolle von MSC in der Knochenmarknische.

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name:	Josephine Schneider
Geburtsdatum/Geburtsort:	27.02.1990 in Sondershausen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

08/2008	Abitur am Staatlichen Gymnasium "Geschwister Scholl" Sondershausen
08/1996 - 08/2000	Staatliche Grundschule Franzberg Sondershausen

Studium

10/2008 - 10/2014	Studium der Humanmedizin Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
Praktisches Jahr	* Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Universitätsklinikum Halle (Saale) *Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie DRK -Krankenhaus Sondershausen *Klinik für Innere Medizin Universitätsklinikum Halle (Saale)
10/2013	Vortrag der AG über die vorläufigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf der DGHO Jahrestagung in Wien
10/2014	Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2015	Assistenzärztin in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin HELIOS Klinikum Erfurt
--------------	--

Nebentätigkeiten

Mitglied des Helferprojektes der Deutschen Knochenmarkspenderdatei (DKMS)

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Erfurt, den 20.06.2016

Josephine Schneider

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erfurt, den 20.06.2016

Josephine Schneider

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Lutz Müller für die zuverlässige und umfangreiche Betreuung meiner Dissertation. Seine Ratschläge, differenzierten Anmerkungen und sein unermüdlicher Arbeitseifer haben die gemeinsame Arbeit an diesem interessantem Thema geprägt. Auch nach Beendigung meines Studiums und dem Verlassen der Universitätsklinik konnte ich jederzeit auf seine Unterstützung zählen.

Des weiteren möchte ich Frau Dr. rer. nat. Jana Lützkendorf und Frau Katrin Nerger, sowie dem gesamten Team des Forschungslabors der KIM IV des Universitätsklinikums Halle für die geleistete Arbeit danken, ohne die meine Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Besonders erwähnenswert finde ich die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre in der gesamten Arbeitsgemeinschaft. Meiner Familie danke ich für ihre fortwährende Unterstützung, Liebe und Motivation, ohne die mir diese Arbeit nicht gelungen wäre.